

# EIN 3D KULTURSYSTEM ZUR UNTERSUCHUNG DER FRÜHEN STADIEN DER LÄSIONSBILDUNG BEI ENDOMETRIOSE

Sebastian Daniel Schäfer, Anna Stejskalova, Ludwig Kiesel, Martin Götte

Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Domagkstrasse 11, 48149 Münster  
mgotte@uni-muenster.de

## EINLEITUNG

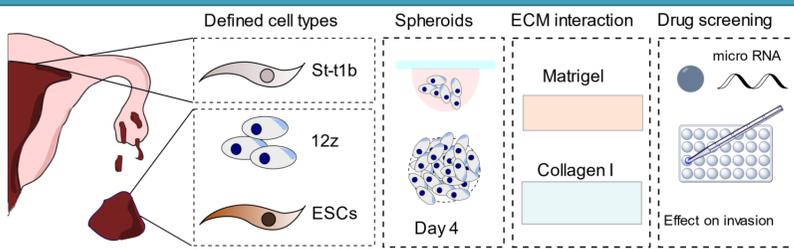
Endometriose ist eine invasive, nicht maligne Erkrankung, bei der endometriales Gewebe außerhalb des Uterus wächst. Diese Erkrankung betrifft bis zu 10% der Frauen und kann zu schweren Schmerzen und in vielen Fällen auch Infertilität führen<sup>1</sup>. Aktuelle Behandlungsstrategien beinhalten hormonelle Therapie oder chirurgische Entfernung der Läsionen. Diese Behandlungsansätze sind jedoch nicht kurativ und sind mit ausgeprägten Risiken und Nebenwirkungen assoziiert<sup>2</sup>.

Nach der Theorie nach Sampson entstehen endometriale Läsionen aufgrund einer retrograden Menstruation, bei der Teile des endometriellen Gewebes durch die Tuben hindurch fließen und danach Endometrioseherde im Bereich der Tuben, der Ovarien und der Bauchhöhle ausbilden<sup>3</sup>. Anschließend müssen die Zellen durch das Peritoneum hindurch penetrieren, das aus drei Barrierekomponenten besteht – dem Mesothel, der Basalmembran und dem unterliegenden Bindegewebe<sup>3</sup>. Die Mechanismen, die endometriale Zellen benutzen um zu implantieren und invasiv zu wachsen und dann Läsionen zu bilden und welche Signaltransduktionskaskaden dabei verwendet werden sind weiterhin unzureichend bekannt<sup>4</sup>. Zusätzlich wird untersucht, ob der invasive Phänotyp durch Variationen des endometriellen Phänotyps zu erklären ist<sup>5</sup> oder durch Faktoren des Mikromilieus<sup>1</sup>.

Eine signifikante Hürde bei der Beantwortung dieser Fragen war das Fehlen eines nutzbaren in vitro und in vivo experimentellen Systems. Kleintiermodelle sind nur von limitiertem Nutzen, da eine reguläre Menstruation nur bei Menschen und nicht menschlichen Primaten eintritt<sup>6</sup>. Traditionelle 2D Zellkulturen auf der anderen Seite können nur einige Aspekte der Erkrankung abbilden und vernachlässigen Zell-Zell-Interaktionen während der Invasion<sup>7</sup>. Dieser Aspekt erscheint besonders einschränkend, als das aktuelle Publikationen nahe legen, dass endometriose invasive Zellen typischerweise unterschiedliche invasive Strategien verfolgen können (z.B. kollektive oder mesenchymale Migration) abhängig von ihrer Umgebung<sup>7</sup>. Daher besteht die Notwendigkeit für eine effiziente Methode, mit der invasive Strategien untersucht werden können, die endometriose Zellen unter näherungsweise in vivo Bedingungen zeigen. Daher beschäftigte sich diese Studie mit der Entwicklung eines einfachen 3D Zellkultursystems, mit dem die individuellen Variablen separat untersucht werden können, die die endometriale Invasion beeinflussen.

Das Ziel dieser Studie war es ein 3D in vitro System zur Untersuchung der invasiven Prozesse, die bei frühen Endometriosestadien involviert sind, zu entwickeln.

## KONZEPT



## METHODEN

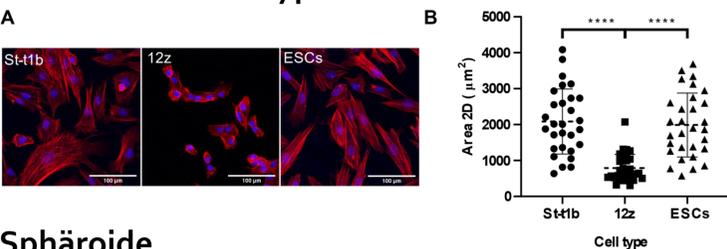
Die Zelltypen, die in dieser Studie verwendet wurden waren immortalisierte eutope St-t1b Zellen, ektote immortalisierte 12z Zellen (Ecadh-/CK+) und primäre stromale ektote Zellen (ESCs).

Die Sphären wurden mit Hilfe der "hanging drop" Methode über 4 Tage erzeugt. Die Sphäroide wurden daraufhin geerntet und entweder auf Kollagen oder Matrigel in 5% charcoal stripped FBS ausgesät und an Tagen 1, 3 und 5 beurteilt. Inhibitoren wurden den Sphären hinzugefügt. Transfektion konnte mit Hilfe des Dharmafect Reagenz erzeugt. Die Zielgenexpression wurde auf das Housekeeping Gen ACT normalisiert und dann auf die St-t1b Zelllinie ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

Als Bildgebung wurden sowohl Standard- als auch konfokale Mikroskopie verwendet. F-actin wurde mit Phalloidin CruzFluor™ 594 Konjugat in einer 1:1000 Verdünnung und die nukleäre DNA mit DAPI gefärbt.

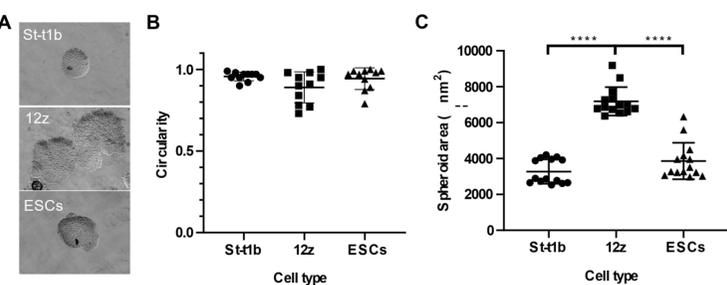
## ERGEBNISSE

### Verschiedene Zelltypen



**Bild 1. Zelltypen.** A. St-t1b und ESCs haben stromale, 12z haben epitheliale Morphologie. B. Die Größe von 12z Zellen ist signifikant kleiner, n=30, ANOVA

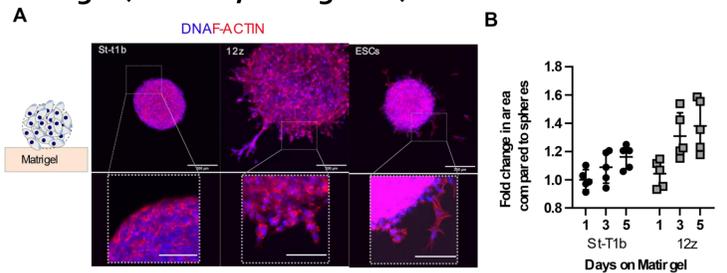
### Sphäroide



**Bild 2 Sphäroid Ausbildung - Tag 4.** A. Alle Zelltypen bildeten Sphären aus. Fixierte Sphären an Tag 4. B. Es gab keine signifikanten Unterschiede bzgl. Des Zellzyklus. C. 12z Sphäroide waren signifikant größer, dies legt Unterschiede bei der Dichte und den Eigenschaften nahe. ANOVA

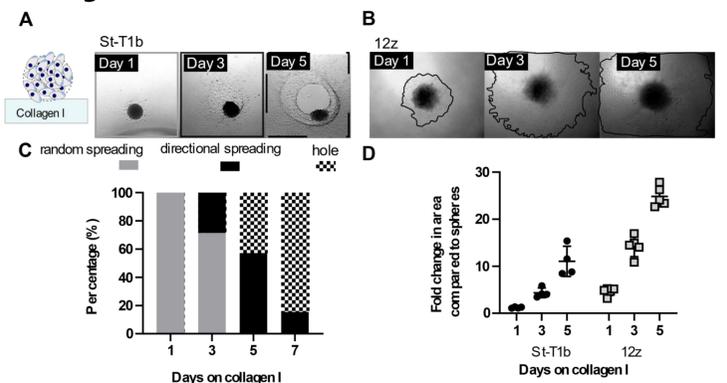
### EZM Interaktionen

#### Matrigel (Laminin, Kollagen IV)



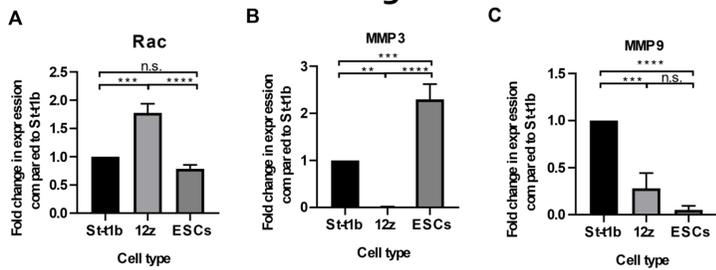
**Bild 3 Interaktion mit Matrigel.** A. Konfokale Bilder an Tag 7. St-t1b Zellen invadieren weder noch sprossen sie aus auf Matrigel. 12z Zellen entwickelten Nucleus-reiche Invadopoden. ESCs zeigten Migration und Invasion. B. Quantifizierung von ausprossenden Gebieten über 5 Tage.

#### Kollagen I

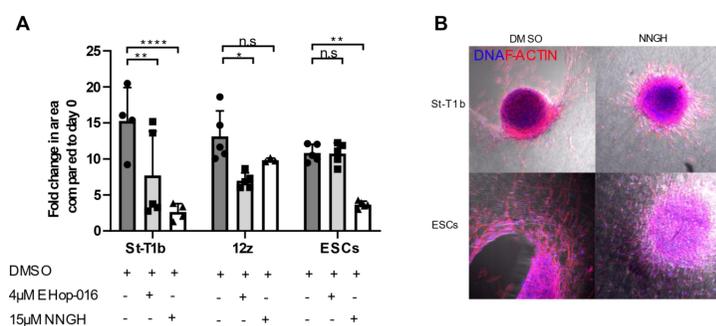


**Bild 4. Interaktion mit Kollagen I.** A. St-t1b Zellen und ESCs zeigen zunächst directionale Invasion, die dann durch einen Defekt ersetzt wird. B. 12z Zellen zeigen kollektive Migration. C. Quantifizierung der Defektbildung über die Zeit, n=10. D. Vergleich der Ausbreitungsdynamik von stromalen St-t1b und epithelialen 12z Zellen. E. St-t1b Zellen bilden einen Actin-reichen Ring um die Begrenzung des Defekts herum. Das Nebenbild zeigt, dass der Actin-Ring eine feste Barriere ausbildet. F. Kollektive Migration an Tag 7. Nebenbild (XZ Ebene) zeigt keine Invasion. 20x Vergrößerung an Tag 3 legt nahe, dass die Zellen an den Zellkontakten verbunden sind.

### Medikamenten-Screening – small molecules

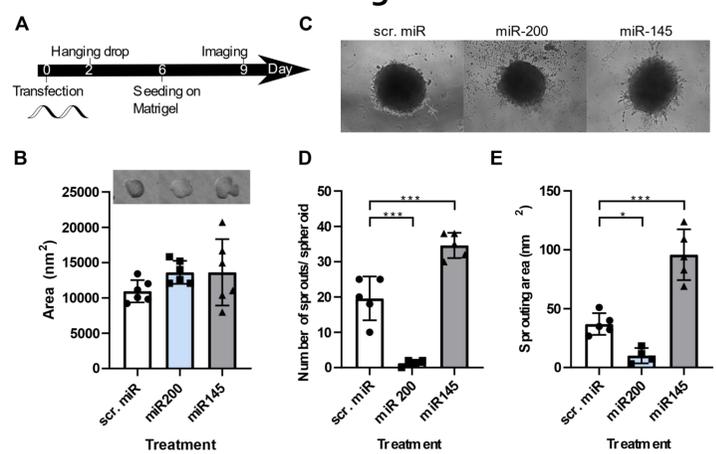


**Bild 5. Differentielle Gen Expression.** A. Rac, wichtig für Vorwärtsbewegung, ist hochreguliert bei 12z Zellen, MMP3 ist herunterreguliert bei 12z und hochreguliert bei ESCs. MMP9 wird hauptsächlich von St-t1b Zellen exprimiert.



**Bild 6. "Small molecule" Inhibitoren beeinflussen Ausbreitung und Invasion auf Kollagen.** A. Invasives Gebiet auf Kollagen an Tag 5 verglichen mit Tag 0. Rac Inhibitor Ehop-016 hatte einen bimodalen Effekt auf stromale Zellen und führten in manchen Fällen zu Zellzyklusarrest. Bei 12z Zellen gab es eine signifikante Reduktion des Gebietes. A and B: NNGH reduzierte signifikant die Invasivität stromaler Zellen.

### Medikamenten-Screening – microRNA



**Bild 7. Effekt von microRNAs miR-200 und miR-145 auf das Aussprossen von 12z Sphäroiden auf Matrigel.** A. Zeitpunkte. B. Die RNA Transfektion bewirkte keine signifikante Veränderung in der Größe der Sphären. C. Transfizierte Sphären auf Matrigel an Tag 3. D. miR-200 reduzierte signifikant die Anzahl an Sprossen während miR-145 das Aussprossen unterstützte. E. Gebiet, das von Sprossen bedeckt war war signifikant kleiner und größer nach miR-200, und miR-145 Behandlung respektive.

## SCHLUSSFOLGERUNG

Das Sphäroidmodell wurde benutzt um mehrere der invasiven Strategien zu reproduzieren, die endometriale Zellen in vivo benutzen. Unterschiede zwischen individuellen Zelltypen bzgl. ihrer Fähigkeit mit Matrigel und Kollagen I zu interagieren, wurden beobachtet. Tiefe Penetration auf Kollagen I konnte mit Hilfe eines Breitspektrum MMP Inhibitors NNGH und microRNA miR-200 verhindert werden und führte zu einer geringeren Anzahl an Sprossen bei 12z Zellen auf Matrigel.

## REFERENZEN

- Zondervan, K. T. et al. Endometriosis. Nat. Rev. Dis. Prim. 4, 9 (2018).
- Alimi, Y., Iwanaga, J., Loukas, M. & Tubbs, R. S. The Clinical Anatomy of Endometriosis: A Review. Cureus 10, e3361 (2018).
- Young, V. J., Brown, J. K., Saunders, P. T. K. & Horne, A. W. The role of the peritoneum in the pathogenesis of endometriosis. Hum. Reprod. Update 19, 558–569 (2013).
- Nap, A. W., Dunselmann, G. A. J., de Gooij, A. F. P. M., Evers, J. L. H. & Groothuis, P. G. Inhibiting MMP activity prevents the development of endometriosis in the chicken chorioallantoic membrane model. Hum. Reprod. 19, 2180–2187 (2004).
- Anglesio, M. S. et al. Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer. N. Engl. J. Med. 376, 1835–1848 (2017).
- Greaves, E., Critchley, H. O. D., Horne, A. W. & Saunders, P. T. K. Relevant human tissue resources and laboratory models for use in endometriosis research. Acta Obstet. Gynecol. Scand. 96, 644–658 (2017).
- Krakhmal, N. V., Zavyalova, M. V., Denisov, E. V., Vtorushin, S. V. & Perelmuter, V. M. Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. Acta Naturae 7, 17–28 (2015).

## FÖRDERUNG

