

Aus dem

Department für Frauengesundheit Tübingen
Universitäts-Frauenklinik

**Charakterisierung von Organoidkulturen aus Endometrium
bei unterschiedlichen Indikationen zu einer operativen
Therapie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Kern, Liliya, geb. Martin

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. K. Rall

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau

Tag der Disputation: 28.09.2022

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	1
1	Einleitung	2
1.1	Zellkultivierung	2
1.1.1	historischer Rückblick	2
1.1.2	Organoidkultur	2
1.2	Die Gebärmutter (Uterus).....	4
1.2.1	Anatomie und Aufbau	4
1.2.2	Zyklische Veränderungen des Endometriums	4
1.2.3	Physiologische Veränderungen der Gebärmutter	5
1.2.3.1	Dezidua	5
1.2.3.2	Endometrium in der Postmenopause	5
1.2.4	Pathologien der Gebärmutter.....	5
1.2.4.1	Uterusmyome	5
1.2.4.2	Endometriose	6
1.2.4.3	Endometriumkarzinom	6
1.3	Fragestellung	7
2	Material und Methoden.....	9
2.1	Ethikvotum und Einverständniserklärung	9
2.2	Datenerhebung und Patientenkollektiv.....	9
2.3	Gewinnung von Gewebeproben.....	9
2.4	Erstellen einer Organoidkultur.....	10
2.4.1	Verarbeitung der Gewebeproben.....	10
2.4.2	Ansetzen einer Organoidkultur.....	10
2.4.3	Passagieren	11
2.4.4	Einfrieren und Auftauen von Organoiden.....	12
2.4.5	Fixieren und Einbetten der Organoide	13
2.5	Nährmedium	14

2.5.1	Nährmedium vor Optimierung.....	14
2.5.2	Finales Nährmedium.....	15
2.6	Histologische Methoden.....	16
2.6.1	Immunhistochemisch gefärbte Zielstrukturen	16
2.7	Zytodiagnostik.....	16
2.8	Mediumoptimierung.....	17
2.8.1	Testung unterschiedlicher Nährmedien	17
2.8.2	Einfluss von FCS im Nährmedium	18
2.8.3	L-WRN konditioniertes Medium	18
2.9	Ergebnisdokumentation	19
3	Ergebnisse	20
3.1	Patientendatenbank	20
3.2	Organoidkulturen aus Endometrium.....	21
3.2.1	Organoidkultur-Setup.....	22
3.2.2	Prämenopause.....	28
3.2.2.1	Uterus myomatosus	28
3.2.2.2	Adenomyosis uteri.....	36
3.2.3	Postmenopause	36
3.2.3.1	Atrophes Endometrium.....	36
3.2.4	Dezidua.....	37
3.2.4.1	Interruptio	37
3.2.4.2	Abort.....	40
3.2.5	Gegenüberstellung der benignen Entitäten.....	43
3.3	Histopathologische Färbungen	44
3.4	Endometriumkarzinom	45
3.4.1	Probengewinnung und Verarbeitung.....	45
3.4.2	Organoidkultur	46
3.5	Endometriose.....	47
3.5.1	Probengewinnung und Organoidkultur.....	47

3.5.2	Zytodiagnostik.....	50
4	Diskussion.....	51
4.1	Ergebnisse	51
4.1.1	Organoide aus benignem Endometrium	51
4.1.2	Limitationen der Kultivierung.....	53
4.1.3	Endometriumkarzinom	55
4.1.4	Endometriose.....	58
4.2	Material und Methoden	62
4.2.1	Patientenkollektiv	62
4.2.2	Gewebeproben	64
4.2.3	Organoidmodell.....	65
4.2.4	Ausblick	69
5	Zusammenfassung.....	70
6	Literaturverzeichnis	73
7	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	80
8	Danksagung.....	81
II.	Tabellenverzeichnis	82
III.	Abbildungsverzeichnis.....	83

I. Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovine Serum Albumin, deutsch: Rinderalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CM	conditioned media
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
E2	Östradiol
ECT-O	ektope Endometriumorganoide
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
ELC	Endometrial Like Cells, deutsch: Endometriumähnliche Zellen
EM-O	physiologische Endometriumorganoide
ER α	Östrogenrezeptor Alpha
EUT-O	eutope Endometriumorganoide
FBS	Fetal Bovine Serum, deutsch: fetales Rinderserum
FCS	Fetal Calf Serum, deutsch: fetales Kälberserum
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLM	Hemosiderin-laden-Macrophages, deutsch: Hämosiderin beladene Makrophagen
HSK	Hysteroskopie
P	Passage
PAP	Papanicolaou
PAX8	Paired-Box-Protein 8
PBS	Phosphate buffered Saline
PEG	Polyethylenglykol
PR	Progesteronrezeptor
RBC	red blood cell
RCC	Recovery Cell Culture
rpm	revolution per Minute (deutsch: Umdrehungen pro Minute)
RSPO1	R-Spondin-1
sog	sogenannt
T	Tag
TOM	Trophoblast Organoid Medium

1 Einleitung

1.1 Zellkultivierung

1.1.1 historischer Rückblick

Die Kultivierung von Zellen ist ein fester Bestandteil der naturwissenschaftlichen Forschung und hat eine Vielzahl von Anwendungen. Durch sie ist es möglich grundlegende Stoffwechselprozesse zu untersuchen, sowie Wirkungen entwickelter Substanzen an ihnen zu testen. Das historisch bekannteste Beispiel ist die HeLa-Zelllinie, welche in den Jahren 1951/1952 etabliert wurde. Sie war die erste publizierte immortalisierte Zelllinie aus menschlichem Gewebe. (Vgl. Masters, 2002). Seitdem hat die Technologie der Zellkultivierung enorme Fortschritte gemacht. 1987 demonstrieren Li *et al.* die Bedeutung der extrazellulären Matrix für das Zellenwachstum. Sie zeigen, dass epitheliale Zellen, gewonnen aus der Brustdrüse von Mäusen, dreidimensionale Strukturen wie Gänge und Lumina bilden wenn sie auf einer basalmembranartigen Matrix kultiviert werden (Li *et al.*, 1987). 1998 gelingt es Thomson *et al.* (1998) humane Stammzellen zu kultivieren. Diese Meilensteine bahnten den Weg für die Entwicklung eines dreidimensionalen Zellkultur-Modells. Erste Beispiele aus humanem Gewebe waren 3D-Kulturen aus Brustdrüsen und Großhirnrinde (Lee *et al.*, 2007, Eiraku *et al.*, 2008). Mittlerweile ist die Organoidkultur eine verbreitete und etablierte Zellkulturtechnik.

1.1.2 Organoidkultur

Organoide sind *in vitro* erzeugte, dreidimensional organisierte Zellverbände. Durch ihren Aufbau bilden sie Organe *in vivo* in gewisser Weise nach und tragen daher den gleichen Wortstamm (Huch *et al.*, 2017). 2014 versuchten Lancaster und Knoblich den bis dahin uneinheitlich verwendeten Begriff zu definieren. Folgende Definition haben sie ausgearbeitet:

*„A collection of organ-specific cell types that develops from stem cells or organ progenitors and self-organizes through cell sorting and spatially restricted lineage commitment in a manner similar to *in vivo*.“*(Lancaster and Knoblich, 2014)

Frei übersetzt entspricht es: „[Organoide sind] eine Ansammlung organspezifischer Zelltypen, die sich aus Stammzellen oder Progenitorzellen entwickeln und sich durch Zellsortierung und räumlich begrenzte Festlegung der Zellabstammung ähnlich wie in vivo selbstorganisieren.“ (Lancaster and Knoblich, 2014)

Organoide können aus embryonalen Stammzellen, induzierten pluripotenten Stammzellen oder organgebundenen adulten Stammzellen erstellt werden (Huch *et al.*, 2017). Durch die Kultivierung in einem zelltypspezifischen Expansionsmedium differenzieren sich die Zellen und organisieren sich zu für diesen Zelltyp charakteristischen Strukturen (Sato and Clevers, 2015). Durch die dreidimensionale Selbstorganisation kommt das Organoidmodell dem Organaufbau in vivo näher als eine zweidimensionale Kultur (Vinci *et al.*, 2012) und eröffnet dadurch zahlreiche Möglichkeiten, insbesondere in der translationalen Forschung. Dazu gehört die Modellierung von bislang unzureichend verstandenen Krankheiten oder Krankheiten einzelner Patienten. Ein weiteres Feld bietet die Entwicklung und Testung von Arzneimitteln. (Vgl. Ravi *et al.*, 2015, Clevers, 2016) Dadurch geht die medizinische Versorgung einen weiteren Schritt in Richtung personalisierter Medizin und könnte den Einsatz von Tierversuchen reduzieren.

Mittlerweile wurden verschiedene humane Zellen aller drei Keimblätter im Organoidmodell erfolgreich kultiviert. Darunter sind Organoide aus Stammzellen von Magen (Barker *et al.*, 2010), Darm (Sato *et al.*, 2009, Spence *et al.*, 2011), Nieren (Takasato *et al.*, 2014), Retina (Nakano *et al.*, 2012) und Brustdrüse (Sachs *et al.*, 2018) beschrieben.

Turco *et al.* (2017) und Boretto *et al.* (2017) generierten erstmals Organoide aus humanem Endometrium und etablierten Protokolle zur Langzeitkultivierung. Boretto *et al.* demonstrierten darüber hinaus die Anwendung ihres Modells bei Pathologien des Endometriums wie der Endometriose und dem Endometriumkarzinom und zeigten, dass Organoide aus pathologischem Endometrium die entsprechende Krankheit auf molekularer Ebene abbilden können. (Boretto *et al.*, 2019). Dies eröffnete einen neuen Ansatz zum

Verständnis des weiblichen Zyklus und des komplexen Vorgangs der Implantation und machte weitere Untersuchungen der Pathologien der Gebärmutter möglich.

1.2 Die Gebärmutter (Uterus)

1.2.1 Anatomie und Aufbau

Die Gebärmutter ist gegliedert in Gebärmutterkörper (Corpus uteri), Gebärmutterhals (Cervix uteri) und Gebärmutterenge (Isthmus uteri). Sie ist in drei Wandschichten aufgebaut. Von außen nach innen entspricht das einem dünnen glatten Peritonealüberzug (Perimetrium), einer kräftigen Schicht aus glatter Muskulatur (Myometrium) und einer dünnen rosafarbenen Schleimhaut (Endometrium), welche die Gebärmutter auskleidet (Aumüller *et al.*, 2010). Das Endometrium besteht aus einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel mit tubulösen Drüsen, welches in ein als Stroma uteri bezeichnetes Bindegewebe eingebettet ist. Histologisch wird die Korpusschleimhaut in zwei Schichten eingeteilt. Das konstante Stratum basale, welches dem Myometrium aufliegt und der Regeneration des Endometriums dient und das darüber liegende Stratum functionale. Dieses unterliegt zyklischen Veränderungen und wird während der Menstruation abgestoßen (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019b).

1.2.2 Zyklische Veränderungen des Endometriums

Induziert durch die zyklisch schwankenden Konzentrationen der ovariellen Hormone durchläuft das Stratum functionale den sog. Menstruationszyklus. Auf die Periodenblutung folgt die Proliferationsphase, in welcher das Stratum functionale unter Östrogeneinfluss aus dem Stratum basale aufgebaut wird. Postovulatorisch beginnt die Sekretionsphase, welche durch hohe Progesteron-Spiegel gekennzeichnet ist und damit die Differenzierung des Stratum functionale bewirkt. In dieser Phase lässt sich das Stratum functionale in ein basales Stratum spongiosum und ein oberflächliches Stratum compactum weiter einteilen. Bleibt die Einnistung einer befruchteten Eizelle aus, folgt durch den starken Abfall des Progesteron-Spiegels die Desquamationsphase. Dabei wird das Stratum functionale abgestoßen und es resultiert die Abbruchblutung bzw. Periodenblutung (Maybin and Critchley, 2015).

1.2.3 Physiologische Veränderungen der Gebärmutter

Abhängig von Lebensalter und hormonellem Einfluss unterscheidet sich die Morphologie des als normal bezeichneten Endometriums. Im weiteren soll auf zwei ausgewählte Zustände des Endometriums eingegangen werden: die Dezidua im Rahmen einer Schwangerschaft und das Endometrium in der Postmenopause.

1.2.3.1 Dezidua

Unter dem Prozess der Dezidualisierung versteht man die Differenzierung von endometrialen Stromazellen aus dem Stratum functionale zu sog. Deziduazellen. Diese lagern Glykogen und Lipide ein um den sich potenziell einnistenden Keim zu ernähren (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019b). Sie unterstützen die Einnistung des Embryos und nehmen eine wichtige Rolle für eine erfolgreiche Schwangerschaft ein (Ramathal *et al.*, 2010). Im Falle der Einnistung bilden Deziduazellen den maternalen Teil der Plazenta (Aumüller *et al.*, 2010).

1.2.3.2 Endometrium in der Postmenopause

Zwölf Monate nach Bestehen einer sekundären Amenorrhö wird die Menopause diagnostiziert, welche durch ein dauerhaftes Nachlassen der ovariellen Funktion und damit einem Mangel an Östrogen einhergeht. Das mittlere Alter der Frauen bei Eintritt liegt bei 51 Jahren (Greendale *et al.*, 1999). Mit der Menopause gehen viele Veränderungen einher, darunter die Atrophie des Endometriums. Diese ist gekennzeichnet durch eine Schleimhautrückbildung mit einer Verringerung der Drüsenzahl und einem aufgehobenen Aufbau der Schichten in Stratum basale und functionale (Thomas, 2004).

1.2.4 Pathologien der Gebärmutter

1.2.4.1 Uterusmyome

Uterusmyome sind benigne, von glatten Muskelzellen ausgehende Tumore und gehören zu den häufigsten gynäkologischen Erkrankungen (Bulun, 2013). Myome können solitär oder multipel auftreten und dadurch den Uterus vergrößern, wobei in letzterem Fall von einem Uterus myomatosus gesprochen wird. Ihr Wachstum erfolgt östrogenabhängig, sodass Myome während der

reproduktiven Zeit der Frau am stärksten an Größe zunehmen und nach der Menopause wieder abnehmen. Je nach Lokalisation können sie unterschiedliche Symptome auslösen. Ein häufiges Symptom sind Blutungsstörungen. (Vgl. Wallach and Vlahos, 2004). Diese sind ein häufiger Grund für eine operative Therapie.

1.2.4.2 Endometriose

Die Diagnose Endometriose bezeichnet das Vorkommen von endometriumähnlichem Gewebe außerhalb des Endometriums. Epidemiologische Zahlen beinhalten aufgrund uneinheitlicher Datenerhebung hohe Dunkelziffern und sind dahingehend nicht verlässlich (Ulrich *et al.*, 2014). Laut RKI liegt die Inzidenz in Deutschland schätzungsweise bei 40.000 Frauen pro Jahr (Robert Koch Institut, 2020). Prädilektionsstellen sind das Beckenperitoneum, die Ovarien, die sakrouterinen Bänder und die rektovaginale Scheidenwand. Extragenitale Manifestationen sind ebenfalls möglich (Giudice, 2010). Der Befall des Myometriums wird Adenomyose genannt. Dabei wird die Invagination der basalen Endometriumschicht in das Myometrium als eine mögliche Theorie diskutiert (Bergeron *et al.*, 2006). Typische Symptome sind der Unterleibsschmerz, sowie in manchen Fällen die Infertilität. Zudem geht die Endometriose mit einer Reduktion der gesundheitsbezogenen Lebensqualität und Arbeitsproduktivität einher (Nnoaham *et al.*, 2011).

1.2.4.3 Endometriumkarzinom

Karzinome des Endometriums stellen mit ca. 11.000 Neuerkrankungen pro Jahr die fünfthäufigste Krebserkrankung der Frau in Deutschland dar (Robert Koch Institut, 2020). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ca. 68 Jahren und betrifft damit meist Frauen in der Postmenopause, wobei auch prämenopausale Frauen mit dieser Erkrankung diagnostiziert werden (Robert Koch Institut, 2020, Morice *et al.*, 2016). Ungefähr 90% der Tumoren sind hormonabhängig und korrelieren mit einem länger andauernden Östrogeneinfluss. Histologisch handelt es sich meist um endometriale Adenokarzinome (Setiawan *et al.*, 2013). Aufgrund von vaginalen Blutungen werden die Tumoren zu 80% in einem frühen Stadium

erkannt und haben eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von 78% (Robert Koch Institut, 2020).

1.3 Fragestellung

Das Endometrium ist zeitlebens einem morphologischen und funktionellen Wandel unterworfen. Angefangen bei ruhendem Endometrium vor der Pubertät über den zyklischen Auf- und Abbau im hormonell aktiven Zeitraum, der in einer erfolgreichen Implantation und Austragung eines Neugeborenen gipfelt. Letztlich resultiert dessen Involution in der Postmenopause.

Das Verständnis des weiblichen Zyklus, sowie die komplexen Vorgänge der Implantation sind für die Reproduktion des Menschen von bedeutendem Interesse. Pathologien, die mit einem Verlust der Lebensqualität oder sogar einer Lebenszeitverkürzung einhergehen, gilt es zu verstehen und Therapieansätze zu entwickeln. Bisher wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen diese komplexen Vorgänge und zahlreiche Pathologien mithilfe von Zellkulturen, sowie weiterführenden Untersuchungen zu erforschen. Hierfür bietet das Organoidmodell eine vielversprechende Ergänzung, da es die Organstruktur und die Stoffwechselforgänge in vivo exakter nachbilden soll. 2017 haben *Turco et al.* (2017), sowie *Boretto et al.* (2017) belegt, dass das Organoidmodell auf Endometrium anwendbar ist. *Boretto et al.* (2019) zeigten darüber hinaus, dass auch aus pathologisch verändertem Endometrium Organoide generierbar sind. Diese Technik der Organoidkultivierung bietet damit ein wertvolles Werkzeug zur Ergründung der oben genannten Aspekte. Durch die Kultivierung von Deziduazellen bietet dieses Modell überdies die Möglichkeit von Arzneimitteltests an bislang davon ausgeschlossenen Patientengruppen wie Frauen während der Schwangerschaft.

Diese Arbeit soll der Anwendung des beschriebenen Organoidmodells aus Endometriumzellen dienen und im Rahmen dessen ein überarbeitetes Tübinger Modell ausgearbeitet werden. Hierfür wird Endometrium verschiedener Grunderkrankungen, sowie Indikationen zur operativen Therapie in Form von Organoiden charakterisiert und auf Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede untersucht. In einem ersten Schritt sollen Organoide aus benignem

Endometrium, d.h. prä- und postmenopausales Endometrium, sowie dezidualisiertes Endometrium kultiviert werden. In einem weiteren Schritt soll versucht werden das Modell auf pathologisch verändertem Endometrium wie Endometriose und Endometriumkarzinome anzuwenden.

2 Material und Methoden

2.1 Ethikvotum und Einverständniserklärung

Zur Durchführung der vorliegenden Studie lag das Votum der Ethikkommission vom 23.04.2018 mit der Nummer 150/2018B02 vor. Dieses beinhaltete die Verwendung, Kultivierung und Asservierung von Organoiden aus Patientengewebe. Zusätzlich unterzeichneten alle Patientinnen vor Gewinnung von Studiengewebe die Einverständniserklärung zur Verwendung von Biomaterial und Daten „Einverständniserklärung Daten- und Biobanken / Version 09 / 10. Mai 2018“ an der Universitätsklinik Tübingen.

2.2 Datenerhebung und Patientenkollektiv

Die Datenerhebung erfolgte im Zeitraum 05/2019 bis 10/2019. Eingeschlossen wurden volljährige Patientinnen, die sich zu dieser Zeit an der Universitätsfrauenklinik Tübingen einer Operation der Gebärmutter unterzogen und in den letzten 3 Monaten möglichst keine Hormontherapie erhalten haben. Die Patientendaten wurden pseudonymisiert und unter Einhaltung des Datenschutzes verwendet und ausgewertet.

Um das Organoidmodell an einem möglichst breiten Spektrum von Endometrium anzuwenden, wurden Gewebeproben von prä- sowie postmenopausalen Frauen mit verschiedenen Grunderkrankungen bzw. Operationsindikationen gesammelt. Eingeschlossen wurden folgende Diagnosen: Abort, Adenomyose, Deszensus genitalis, Endometriose, Endometriumkarzinom, Interruptio und Uterus myomatosus. Informationen bezüglich Diagnosen, Zyklusphasen, sowie Höhe des aufgebauten Endometriums wurden den Pathologiebefunden entnommen.

2.3 Gewinnung von Gewebeproben

Das Studiengewebe wurde nativ, d.h. ohne die Behandlung mit Formalin, in die Pathologie transportiert, von einem Pathologen begutachtet, vermessen und befundet. Anschließend wurde ein ca. 1x1 cm großes Gewebestück präpariert und für die Studie zur Verfügung gestellt. Zudem wurden Zytologien à 5-10 ml aus dem Douglasraum von Patientinnen mit gesicherter Endometriose gesammelt, welche im Rahmen von laparoskopischen Eingriffen routinemäßig

entnommen wurden. Ca. 1-2 ml davon wurden für die zytologische Diagnostik aufbewahrt.

2.4 Erstellen einer Organoidkultur

2.4.1 Verarbeitung der Gewebeproben

Für die Verarbeitung wurde Advanced DMEM/F12 +/+ benötigt. Zur Herstellung dessen wurde in das Basalmedium Advanced DMEM/F-12 (500 ml, Gibco) jeweils 5 ml HEPES Buffer Solution (Thermo Fisher Scientific), GlutaMAX (Gibco) und Penicillin-Streptomycin (Gibco) hinzugegeben.

Die gewonnene Probe wurde in eine Petrischale überführt und fotografisch dokumentiert. Die daran anschließenden Schritte erfolgten unter einer Sicherheitswerkbank. Es wurden 200 µl Advanced DMEM/F-12 +/+ hinzu pipettiert, um das Gewebe vor Austrocknung zu schützen. Mithilfe eines Skalpells wurde das Endometrium vom Myometrium abgeschabt und zerkleinert. Das Myometrium wurde verworfen. Zur enzymatischen Aufspaltung wurde 1 ml einer Collagenase/Dispase Lösung (1 mg/ml, Sigma-Aldrich) zusammen mit dem zerkleinerten Gewebe in ein 2 ml Eppendorf Cup gegeben und für 50-60 min in einem Thermomixer bei 37°C und 1100 rpm verdaut. Zur Inaktivierung der Enzymlösung wurde der Inhalt des Eppendorf Cups nach Ablauf der Zeit in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 10 ml Advanced DMEM/F-12 +/+ verdünnt. Enthielt der Verdau noch makroskopisch sichtbare Gewebestücke wurde dieser durch einen 100 µm großen Filter gesiebt. Der Überstand konnte ein weiteres Mal enzymatisch zerkleinert oder verworfen werden. Bei Bedarf wurde in das Reaktionsgefäß 700 µl RBC Lysebuffer zur Lyse verbliebener Erythrozyten hinzugefügt. Anschließend wurde das 15 ml Reaktionsgefäß für 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, sodass noch wenige Mikroliter das Zellpellet bedeckten und in dem verbliebenen Überstand resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension konnte angesetzt werden und/oder eingefroren und für die Biobank gesammelt werden.

2.4.2 Ansetzen einer Organoidkultur

Die gewünschte Menge der Zellsuspension aus 2.4.1 wurde entnommen, in ein 0,5 ml Eppendorf Gefäß gegeben und mit Advanced DMEM-F12 +/+ auf 55 µl

aufgefüllt. Anschließend wurden 75 µl 4°C kaltes Matrigels (VWR) hinzugegeben und mit der Pipette gründlich resuspendiert. Um ein vorzeitiges Verfestigen des Matrigels zu verhindern, erfolgte dies auf Eis.

Die verwendeten Kulturplatten entsprachen 48- bzw. 24- Wellplatten. In die Vertiefungen der Wellplatten wurden bei einer 48 (24) Wellplatte 6 (3) Tropfen à 21 µl (42 µl) zügig verteilt. Nach einer Wartezeit von etwa 20 Sekunden wurde die Wellplatte um 180° gedreht, sodass die Tropfen kopfüber hingen. In dieser Position wurden sie für 30 min in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank (Binder) bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Beim Herausnehmen aus dem Inkubator wurde die Kulturplatte mit den inzwischen verfestigten Tropfen wieder gewendet. Zu jedem Tropfen wurde spezifisches Nährmedium (vgl. Kap. 2.5), welches vorher auf Raumtemperatur erwärmt wurde, hinzugegeben - bei einer 24 Wellplatte 540 µl, bei 48 Wellplatte 270 µl pro Well. Die umliegenden Vertiefungen wurden mit Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS, Sigma-Aldrich) befüllt um ein Verdunsten des Nährmediums zu verringern. Die Zellen innerhalb der Matrigeltropfens befanden sich ab diesem Zeitpunkt in Passage 0. Das Nährmedium wurde alle 3-4 Tage gewechselt. Die Organoidkulturen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert.

2.4.3 Passagieren

Nach 7 bis 10 Tagen wurde die Organoidkultur in der Regel passagiert. Lagen hinterher alle Organoide wieder in Kultur vor, wurde vom Umsetzen gesprochen. Befand sich nach dem Passagieren nur ein Teil in Kultur, wurde dies als Splitten bezeichnet.

Zum Passagieren wurde das Nährmedium abpipettiert und in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben. In eine Pipettenspitze wurde 1000 µl Advanced DMEM/F-12 +/+ aufgenommen und mit dieser die Tropfen auf dem Boden der Vertiefungen mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde das Advanced DMEM/F-12 +/+ in die Vertiefungen mit den zerkleinerten Tropfen verteilt und mit der Pipettenspitze nochmals gründlich über den Boden geschabt. Die Suspension wurde mit einer Pipette aufgenommen und in ein 2 ml Eppendorf Gefäß gegeben. Mithilfe einer 27G Nadel auf einer 1 ml Spritze wurde die

Zellsuspension erneut mechanisch zerkleinert. Nach 6-8 maligem Auf- und Abziehen durch die Spritze, wurde die Zellsuspension in das Reaktionsgefäß mit dem darin enthaltenen Nährmedium überführt. Das Eppendorf Gefäß wurde mit 200 µl Advanced DMEM/F-12 +/+ /+ gespült und die Flüssigkeit ebenfalls in das 15 ml Reaktionsgefäß gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde für 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in einer gewünschten Menge resuspendiert. Beim Splitten wurden ungefähr 1/4 -1/3 des Zellpellets eingesetzt. Das Ausplattieren der Tropfen entsprach dem Prozedere in 2.4.2. Nach dem ersten Passagieren befanden sich die Zellen in Passage 1. Der Rest des Zellpellets wurde eingefroren und verwahrt.

2.4.4 Einfrieren und Auftauen von Organoiden

Zum Einfrieren von Organoiden wurden diese zunächst passagiert und pelletiert. (vgl. Kap. 2.4.3). Zu der verbliebenen Zellsuspension wurde pro Kryoröhrchen 700 µl Recovery Cell Culture (RCC) Freezing Medium (Gibco) hinzugegeben und resuspendiert. Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wurde in eine gewünschte Anzahl Kryoröhrchen verteilt und diese in einem Gefrierbehälter bei -80°C kontrolliert heruntergekühlt. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Kryoröhrchen anschließend in einem Flüssigstickstofftank gelagert.

Zum Auftauen eines Kryoröhrchens wurden zunächst 10 ml Advanced DMEM/F-12 +/+ /+ in ein 15ml Reaktionsgefäß gegeben und auf Raumtemperatur erwärmt. Das Kryoröhrchen wurde aus dem -80°C Kühlschrank bzw. Flüssigstickstofftank entnommen und in ein Wasserbad bei 37°C gegeben. Die Zeit im Wasserbad sollte so kurz wie möglich gehalten werden, 60 – 120 Sekunden waren ausreichend, um den eingefrorenen Inhalt zu schmelzen. Der aufgetaute Inhalt wurde aus dem Wasserbad in das bereitstehende 15 ml Reaktionsgefäß gegeben und bei 1500 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in einer gewünschten Menge resuspendiert und wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben ausplattiert. Wurde nicht das gesamte Zellpellet verwendet, war es möglich den Rest durch Zugabe von 700 µl RCC

Freezing Medium in ein frisches Kryoröhrchen zu überführen und wieder einzufrieren.

2.4.5 Fixieren und Einbetten der Organoide

Die Organoide wurden in Formalin fixiert. Dazu wurde das Nährmedium entnommen und die Vertiefungen mit den enthaltenen Tropfen mit PBS gewaschen. In jede Vertiefung einer 48-Wellplatte wurden 250 µl Dispase (1 mg/ml, Sigma-Aldrich) hinzugegeben. Die Tropfen wurden mit einer Pipettenspitze vorsichtig vom Boden gelöst und für 15 min in einen Inkubator (37°C, 5% CO₂-Atmosphäre) gestellt. Währenddessen wurde ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 1%iger Rinderalbumin (BSA)-Lösung beschichtet. Die nun zum großen Teil gelösten Tropfen wurden mit einer BSA-beschichteten Pipette in das beschichtete 15 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 10 min bei 1025 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet durch Zugabe von 4%igem Paraformaldehyd vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde in ein beschichtetes 1,5 ml Eppendorf Gefäß gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Eppendorf Gefäß bei 2000 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, um das verbliebene Formalin zu entfernen. Im letzten Schritt der Fixierung folgte eine aufsteigende Alkoholreihe mit 25%, 70% und 96% Ethanol. In diesem Zustand konnten die Organoide bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden. Nach der Fixierung wurden die Organoide in Paraffin eingebettet.

2.5 Nährmedium

2.5.1 Nährmedium vor Optimierung

Tabelle 1: Ausgangsnährmedium 0 für Endometrium Organoide.

Die Zusammensetzung von Advanced DMEM/F12 +/+/+ kann Kap. 2.4.1 entnommen werden.

Medium Bestandteile	Hersteller (Produktnummer)	Finale Konzentration
L-WRN cond. Medium	ATCC (CRL-3276)	50%
HGF	Peprotech (100-39)	50 ng/mL
FGF-10	Peprotech (100-26)	50 ng/mL
EGF	Peprotech (100-15)	50 ng/mL
A83-01	Tocris (2939)	500 nM
N2 supplement	Thermo Fisher Scientific (17502-048)	1x
B27 supplement	Gibco (17504-44)	1x
N-Acetylcysteine	Sigma (A9165)	1,25 mM
Nicotinamide	Sigma (NO636)	10 nM
SB202190	Sigma (S7067)	500 nM
Primocin	Invivogen (Ant-pm-1)	100 µg/mL
Y-27632	Hözel (T1725)	5 µM
Advanced DMEM/F12 +/+/+		-

2.5.2 Finales Nährmedium

Tabelle 2 Endgültiges Nährmedium E für Endometrium Organoide

nach Durchführung der Versuche zur Mediumoptimierung (vgl. Kap. 2.8.)

Medium Bestandteile	Finale Konzentration
L-WRN 0% FCS	10%
FGF-10	10 ng/mL
EGF	50 ng/mL
A83-01	500 nM
N2 supplement	1x
B27 supplement	1x
N-Acetylcysteine	1,25 mM
Nicotinamide	2 mM
SB202190	1 μ M
Primocin	100 μ g/mL
Y-27632	10 μ M
Advanced DMEM/F12 +/+/+	-

Tabelle 3: Nährmedium EC für Endometriumkarzinom Organoide

Medium Bestandteile	Finale Konzentration
L-WRN 0% FCS	10%
HGF	20 ng/mL
FGF-10	50 ng/mL
EGF	50 ng/mL
A83-01	500 nM
N2 supplement	1x
B27 supplement	1x
N-Acetylcysteine	1,25 mM
Nicotinamide	1 mM
Primocin	100 μ g/mL
Y-27632	10 μ M
Advanced DMEM/F12 +/+/+	-

2.6 Histologische Methoden

Am Mikrotom wurden von den Paraffinblöcken 2,5 µm dicke Schnitte erstellt, mittels Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und anschließend mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die immunhistochemischen Färbungen der Objektträger wurden am automatisierten Färbesystem Ventana BenchMark XT des Pathologischen Instituts erstellt.

2.6.1 Immunhistochemisch gefärbte Zielstrukturen

Hormonrezeptoren ER α und PR:

Östrogenrezeptor ER α : „anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1) Rabbit Monoclonal Primary Antibody“ (Ventana/Roche, 790-4324)

Progesteronrezeptor PR: „anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2) Rabbit Monoclonal Primary Antibody“ (Ventana/Roche, 790-2223)

Diese Rezeptoren werden von glandulären Epithelzellen, als auch in geringerem Maße vom umgebenden Stroma uteri in den Zellkernen exprimiert.

PAX8:

PAX8: „anti-PAX-8 (MRQ-50) Mouse Monoclonal Primary Antibody“ (Cell Marque/Ventana/Roche, 760-4618) ist ein Transkriptionsfaktor, der in den Zellkernen von Organen exprimiert wird, die embryologisch aus den Müllerschen Gängen hervorgehen.

2.7 Zytodiagnostik

Die Zytodiagnostik von Douglasproben ist ein in der Routine implementiertes Verfahren und findet durch einen Pathologen bzw. eine Zytologieassistentin statt. Die Zellproben werden pelletiert, auf Objektträger überführt und nach Papanicolaou (PAP) gefärbt. Die Zellen werden auf atypische Veränderungen oder Auffälligkeiten wie einem erhöhten Aufkommen von Entzündungszellen untersucht. Bei Patientinnen mit Endometriose wird auf adenoide Zellverbände, sowie Hämosiderin beladene Makrophagen geachtet. Ihr Vorkommen kann die Diagnose Endometriose bekräftigen.

Bevor die gesammelten Zellpellets angesetzt wurden, wurde der entsprechende zytologische Befund abgewartet. Er sollte als prädiktiver Faktor für eine erfolgreiche Kultivierung dienen.

2.8 Mediumoptimierung

2.8.1 Testung unterschiedlicher Nährmedien

Zu dem bislang eingesetzten Medium 0 (vgl. Kap.2.5.1) wurden drei zu testende Nährmedien (A, B, C) hergestellt. Diese orientierten sich an den Nährmedien aus Turco *et al.* (2017), sowie Boretto *et al.* (2017).

Tabelle 4: Zusammensetzung der Nährmedien A, B und C

Angabe der finalen Konzentration im Nährmedium. Mit Advanced DMEM/F12 +/+ wurde entsprechend dem gewünschten Endvolumen aufgefüllt.

Wachstumsfaktoren \ Nährmedium	Medium A	Medium B	Medium C
L-WRN CM	50%	-	-
R-Spondin CM	-	10%	10%
Noggin	-	100 ng/ml	100 ng/ml
HGF	50 ng/ml	50 ng/ml	-
FGF-10	50 ng/ml	50 ng/ml	50 ng/ml
EGF	50 ng/ml	50 ng/ml	50 ng/ml
A83-01	500 nM	500 nM	500 nM
N2 Supplement	1%	1%	1%
B27 Supplement	2%	2%	2%
N-Acetylcystein	1,25 mM	1,25 mM	1,25 mM
Nicotinamide	10 nM	10 nM	1 mM
Primocin	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
Y-27632	5 µM	5 µM	9 µM
Adv DMEM/F12 +/+			

Die verwendeten Organoidlinien (N=3) wurden gesplittet (vgl. Kap. 2.4.3) und in einer 48 Wellplatte auf 7 Tropfen verteilt. Es wurde beobachtet, dass beim Ausplattieren der Tropfen die Zelldichte mit jedem Tropfen abnahm, sodass die Verteilung über alle Tropfen hinweg nicht homogen war. Um diese Verzerrung zu

minimieren, wurden die Tropfen in zufälliger Reihenfolge verteilt. Je zwei Tropfen erhielten das gleiche Nährmedium. Ein Tropfen diente der Kontrolle und erhielt Medium 0. Die Linien wurden über 9 Tage bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert, die Nährmedien wurden alle vier Tage gewechselt.

Mit einem Lichtmikroskop wurden die Kulturplatten beobachtet und das Wachstumsverhalten mit dem automatisierten EVOS M7000 (Thermo Fisher Scientific) festgehalten. Bewertet wurde das Wachstum, die Anzahl der Organoide, die Größe, sowie das Vorhandensein von Bodenwachstum.

An Tag 7 wurden die Organoide mithilfe eines Zellzählers manuell ausgezählt und anhand ihrer Größe in drei Kategorien (100-199 µm, 200-299 µm, ≥ 300 µm) eingeteilt. Gewertet wurden Organoide, die zu diesem Zeitpunkt eine Größe >99 µm erreicht hatten. Die Organoide, welche Medium 0 erhalten hatten wurden nicht ausgewertet. Anschließend wurde für die Nährmedien A, B und C die durchschnittliche Anzahl an Organoiden pro Vertiefung berechnet.

2.8.2 Einfluss von FCS im Nährmedium

Zur Untersuchung des Einflusses von Fetal Calf Serum (FCS, deutsch: fetales Kälberserum) wurden drei Nährmedien verwendet. Die Medien A und B wurden aus dem Vorversuch 2.8.1 als Kontrollmedien übernommen. Das dritte Nährmedium B* entsprach in der Zusammensetzung dem Medium B (vgl. Tabelle 4), welchem zusätzlich 5% FCS hinzugefügt wurde. Die Nährmedien wurden alle vier Tage erneuert.

Die Tropfen der Organoidlinien aus dem Versuch 2.8.1 wurden vermischt, gemeinsam passagiert und auf einer 48 Wellplatte auf 6 Tropfen verteilt. Die Verteilung der Tropfen verlief wie im Vorversuch randomisiert. Die Linien wurden über 9 Tage bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert, ihr Wachstumsverhalten beobachtet und mit dem EVOS M7000 fotografisch dokumentiert.

2.8.3 L-WRN konditioniertes Medium

Das verwendete konditionierte Medium entstammte der Zelllinie L-WRN (ATCC CRL-3276) und produzierte laut Herstellerangaben die Proteine Wnt3a, R-

Spondin (RSPO1) und Noggin. Die Herstellung des konditionierten Mediums erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers mit einem Basismedium aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium und 10% fetalem Rinderserum (ATCC, 2016).

In diesem Versuch wurde das konditionierte Medium entsprechend dem Protokoll des Herstellers, aber mit Verzicht auf das fetale Rinderserum produziert und seine Wirksamkeit überprüft.

Dazu wurde das Nährmedium A* hergestellt, welches die Zusammensetzung des Nährmediums A enthält (vgl. Tabelle 4), aber das L-WRN konditionierte Medium (CM) ohne FCS.

Eine ausgewählte Organoidlinie wurde passagiert und auf einer 48 Wellplatte auf 6 Tropfen verteilt. Je zwei Tropfen erhielten Medium A* mit 10%, - 20% oder 50% L-WRN CM 0% FCS. Die Tropfen wurden randomisiert ausplattiert und das Nährmedium alle 4 Tage gewechselt.

Die Organoidlinie wurde über 9 Tage bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert und das Wachstum mit dem EVOS M7000 festgehalten.

2.9 Ergebnisdokumentation

Das Wachstum der Organoide wurde lichtmikroskopisch in 4- und 10facher Vergrößerung beobachtet und schriftlich dokumentiert. In ausgewählten Zeitintervallen wurden die Kulturplatten mit dem EVOS M7000 Imaging System fotografisch dokumentiert.

Die gesammelten Daten, sowie die Datenaufbereitung erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel von Microsoft.

3 Ergebnisse

3.1 Patientendatenbank

Im untersuchten Zeitraum wurden Gewebe- und Zellproben von insgesamt 47 Patientinnen gesammelt, aufgearbeitet und zu einer bestehenden Gewebedatenbank hinzugefügt. Tabelle 5 gibt einen Überblick über das erhobene Patientenkollektiv. Die prozentuale Verteilung der untersuchten Diagnosen wird in Abbildung 1 veranschaulicht.

Tabelle 5: Eingeschlossenes Patientenkollektiv

eingeteilt nach vorliegenden Diagnosen. Altersdurchschnitt angegeben in Jahren. Menopausenstatus eingeteilt in Prämenopause (Prä), Perimenopause (Peri) und Postmenopause (Post).

Diagnose	Anzahl	Alters- durchschnitt	Eigenschaften des Endometriums (Anzahl)	Menopau- senstatus
Abort	5	33	Dezidualisiertes Endometrium :5	Prä: 5 Post: -
Adenomyose	3	44	Proliferationsphase: 2 Sekretionsphase: 1	Prä: 3 Post: -
Descensus uteri	4	53	Proliferationsphase: 1 Sekretionsphase: 1 Endometrium ruhend: 2	Prä: 2 Post: 2
Endometriose	7	33	Proliferationsphase: 4 LZ-Gestagenth.: 3	Prä: 7 Post: -
Endometrium- karzinom	14	67	Siehe Kap. 3.4	Peri: 1 Post: 13
Interruptio	5	28	Dezidualisiertes Endometrium: 5	Prä: 5 Post: -
Uterus myomatosus	9	43	Proliferationsphase: 7 Sekretionsphase: 1 Endometrium atroph: 1	Prä: 9 Post: -

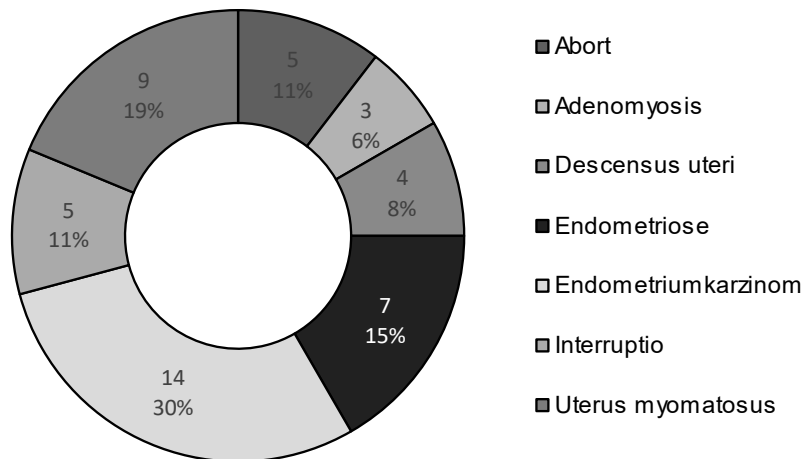


Abbildung 1: Prozentuale Verteilung aller eingeschlossenen Diagnosen

Kuchendiagramm: Abort (11%), Adenomyose (6%), Descensus uteri (8%), Endometriose (15%), Endometriumkarzinom (30%), Interruptio (11%) und Uterus myomatosus (19%)

3.2 Organoidkulturen aus Endometrium

Aus dem Patientinnenkollektiv wurden 28 Proben in Form von Organoidkulturen angesetzt. Es wurde eine homogene Verteilung der Entitäten angestrebt, welche in Tabelle 6 dargestellt sind. 21 Proben wiesen ein stabiles Wachstumsverhalten auf. In 7 Fällen war entweder von Beginn an kein Wachstum feststellbar oder ein weiteres Wachstum blieb nach der Passagierung aus. Innerhalb der Diagnosegruppen mit am ehesten pathologisch unverändertem Endometrium (Abort, Adenomyose, Descensus uteri, Interruptio und Uterus myomatosus) konnten 15 von 17 angesetzten Organoidkulturen etabliert werden. Die Erfolgsrate in diesem Kollektiv lag bei 88%, während über alle Entitäten hinweg die Erfolgsrate 75% betrug.

Tabelle 6: Angesetzte Organoidkulturen

Einteilung nach Diagnose unter Angabe der Benennung der Zelllinien, der Anzahl, Spannweite der Passagen (Minimum - Maximum), sowie dem erreichten Endpunkt. Die Anzahl der Passagen bezieht sich nur auf Organoidkulturen, die den Endpunkt „intakte Kultur“ erreicht haben. Zu möglichen Endpunkten gehört die erfolgreiche Kultivierung mit anschließendem Einfrieren der Zelllinie (intakte Kultur) oder eine fehlgeschlagene Kultur mit ausbleibendem Wachstum (kein Wachstum). Dabei wird nicht unterschieden ob von Beginn an kein Wachstum zu beobachten war, oder das Wachstum nach mehreren Passagen ausblieb.

Diagnose	Bennenung	Anzahl	Passagen (Min. - Max.)	Endpunkte:
Abort	#Abort_0x	4	4 - 6	Intakte Kultur: 3 Kein Wachstum: 1
Adenomyose	#Admyo_0x	2	7 - 12	Intakte Kultur: 2
Descensus uteri	#Desc_0x	2	4 - 5	Intakte Kultur: 2
Endometriose	#Endo_0x	7	2 - 4	Intakte Kultur: 4 Kein Wachstum: 3
Endometriumkarzinom	#E-Ca_0x	4	4 - 7	Intakte Kultur: 2 Kein Wachstum: 2
Interruptio	#Inter_0x	5	4 - 7	Intakte Kultur: 5
Uterus myomatosus	#Myom_0x	4	8 - 9	Intakte Kultur: 3 Kein Wachstum: 1

3.2.1 Organoidkultur-Setup

Der folgende Aufbau einer Organoidkultur soll exemplarisch für Organoidkulturen aus Endometrium verschiedener Diagnosen dienen. Ergänzende oder

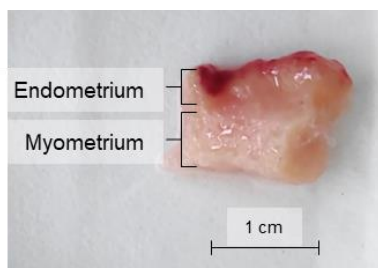


Abbildung 2: Gewebeprobe mit Anteilen von Endometrium und Myometrium:

Das Endometrium liegt als rötlich, glänzende Schicht dem Myometrium auf. Das Myometrium wurde nach der Trennung vom Endometrium verworfen.

abweichende Eigenschaften, sowie weiterführende Versuche werden in den einzelnen Unterkapiteln behandelt.

Die verwendeten Gewebeproben stammten von operativ entfernten Uteri, waren ca. 1x1 cm groß und enthielten Anteile von Endometrium und Myometrium (Abb. 2). Das Endometrium hob sich als glänzende weiche, glanduläre Schicht vom Myometrium ab. Es hatte eine weiche, schleimige Konsistenz, während das Myometrium solide und

weniger nachgiebig war. Je nach Hormonstatus war das Endometrium hoch aufgebaut, oder als dünner Saum vorliegend. In dem gesammelten Patientinnenkollektiv betrug die Endometriumdicke von 0,1 bis 0,7 mm. Das Endometrium wurde enzymatisch zerkleinert, gefiltert und pelletiert (Abb. 3).

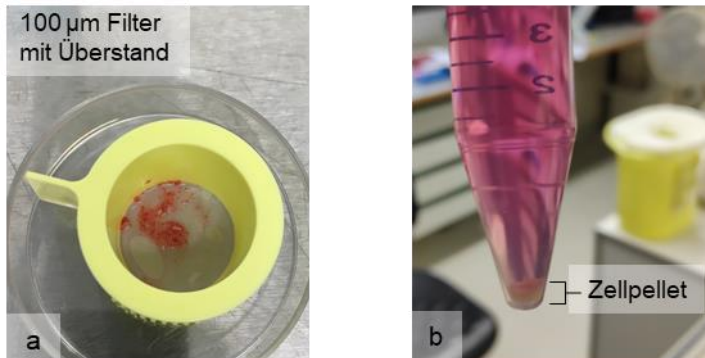


Abbildung 3: Schritte der Gewebeverarbeitung

a) Gefilterter Überstand in einem 100 µm Filter, welcher verworfen oder ein weiteres Mal mit Enzymen behandelt wurde, b) 15 ml Reaktionsgefäß mit Zellpellet in Advanced DMEM/ F-12 +/+/. Das Pellet enthält die enzymatisch gespaltenen Zellen des Endometriums. Dieses wurde zum einen mit Matrigel vermischt und ausplattiert und zum anderen eingefroren und für die Gewebekbank gesammelt.

Die Zellpellets enthielten neben Epithel- und Bindegewebszellen auch Erythrozyten, welche durch einen Zwischenschritt lysiert wurden. Anschließend wurden die Zellen mit einer basalmembranartigen Matrix vermischt und in die Vertiefungen von Kulturplatten ausplattiert (Abb. 4a). In Anwesenheit von Nährmedium mit speziellen Wachstumsfaktoren (vgl. Kap. 2.5) wurden sie kultiviert (Abb. 4b).

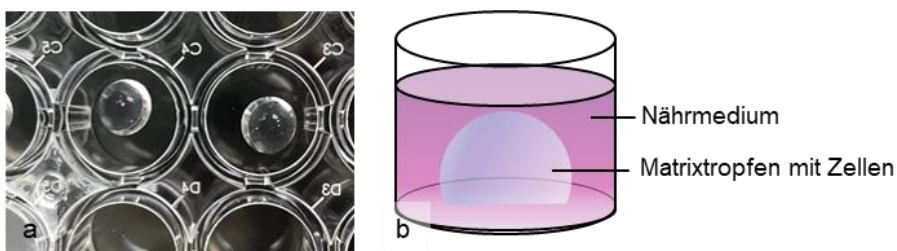


Abbildung 4: Aufbau einer Organoidkultur

a) Ausschnitt einer 48-Wellplatte mit ausplattierten Matrigeltropfen. Die Wellplatte ist um 180° gedreht. Zu sehen ist die Unterseite der Tropfen wie sie am Boden der Kulturplatte haften. Im nächsten Schritt wird die Platte gewendet und Nährmedium hinzugegeben b) Skizze der Vertiefung einer Kulturplatte. Der Matrixtropfen enthält die zerkleinerten Zellen. Er haftet mittig in der Vertiefung und ist umgeben von Nährmedium.

In Abbildung 5 ist der Primäransatz einer Organoidkultur zum Zeitpunkt des Ausplattierens Passage 0 (P0) Tag 0 (T0) dargestellt.

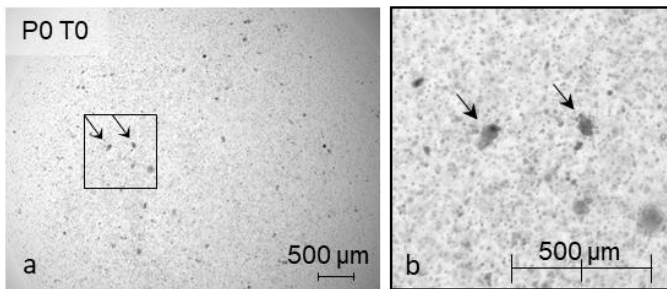


Abbildung 5: Primäransatz der Organoidkultur #Abort_04 zum Zeitpunkt des Ausplattierens

Passage 0 Tag 0 (P0 T0), Pfeile deuten auf glanduläre Strukturen, Maßstab jeweils 500 µm
 a) Übersichtsbild des Matrixtropfens mit darin enthaltenen Zellen. Das eingezeichnete Quadrat entspricht dem vergrößerten Ausschnitt b) Ausschnitt des Matrixtropfens, die glandulären Strukturen sind unregelmäßig geformt und größer als die umliegenden Einzelzellen. Die Einzelzellen haben eine gleichmäßig runde Form und sind zu diesem Zeitpunkt nicht sicher von Bindegewebszellen zu unterscheiden.

Beobachtbar waren glanduläre Strukturen (Abb. 5; Pfeile) sowie Einzelzellen. Die glandulären Strukturen imponierten als kleine, unregelmäßig geformte Zellverbände, die sich lichtmikroskopisch dunkel von den umliegenden Zellen abhoben. Sie waren umgeben von zahlreichen Einzelzellen, die eine gleichmäßige runde Form hatten. Des Weiteren enthielten die Ansätze Leukozyten und Bindegewebszellen wie z.B. Fibroblasten, welche einen ovalen Zellkörper und fadenförmige Fortsätze besitzen. Diese Zellen waren im Primäransatz an Tag 0 nicht sicher von glandulären Strukturen zu differenzieren. Im Verlauf waren sie leichter zu identifizieren (Abb. 6, 9). Nach 24 Stunden ließen sich erste kleine, sphärische Organoide erkennen. Es war ein prominenter dunkler Rand von einem hellen Zentrum abgrenzbar (Abb. 6), wodurch der Eindruck entstand, dass die Zellen das Organoid auskleiden und ein Lumen in ihrer Mitte bilden.

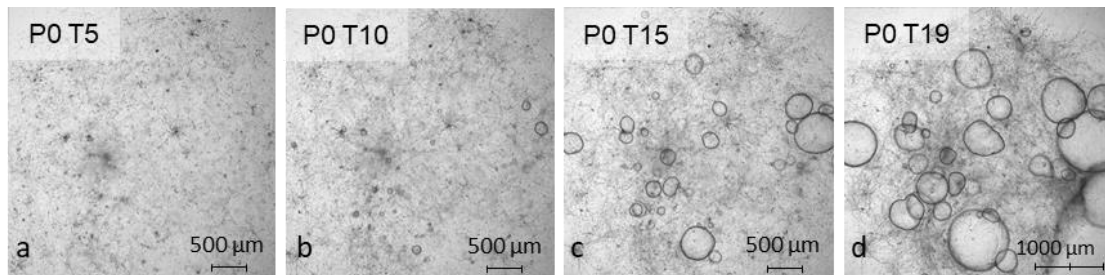


Abbildung 6: Wachstumsverlauf der Linie #Abort_04 an Passage 0 (P0)

Maßstab 500 µm (a-c) und 1000 µm (d), a) Tag 5 (T5), b) Tag 10 (T10), c) Tag 15 (T15), d) Tag 19 (T19)
 Die kugelförmig wachsenden Strukturen entsprechen Organoiden. Sie sind an ihrem dunklen Rand und dem hellen Zentrum erkennbar. Ihre Größe schreitet in individueller Geschwindigkeit voran, erreicht Durchmesser bis zu 1000 µm. Das netzartige Geflecht innerhalb des Tropfens entspricht dem Wachstum von Fibroblasten, welches vor allem am Rand der Bilder gut zu identifizieren ist (vgl. Abb. 9). Mit fortschreitender Zeit ist zu erkennen, wie der Rand des Tropfens zusammengezogen wird.

Aus den glandulären Zellverbänden bildeten sich zügiger Organoide als aus Einzelzellen. Nach ca. sieben Tagen hatten die Organoide durchschnittlich eine Größe von 100 µm bis zu 500 µm und konnten Größen bis zu 1000 µm erreichen (Abb. 6). Organoide mit einer Größe bis 199 µm werden fortan als klein und Organoide ≥ 200 µm als groß definiert. Ihr Wachstum innerhalb der Kultur schritt in individueller Geschwindigkeit voran. Zu beobachten war, dass große Organoide oftmals aus glandulären Zellverbänden entstanden und kleine Organoide meist aus Einzelzellen. Nach 7-10 Tagen wurde die Kultur in der Regel passagiert (vgl. Kap. 2.4.3). Der optimale Zeitpunkt dafür war variabel, sodass in manchen Fällen die Notwendigkeit bestand den Zeitpunkt nach vorne oder hinten zu verschieben. Darauf einflussnehmende Größen waren die Form der Organoide, die initiale Zellzahl, das Vorhandensein von Bodenwachstum, sowie die Stabilität des Matrixtropfens. Die hier genannten Eigenschaften werden im Weiteren eingehender beleuchtet.

Form:

Die Gestalt der Organoide entsprach einer zystischen Form. Ihr Durchmesser nahm mit der Zeit zu und stagnierte ab einem individuellen Zeitpunkt. Statt eines weiteren Wachstums waren Faltungen und ein Formverlust der Organoide zu beobachten (Abb. 7). Bei diesem Prozess schienen die Organoide

lichtmikroskopisch dunkler zu werden. War eine solche Entwicklung zu beobachten, wurde die Kultur zeitnah passagiert.

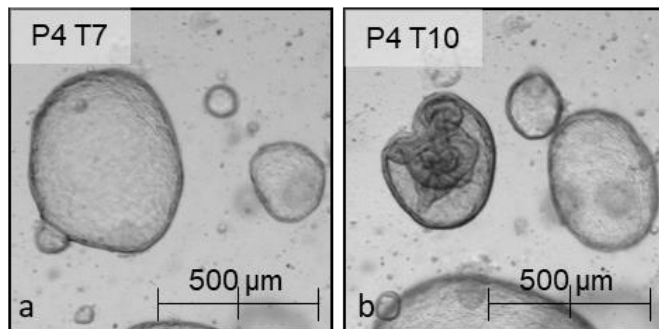


Abbildung 7: Wachstum und Alterung von Organoiden am Beispiel der Linie #Desc_02

Maßstab 500 µm, a) Passage 4 Tag 7 (P4 T7). Abgebildet sind drei Organoide unterschiedlicher Größe b) Passage 4 Tag 10 (P4 T10). Während das mittlere und rechte Organoid in ihrer Größe zugenommen haben, hat sich das linke Organoid eingefaltet. Die Faltung ist vom linken oberen Quadranten ausgehend und als dunkle Verdichtung innerhalb des Organoids erkennbar. Es wurde als Anzeichen für die Alterung des Organoids gewertet.

Zellzahl:

Der Matrigeltropfen bot den Organoiden nur einen begrenzten Raum zur Entfaltung. Je mehr Zellen zu Beginn eingesetzt wurden, desto früher war die Kapazität im Tropfen erschöpft und kein weiteres Wachstum mehr möglich. Das hatte zur Folge, dass nicht das volle Potenzial ausgeschöpft wurde und die Kultur trotz kleiner Organoide passagiert werden musste. Wurden wiederum zu wenig Zellen eingesetzt konnte ein Wachstum von Organoiden ausbleiben, da nicht ausreichend Zellen für ihre Bildung vorhanden waren. Das Einschätzen der richtigen Menge stellte für die erfolgreiche Kultivierung insofern eine Fehlerquelle dar.

Bodenwachstum:

In einigen Organoidkulturen war das Absinken der Zellen auf den Grund des Tropfens festzustellen. Infolgedessen wuchsen die Zellen am Boden der Kulturplatte (Abb. 8). Dadurch verloren sie ihre dreidimensionale Struktur und entsprachen nicht mehr dem angestrebten 3D-Modell. Dies stellte ein Problem der Organoidkultivierung dar. Durch das Passagieren war es möglich das dreidimensionale Wachstum wiederzuerlangen. Dies hatte zur Folge, dass die

Kultur zu einem früheren Zeitpunkt passagiert werden musste. Dieses Problem war zu Beginn in allen Ansätzen anzutreffen.

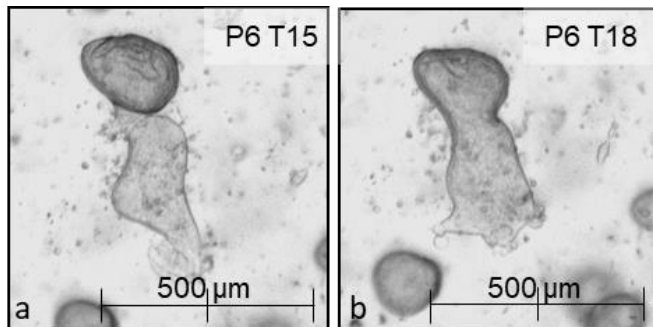


Abbildung 8: Bodenwachstum und Aufbruch der dreidimensionalen Architektur eines Organoids am Beispiel der Linie #Myo_04

Maßstab 500 µm a) Passage 6 Tag 15 (P6 T15). In der Bildmitte ist eine flächig wachsende Struktur mit einem darüber liegenden intakten Organoid zu erkennen, b) Passage 6 Tag 18 (P6 T18) die flächige Struktur und das Organoid haben sich verbunden. Die kugelförmige Struktur des Organoids ist aufgebrochen und geht fließend in das flächige Wachstum über.

Fibroblasten:

Durch die Präparation der Gewebeproben enthielt der Zellverdau unter anderem Bindegewebszellen wie Fibroblasten. In Kultur wuchsen sie adhärent am Boden des Matrigeltropfens (Abb. 9). Sie bildeten mit ihren Fortsätzen ein sich durchziehendes Netz durch den Tropfen und waren in der Lage zu kontrahieren. Durch diese Eigenschaften war der Tropfen gefährdet sich vom Boden der Wellplatte abzulösen, instabil zu werden oder zusammengezogen zu werden. Ein adäquates Wachstum der Organoide konnte damit nicht mehr gewährleistet werden. Dieses Problem war insbesondere in den Primäransätzen vorhanden.

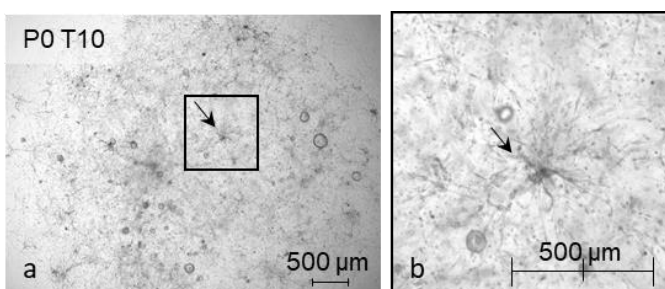


Abbildung 9: Wachstum von Fibroblasten innerhalb einer Organoidkultur

(#Abort_04), Pfeile zeigen auf einen Fibroblasten, Maßstab 500 µm, a) Übersichtsbild des Matrixtropfens an Passage 0 Tag 10 (P0 T10). Zu erkennen sind sphärische Organoide, sowie ein zartes, flächiges Netz, welches sich durch den gesamten Tropfen zieht. Das Quadrat entspricht dem vergrößerten Ausschnitt, b) vergrößertes Ausschnitt, zentral abgebildet ist ein Fibroblast mit den charakteristischen Fortsätzen, welche ihm die Vernetzung mit anderen Fibroblasten ermöglichen

Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine Optimierung des vorgestellten Organoidmodells angestrebt. Die Ergebnisse dessen werden in den einzelnen Unterkapiteln behandelt.

3.2.2 Prämenopause

3.2.2.1 Uterus myomatosus

Das Endometrium der Diagnose Uterus myomatosus ist funktionell, nicht aber pathophysiologisch betroffen und wird stellvertretend als physiologisches Endometrium betrachtet. Das Organoidmodell dieses Endometriums soll den physiologischen Aufbau von Endometrium-Organoiden nachbilden.

Die Verarbeitung der Gewebestücke, sowie der initiale Ansatz der Organoidkultur entsprach dem in Kap. 3.2.1 beschriebenen Aufbau.

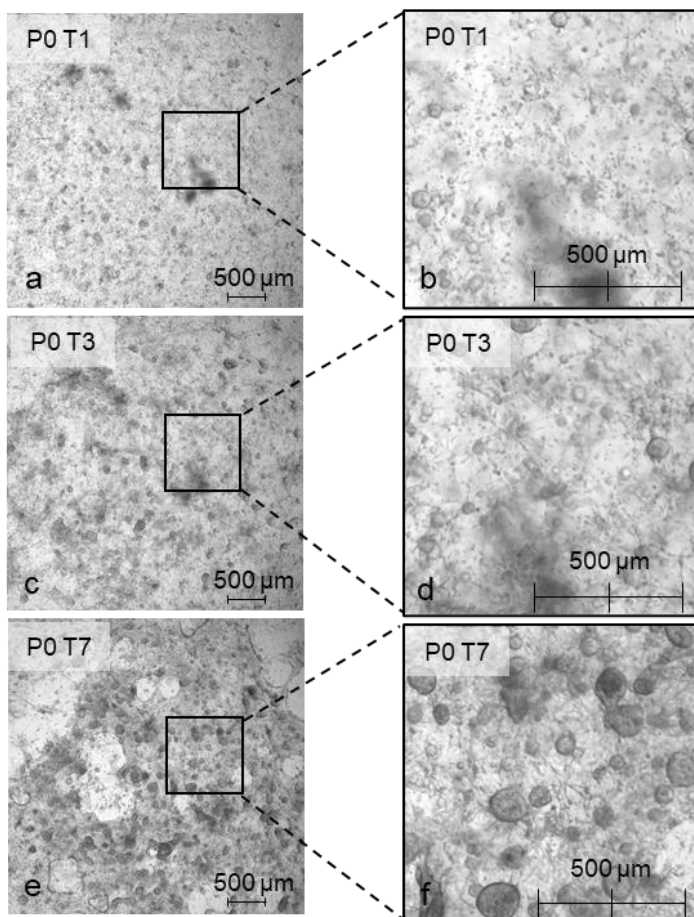


Abbildung 10: Wachstumsverlauf der Organoidlinie #Myo_02

Passage 0 (P0) in Medium 0 mit vergrößertem Ausschnitt, Maßstab jeweils 500µm

a) Tag 1 (T1), b) Ausschnitt T1, c) Tag 3 (T3), d) Ausschnitt T3, e) Tag 7 (T7), f) Ausschnitt T7

Im Primäransatz (Abb. 10) waren Einzelzellen und glanduläre Formationen erkennbar. Aus diesen entwickelten sich bereits nach 24 Stunden erste kleine Organoide. Sie bildeten zystische Strukturen, welche einen dunklen Rand und ein helles Zentrum besaßen. Ihr Durchmesser nahm stetig zu und auch über weitere Passagen blieb die Form und das Wachstum stabil (vgl. Abb. 11 Passage 7).

Wie in Kap 3.2.1 ausführlicher erläutert, waren Schwierigkeiten bei der Kultivierung der Organoide vorhanden. Dies beinhaltete u.a. das Wachstum von Fibroblasten in der Kultur. Diese hinderten die Organoide aufgrund der Destabilisation der Matrix in ihrem Wachstum. Zu Beginn einer Zelllinie waren viele Fibroblasten vorhanden. Ihre Zahl verringerte sich durch das Passagieren, da bei diesem Prozess alle Zellbestandteile ausgedünnt wurden. Eine weitere Reduktion der Fibroblasten konnte durch das vorsichtige Ablösen des Matrigeltropfens vom Boden der Vertiefung erreicht werden. Aufgrund des adhärenen Wachstums verblieb dadurch ein Teil der Fibroblasten am Boden haften und konnte von der restlichen Kultur getrennt werden.

Weiterhin zeigten sich bei der Beobachtung der Organoide folgende Entwicklungen. Mit zunehmenden Passagen entstanden einzelne große ($\geq 200 \mu\text{m}$) und wenige kleine Organoide ($\leq 199 \mu\text{m}$). Zudem wurde in einem Verhältnis 1:2 gesplittet, um ein ausreichendes Wachstum zu gewährleisten. Es entstand der Eindruck, dass die Gesamtzellzahl im Tropfen nur geringfügig zunahm. Hinzu kam, dass Zellen sich wiederholt absetzten und am Boden wuchsen. Insgesamt schienen die Kulturbedingungen für die Organoide nicht optimal zu sein. Mit dem Ziel die Expansionsrate zu erhöhen und das Bodenwachstum zu verringern wurde der Einfluss verschiedener Kulturmedien auf das Wachstum untersucht (siehe Kap 2.8.1). Tabelle 7 gibt einen Überblick über die eingesetzten Nährmedien und die variierenden Faktoren.

Tabelle 7: Zusammensetzung der getesteten Nährmedien 0, A, B und C bezogen auf die unterschiedlichen Wachstumsfaktoren.

Konzentrationsangaben beziehen sich auf die finale Konzentration im Nährmedium. Das Basismedium bzw. die vollständige Zusammensetzung sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Nährmedium Wachstumsfaktoren	Medium 0	Medium A	Medium B	Medium C
	Basismedium +			
L-WRN CM	50%	50%	-	-
R-Spondin CM	-	-	10%	10%
Noggin	-	-	100 ng/ml	100 ng/ml
Nicotinamid	10 nM	10 nM	10 nM	1 mM
Y-27632	5 μ M	5 μ M	5 μ M	9 μ M
HGF	50 ng/ml	50 ng/ml	50 ng/ml	-
SB202190	500 nM	-	-	-

Die Nährmedien unterschieden sich vor allem im Hinblick auf das darin enthaltene konditionierte Medium (CM) und wichen geringfügig in der Konzentration der Wachstumsfaktoren ab. Insgesamt wurden vier Nährmedien getestet. Medium 0 enthielt 50% L-WRN konditioniertes Medium (Wnt3a, R-Spondin und Noggin + 10% FCS) und entsprach damit dem bisher verwendeten Nährmedium. Medium A unterschied sich bis auf das Fehlen des Faktors SB202190 nicht von Medium 0. Medium B und C enthielten jeweils 10% R-Spondin konditioniertes Medium und rekombinantes Noggin anstatt des L-WRN konditioniertem Medium. Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 11 dargestellt. Darin ist der Wachstumsverlauf der Zelllinie #Myo_02 an Tag 0 und 10 abgebildet.

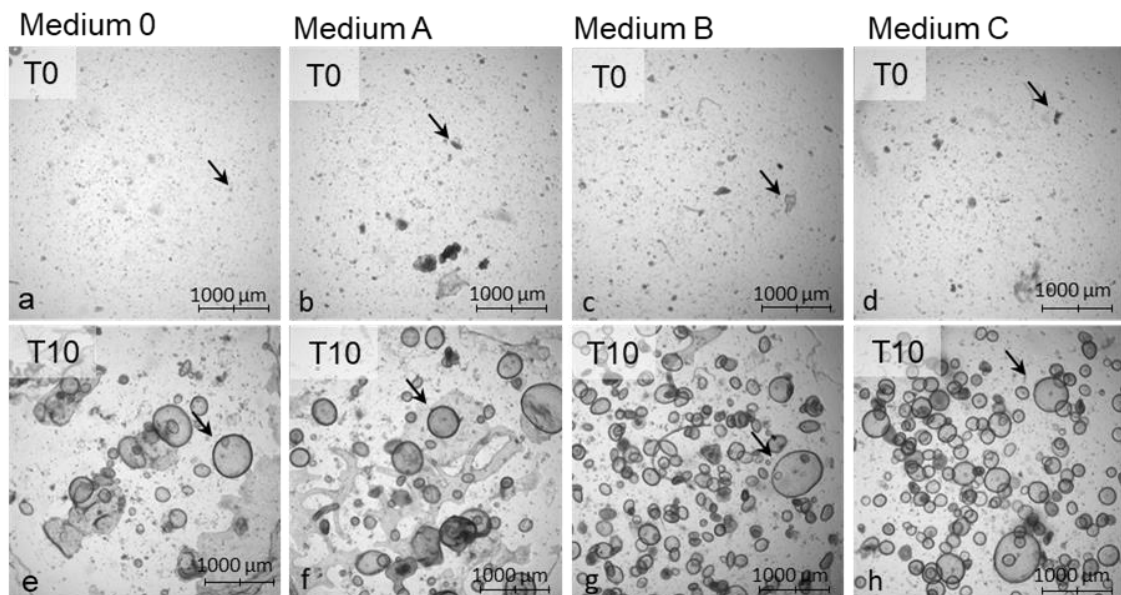


Abbildung 11: Wachstum der Linie #Myo_02 in verschiedenen Nährmedien (0, A, B, C)

Aufnahmen an Passage 7 Tag 0 (T0) und Tag 10 (T10), Pfeile markieren Organoide und ihre Vorläuferstruktur, Maßstab 1000 µm

a) T0 Medium 0, b) T0 Medium A, c) T0 Medium B, d) T0 Medium C, e) T10 Medium 0, f) T10 Medium A, g) T10 Medium B, h) T10 Medium C

Die initiale Zelldichte der Versuchslinien war homogen (Abb. 11 a-d). Nach 10 Tagen sind in allen vier Versuchslinien sowohl große ($\geq 200 \mu\text{m}$) als auch kleine ($\leq 199 \mu\text{m}$) Organoide gewachsen (Abb. 11 e-h). Aus den größeren Zellbruchstücken an Tag 0 bildeten sich die größten Organoide (Abb.11 Pfeile). In den Nährmedien 0 und A (Abb. 11e, f) ist das Wachstum am Boden der Kulturplatte deutlich als flächige Ausziehungen zu erkennen. Im Vergleich zu den anderen Versuchslinien war diese Eigenschaft bei diesen beiden Linien am stärksten ausgeprägt, sie ist aber auch in Medium B (Abb. 11g) in geringem Maße am oberen Bildrand zu erkennen. Insgesamt ähnelt sich das Wachstumsverhalten in Medium 0 mit Medium A, sowie das Wachstumsverhalten in Medium B mit Medium C. Zudem scheint die Gesamtzahl der Organoide in Medium A und 0 (Abb. 11e, f) optisch geringer zu sein als in Medium B und C (Abb. g, h). Es entsteht der Eindruck, dass aus den Zellen, die Medium B bzw. C erhalten haben mehr Organoide entstanden sind. Entsprechend Kapitel 2.8.1 wurden die Organoide ausgezählt und die durchschnittlich vorhandene Anzahl an Organoiden pro Vertiefung für die Nährmedien A, B und C ausgewertet (Tabelle 8).

Tabelle 8: Durchschnittswerte der Anzahl Organoide pro Matrixtropfen der Linie #Myo_02

prozentualer Anteil in Klammern, Werte gerundet

Größe in μm \ / \ \emptyset Anzahl Organoide	Medium A	Medium B	Medium C
$\geq 100-199 \mu\text{m}$	37,5 (62,5%)	101,5 (61,3%)	94 (60,5%)
$\geq 200-299 \mu\text{m}$	17 (28,3%)	53,5 (32,3%)	53 (34,1%)
$\geq 300 \mu\text{m}$	5,5 (9,2%)	10,5 (6,3%)	8,5 (5,5%)
Total	60 (100%)	165,5 (100%)	155,5 (100%)

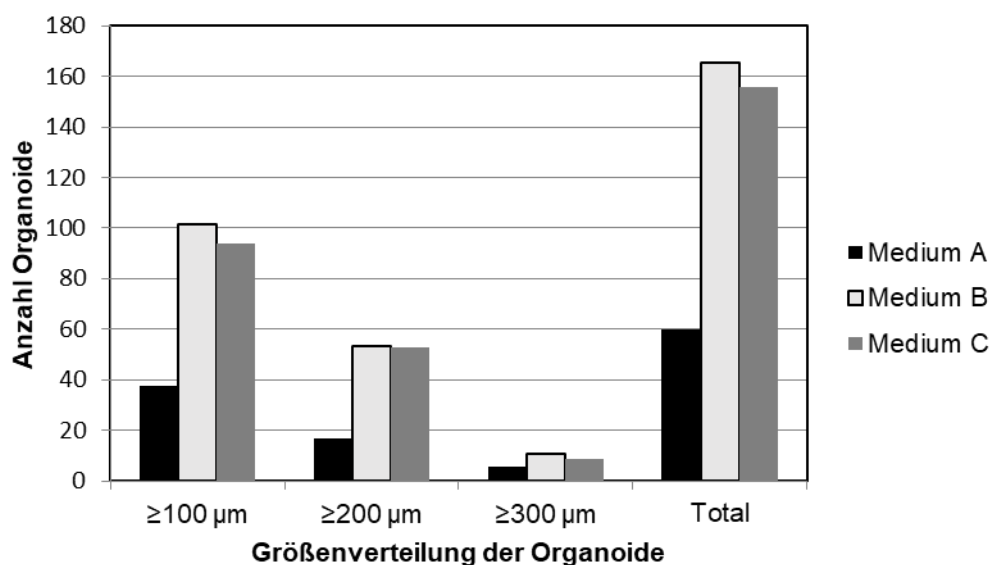


Abbildung 12: Anzahl Organoide in Abhängigkeit vom verwendeten Nährmedium

Balkendiagramm: x-Achse: durchschnittliche Anzahl der Organoide pro Vertiefung, Y-Achse Größenverteilung der Organoide in Kategorien und Gesamtzahl, Werte basierend auf Tabelle 8

Die Anzahl der Organoide in Medium A betrug im Durchschnitt 60 Organoide pro Matrixtropfen. In Medium B und C hingegen befanden sich jeweils 165,5 und 155,5 Organoide pro Tropfen. Im Vergleich zu Medium A entspricht das einer Steigerung von ca. 150%. Es ist in allen Größenkategorien der Nährmedien B und C eine größere Zahl an Organoiden gewachsen als in Medium A (Abb. 12). Die Größenverteilung war in allen Nährmedien ähnlich.

Resultate dieses Versuches sind, dass prinzipiell alle drei Nährmedien für die Kultivierung von Organoiden aus Endometrium geeignet sind. Unabhängig vom Nährmedium bildeten sich Organoide und nahmen in ihrer Größe zu. Weiterhin bestätigte sich der Eindruck, dass in den mit Nährmedien B und C kultivierten

Tropfen mehr Organoide gewachsen sind. Ein Unterschied in der Größenverteilung zwischen den Nährmedien konnte nicht festgestellt werden.

Aufgrund des ähnlichen Wachstumsverhaltens der Organoide in Medium 0 mit A bzw. B mit C wurde geschlossen, dass die Ursache der beobachteten Wachstumsunterschiede möglicherweise auf das konditionierte Medium zurückzuführen ist. Es wurde herausgearbeitet, dass ein wesentlicher Unterschied zwischen den konditionierten Medien der Einsatz von FCS war. Dieser wurde zur Herstellung von L-WRN konditioniertem Medium verwendet.

Um den Einfluss von FCS im Nährmedium zu untersuchen wurde der Folgeversuch (vgl. Kap 2.8.2) durchgeführt (Abb. 13). Verwendet wurden die Nährmedien A, B und B*, welches 5% FCS enthielt.

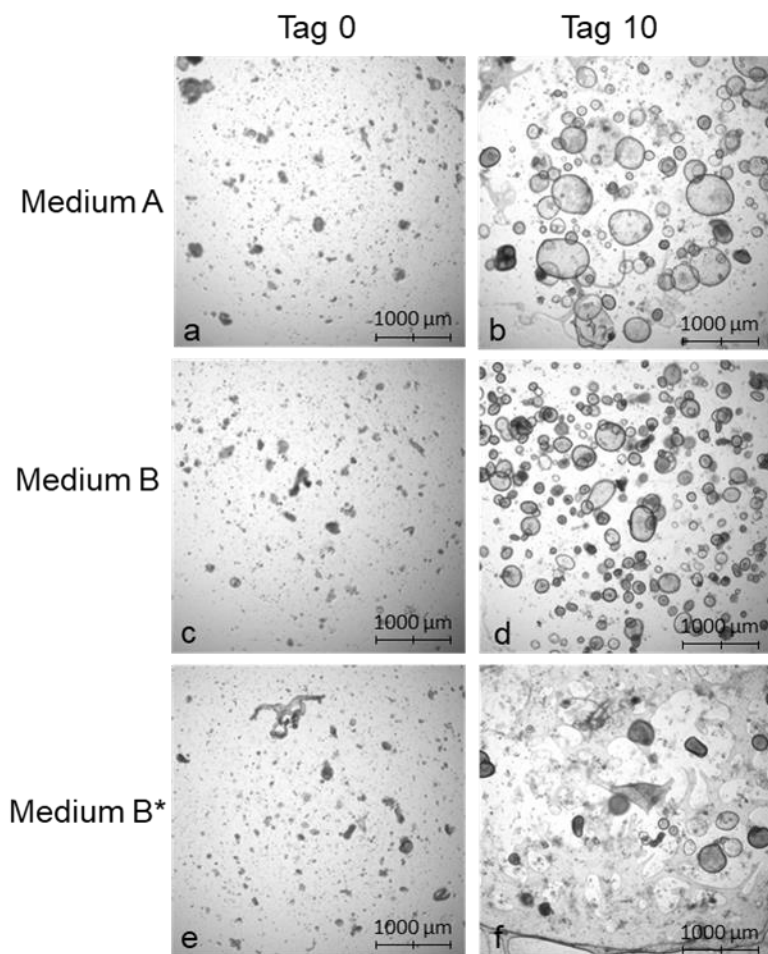


Abbildung 13: Wachstum der Linie #Myo_02 in verschiedenen Nährmedien (A, B, B*)

Aufnahmen an Passage 8 Tag 0 (T0) und Tag 10 (T10), Maßstab 1000 μ m

a) T0 Medium A, b) T10 Medium A, c) T0 Medium B, d) T10 Medium B, e) T0 Medium B* (FCS), f) T10 Medium B* (FCS)

Bei einer initial homogen verteilten Zelldichte waren in den drei Versuchslinien größere Zellformationen, sowie kleine Einzelzellen zu beobachten (Abb. 13a, c, e). Insgesamt bildeten sich in allen Nährmedien Organoide (Abb. 13b, d, f). Das Wachstum der Organoide in Abb. 13b und d spiegelt die Ergebnisse der Abb. 11f und g wider. Zellen, die Medium B erhielten, bildeten mehr Organoide aus als Zellen mit Medium A. Wie im Vorversuch war in Medium B wenig Bodenwachstum von Organoiden zu beobachten, während diese Problematik in Medium A wieder hervortrat. Das Wachstum der Organoide in Medium B* unterschied sich wiederum deutlich von den Kontrollen A und B. Die Organoide erreichten eine vergleichbare Größe, waren aber insgesamt weniger (Abb. 13f). Zudem war das Ausmaß des Bodenwachstums ausgeprägter als bisher in

Medium A beobachtet. Im Vergleich aller drei Ansätze war das Medium B* nachteiliger als die anderen beiden Nährmedien.

Während in Medium B Organoide in großer Zahl vorhanden waren, ergab die Zugabe von FCS zu diesem Medium (B*) eine geringere Ausbildung von Organoiden, sowie ein vermehrtes Bodenwachstum. Daraus schließend, dass FCS eine nachteilige Wirkung auf das Wachstum von Organoiden besitzt, wurde bei der Herstellung von L-WRN CM auf FCS verzichtet.

Dieses wurde in einem neuen Medium A* eingesetzt und seine Wirksamkeit in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht (vgl. Kap. 2.8.3).

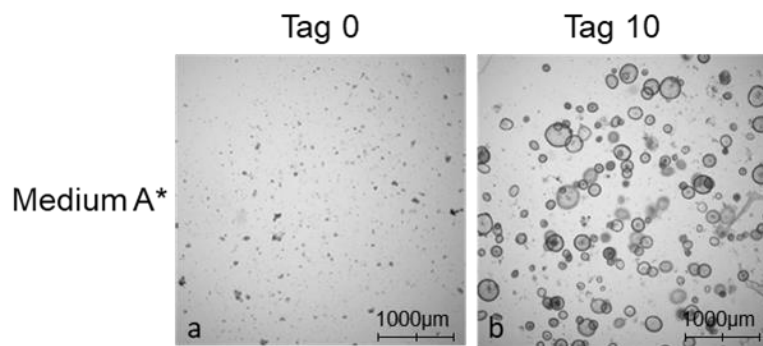


Abbildung 14: Wachstum der Organoidkultur #Myo_02 in Nährmedium A*

Passage 8, Einsatz des L-WRN CM (0% FCS) in 10%iger Konzentration, Maßstab 1000 µm
a) Tag 0 (T0), b) Tag 10 (T10)

Zwischen den untersuchten Konzentrationen konnte kein Unterschied im Hinblick auf Anzahl oder Wachstum der Organoide festgestellt werden, sodass es in 10% Konzentration im Nährmedium eingesetzt wurde.

Das Medium A* erwies sich als wirksames Nährmedium zur Kultivierung von Organoiden (Abb. 14). Nach 10 Tagen bildeten sich zahlreiche große wie kleine Organoide. Es wurde weiterhin das Wachstum am Boden beobachtet, welches verglichen mit dem vorangegangenen Medium A jedoch in geringerer Ausprägung vorlag.

Die durchgeführten Mediumversuche basierten auf den Protokollen zweier Arbeitsgruppen (Turco *et al.*, 2017, Boretto *et al.*, 2017). Im Zuge der Mediumversuche wurde ein weiteres Protokoll veröffentlicht und unter Berücksichtigung dessen das finale Nährmedium E und EC festgelegt (Boretto *et*

al., 2019). Das initial verwendete Nährmedium 0 wurde daraufhin von Medium E abgelöst.

3.2.2.2 Adenomyosis uteri

Verwendet wurde Endometrium, welches dem Myometrium auflag und sich nicht innerhalb des Myometriums befand. Das Gewebe wurde protokollgerecht verarbeitet und dem Organoid-Setup gleich angesetzt. Es entstanden große wie kleine Organoide mit kugelförmiger Struktur. Die Organoide besaßen lichtmikroskopisch einen prominenten Rand und ein helles Zentrum (Abb. 20a). Ihre Form blieb über die Passagen unverändert. Auch bei dieser Entität waren die vorangegangenen Schwierigkeiten wie dem Bodenwachstum bei der Kultivierung vorhanden. Basierend auf den Ergebnissen der anderen Entitäten wurde auf das Nährmedium E umgestellt, worauf die Kulturen ansprachen. Das Wachstum am Boden konnte reduziert werden und das Verhältnis beim Splitten von initial 1:2 auf bis zu 1:5 verringert werden.

3.2.3 Postmenopause

3.2.3.1 Atrophes Endometrium

Das Endometrium und damit das entstandene Zellpellet dieser Gewebeproben war entsprechend dem Hormonstatus dünn. Erste Versuche atrophes Endometrium zu kultivieren scheiterten. Nach Umstellung des Nährmediums auf Medium E mit 10% L-WRN (vgl. Kap. 3.2.2.1) gelang es auch diese Entität in einer Organoidkultur darzustellen (Abb. 7, 20b).

Die Organoide bildeten eine homogene zystische Grundform. Lichtmikroskopisch war ein prominenter, dunkler Rand von einem hellen Zentrum abzugrenzen. Die Organoide zeigten keine Auffälligkeiten in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit oder im Aufbau im Vergleich zu prämenopausalem Gewebe (vgl. Abb. 20).

3.2.4 Dezidua

3.2.4.1 Interruptio

Die verwendeten Gewebeproben waren Abradate und entsprachen keinem festen Gewebeverbund. Makroskopisch war die Dezidua von anderen



Abbildung 15:
Gewebeprobe
eines Abradates,
Maßstab 1 cm

Gewebeanteilen nicht sicher zu unterscheiden (Abb. 15). Das Gewebe war weich, solide Anteile waren in geringer Größe vorhanden. Aus den Proben wurden große Zellpellets gewonnen, die Matrixtropfen waren dicht mit Zellen besiedelt. Darunter befanden sich zahlreiche Fibroblasten, welche bei dieser Entität stark vertreten waren. In Kultur bildeten sich kugelförmige Organoiden mit lichtmikroskopisch dunkel hervorgehobenem Rand und einer zentralen Aufhellung. Ihr

Aussehen blieb mit jeder Passage konstant (Abb. 16).

Die Problematik des Bodenwachstums, sowie die niedrige Expansionsrate waren in ähnlichem Maße wie bei Organoiden aus prä- und postmenopausalem Gewebe vorhanden. Im Rahmen des in Kapitel 2.8.1 beschriebenen Versuches wurde das Wachstum der Linie #Inter_03 mit den verschiedenen Nährmedien A, B und C untersucht (Abb. 16).

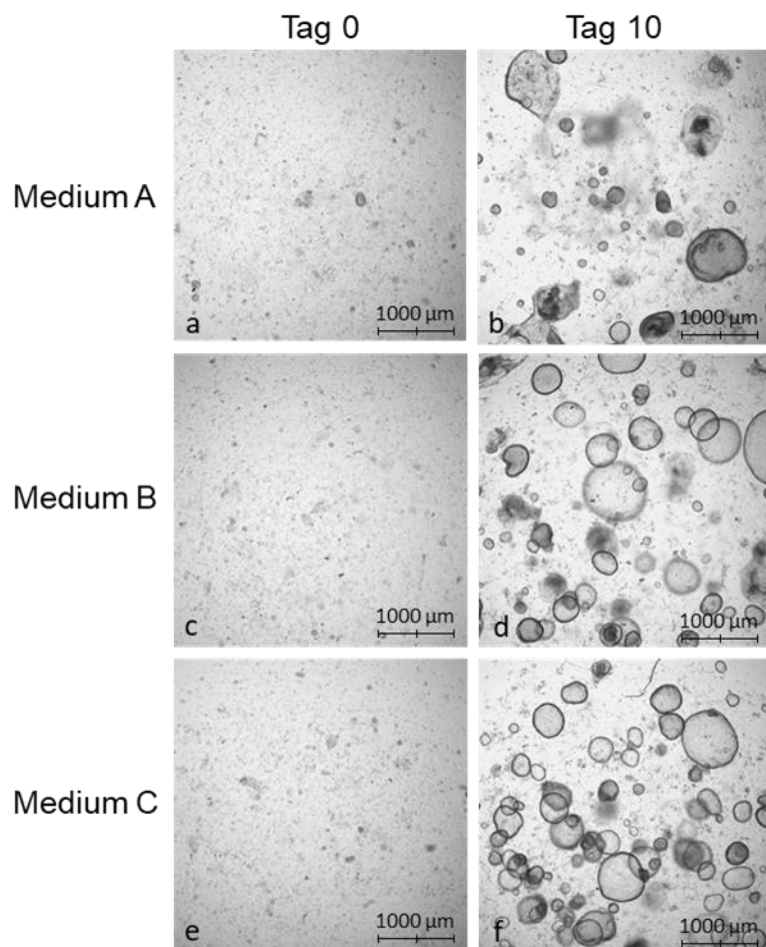


Abbildung 16: Wachstum der Linie #Inter_03 in verschiedenen Nährmedien (A, B, C)

Aufnahmen an Passage 2 Tag 0 (T0) und Tag 10 (T10), Maßstab 1000 µm

a) T0 Medium A, b) T10 Medium A, c) T0 Medium B, d) T10 Medium B, e) T0 Medium C, f) T10 Medium C

In jedem eingesetzten Nährmedium wurde die Bildung von Organoiden beobachtet (Abb. 16). Zellen, die mit Medium B bzw. C behandelt wurden, schienen eine höhere Anzahl von Organoiden zu bilden. Die Eigenschaft des Bodenwachstums war in Medium A, sowie in Medium B in reduzierter Form zu finden (Abb. 16)

Im Durchschnitt entstanden 31 Organoide in Nährmedium A, 64 in Medium B und 91,5 in Medium C (Tabelle 9). Es konnte kein Vorteil eines Nährmediums hinsichtlich der Größe der Organoide festgestellt werden.

Tabelle 9: Durchschnittswerte der Anzahl Organoide pro Matrixtropfen der Linie #Inter_03

prozentualer Anteil in Klammern, Werte gerundet

Größe in μm \ / \ \varnothing Anzahl Organoide	Medium A	Medium B	Medium C
$\geq 100-199 \mu\text{m}$	18 (58,1%)	32,5 (50,8%)	49,5 (54,1%)
$\geq 200-299 \mu\text{m}$	9,5 (30,7%)	18 (28,1%)	23,5 (25,7%)
$\geq 300 \mu\text{m}$	3,5 (11,3%)	13,5 (21,1%)	18,5 (20,2%)
Total	31 (100%)	64 (100%)	91,5 (100%)

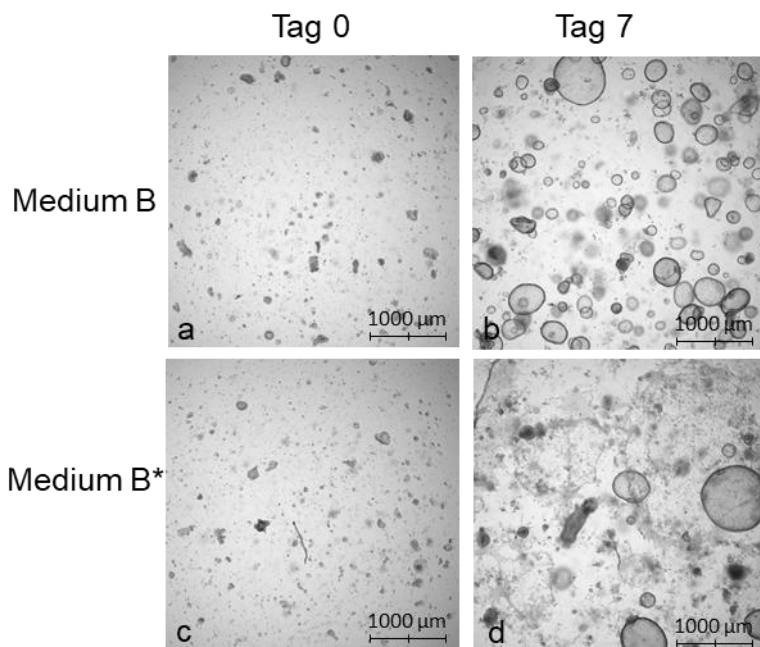


Abbildung 17 Wachstum der Linie #Inter_03 in verschiedenen Nährmedien (B, B*)

Aufnahmen an Passage 3 Tag 0 (T0) und Tag 7 (T7), Maßstab 1000 μm

a) T0 Medium B, b) T7 Medium B, c) T0 Medium B* (FCS), d) T7 Medium B* (FCS)

Im weiteren Verlauf wurde das Wachstum der Linie #Inter_03 mit den Medien B und B* untersucht. Auch bei dieser Entität konnte ein nachteiligeres Wachstum durch eine Zugabe von FCS in Medium B* erreicht werden (Abb. 17). Nach finaler Umstellung des Nährmediums auf Medium E zeigten die Linien eine höhere Expansionsrate, sowie ein reduziertes Wachstum am Boden.

3.2.4.2 Abort

Makroskopisch glichen die Gewebeprobe den Abradaten bei Interruptio (Abb. 15). Die Dezidua konnte nicht von anderen Gewebeanteilen abgegrenzt werden, sodass die gesamte Gewebeprobe verarbeitet wurde. Das Gewebe war von weicher Konsistenz mit kleinen soliden Anteilen.

Im zellreichen Primäransatz waren nach 24 Stunden erste Organoide erkennbar. Diese waren von einer zystischen Gestalt mit einem dunklen abgrenzbaren Rand und einem hellen Zentrum (Abb. 18). Geschuldet der unzureichenden Abgrenzung der Gewebeanteile enthielt die Kultur viele Fibroblasten. Ihre Anzahl und die damit verbundene Problematik stand während der ersten Passagen im Vordergrund. Mit zunehmenden Passagen trat dieses Problem in den Hintergrund und die Problematik der Expansionszahl, sowie das Wachstum am Boden traten hervor.

Ergänzend wurden wie in Kapitel 2.8.1 die Nährmedien A, B und C für diese Entität am Beispiel der Linie #Abort_02 untersucht (Abb. 18).

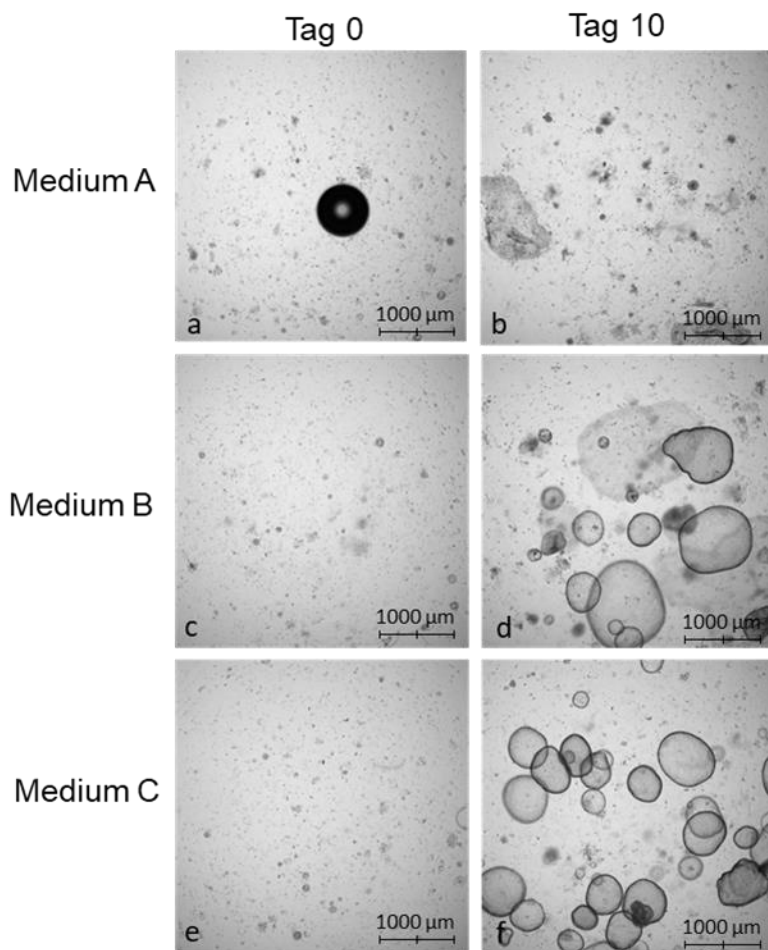


Abbildung 18: Wachstum der Linie #Abort_02 in verschiedenen Nährmedien (A, B, C)

Aufnahmen an Passage 2 Tag 0 (T0) und Tag 10 (T10), Maßstab 1000 µm

a) T0 Medium A mit zentraler Luftblase, b) T10 Medium A, c) T0 Medium B, d) T10 Medium B, e) T0 Medium C, f) T10 Medium C

In allen verwendeten Nährmedien A - C wurde die Entstehung von Organoiden festgestellt. Die Organoiden in Medium A waren deutlich kleiner als die Organoiden in Medium B und C und zusätzlich in geringerer Zahl vorhanden (Abb. 18). Sowohl in Medium A als auch in Medium B konnte das Bodenwachstum von Organoiden beobachtet werden (Abb. 18) Durchschnittlich wurden in Medium A 13 Organoiden, in Medium B 20 und Medium C 35 gezählt (Tabelle 10). In diesem Fall hatten die Nährmedien B und C mit einem Anteil von ca. 33% bzw. 48% im Gegensatz zu Medium A mit 0% einen deutlich höheren Anteil an großen Organoiden (Tab. 10).

Tabelle 10: Durchschnittswerte der Anzahl Organoide pro Matrixtropfen der Linie #Abort_02

prozentualer Anteil in Klammern, Werte gerundet

Größe in μm \ / \ \varnothing Anzahl Organoide	Medium A	Medium B	Medium C
$\geq 100-199 \mu\text{m}$	12 (92,3%)	8,5 (42,5%)	11(31,0%)
$\geq 200- 299 \mu\text{m}$	1 (7,6%)	5 (25,0%)	7,5 (21,1%)
$\geq 300 \mu\text{m}$	0 (0%)	6,5 (32,5%)	17 (47,9%)
Total	13 (100%)	20 (100%)	35,5 (100%)

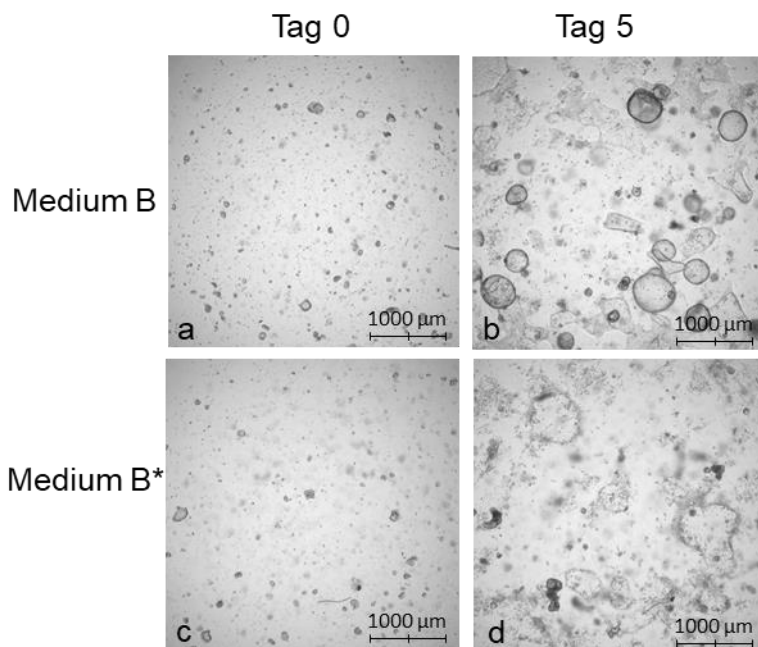


Abbildung 19 Wachstum der Linie #Abort_02 in verschiedenen Nährmedien (B, B*)

Aufnahmen an Passage 3 Tag 0 (T0) und Tag 5 (T5), Maßstab 1000 μm

a) T0 Medium B, b) T5 Medium B, c) T0 Medium B* (FCS), d) T5 Medium B* (FCS)

Die Untersuchung von Medium B* im Rahmen des Versuches 2.8.2 ergab eine verminderte Bildung von Organoiden, sowie einem erhöhten Aufkommen von Bodenwachstum (Abb. 19). Dies spiegelte die Ergebnisse anderer untersuchter Entitäten wider (Abb. 13, 17). Nach Umstellung des Nährmediums auf Medium E konnte optimiertes Wachstum im Hinblick auf Expansionsrate und Bodenwachstum erreicht werden.

3.2.5 Gegenüberstellung der benignen Entitäten

Von 17 angesetzten Zellproben wurden 15 erfolgreich kultiviert. Nach Umstellung des Nährmediums wurde die Zahl der Passagen lediglich durch den begrenzten Testzeitraum definiert. Innerhalb von diesem ist keine absehbare Begrenzung der Passagenzahl aufgetreten.

Organoide endometrialen Ursprungs organisieren sich selbstständig zu zystischen Zellverbänden. Basierend auf den untersuchten Entitäten konnten keine Unterschiede in Form, Größe oder Wachstumsverhalten festgestellt werden. Organoiden aus prämenopausalem Gewebe konnten nicht von Organoiden aus postmenopausalem oder dezidualisiertem Endometrium unterschieden werden (Abb. 20).

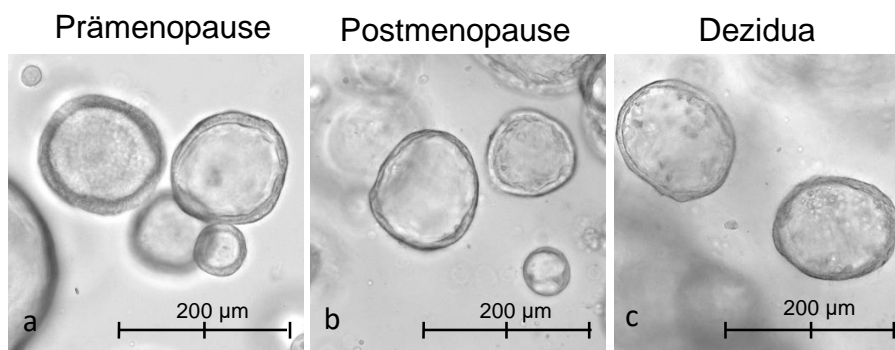


Abbildung 20: Organoiden verschiedener Gewebeproben in Kultur

Maßstab 200 µm, a) Linie #Admyo_01 (Prämenopause) Passage 10 Tag 7 b) Linie #Desc_02 (Postmenopause) Passage 1 Tag 7, c) Linie #Abort_01 (Dezidua) Passage 1 Tag 7

Die Zellen sind auf der Innenseite der Kugeloberfläche lokalisiert und bilden zentral ein Lumen. Die Organoiden variieren in ihrer Größe, wachsen in individueller Geschwindigkeit und ändern ihre Form über die Passagen hinweg nicht (Abb. 20).

3.3 Histopathologische Färbungen

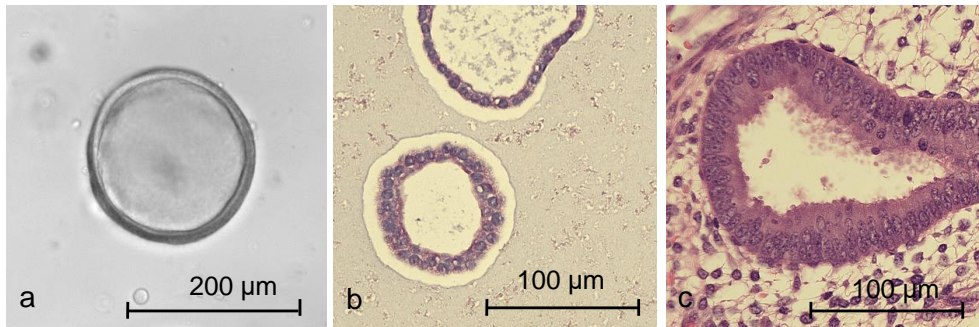


Abbildung 21: Aufbau eines Organoids mit Vergleich zum Originalgewebe der Linie #Myo_02

- a) Organoid der Linie #Myo_02 in Kultur an Passage 8 Tag 7, Maßstab 200 µm
- b) Organoid der Linie #Myo_02, HE-Färbung, Maßstab 100 µm
- c) Ausschnitt des Originalgewebes #Myo_02, HE-Färbung, Maßstab 100 µm. Abgebildet ist ein angeschnittener endometrialer Drüsenausführungsgang umgeben von Stroma.

Die HE-Färbung der Organoide ermöglicht es den histologischen Aufbau der Zellen nachzuvollziehen. Die bläulichen Zellkerne sind gut vom umliegenden rotviolett angefärbten Zytoplasma abzugrenzen (Abb. 21b). Die Zellen innerhalb des Organoids sind in einem einschichtigen isoprismatischen Epithel angeordnet, welches Ähnlichkeit mit einem Drüsenausführungsgang *in vivo* hat (Abb. 21c). Durch den zystischen Aufbau entsteht zentral ein Lumen, welches auch lichtmikroskopisch zu beobachten war (Abb. 21a). Dieses gleicht in gewisser Weise dem Gangsystem exokriner Drüsen. Immunhistochemisch konnte eine nukleäre Expression von PAX 8 in den Zellen der Organoide nachgewiesen werden (Abb. 22).

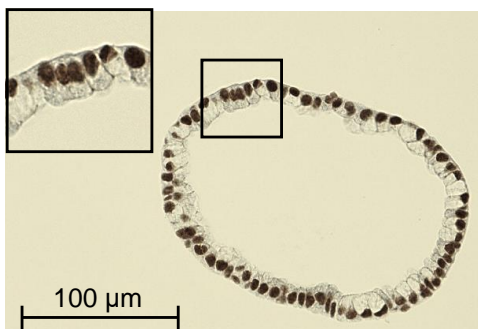


Abbildung 22: PAX8 Färbung eines Organoids am Beispiel der Linie #Abort_01

Maßstab 100 µm, Maßstab des vergrößerten Ausschnitts 50 µm
Die Zellen zeigen ein PAX8-positives nukleäres Expressionsmuster

Die Zielfärbungen der Hormonrezeptoren Östrogen und Progesteron ergaben ein ER-positives und PR-negatives nukleäres Färbemuster der Zellen (Abb. 23).

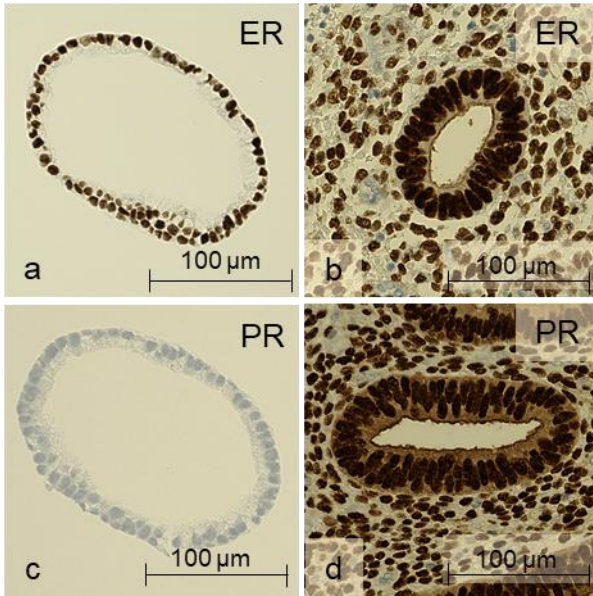


Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung der Hormonrezeptoren ER und PR von Organoiden und Originalgewebe

Östrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR), Maßstab jeweils 100 µm

a) ER-positiv gefärbtes Organoid der Linie #Abort_01

b) Anschnitt eines endometrialen Drüsenausführungsganges mit umliegendem Stroma der Linie #Myo_01, ER-positive Zellexpression

c) PR-negativ gefärbtes Organoid der Linie #Abort_01

d) Anschnitt eines endometrialen Drüsenausführungsganges mit umliegendem Stroma der Linie #Myo_01, PR-positive Zellexpression

3.4 Endometriumkarzinom

3.4.1 Probengewinnung und Verarbeitung

Die Gewebeproben wurden entsprechend Kap 2.4.1 verarbeitet. Statt der Collagenase/Dispase Lösung wurde eine Enzymlösung bestehend aus 50% Collagenase 2 (100 U/µl, Gibco) und 50% Advanced DMEM/F-12 +/+ verwendet. Insgesamt wurden Proben von 14 Patientinnen gesammelt. Davon wurden gezielt 4 Gewebeproben unterschiedlicher Differenzierungsgrade (vgl. Tab. 11 Grading) angesetzt. Es konnten bei 3 Linien organoidartige Strukturen beobachtet werden, aber nur bei 2 Organoidlinien ist ein Wachstum über mehrere Passagen gelungen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Übersicht der angesetzten Gewebeproben aus Endometriumkarzinomen

Altersangaben in Jahren, Grading (G1-3), sowie Diagnose aus vorliegenden Pathologiebefunden. Zu möglichen Endpunkten gehört die erfolgreiche Kultivierung mit anschließendem Einfrieren der Zelllinie (intakte Kultur) oder eine fehlgeschlagene Kultur mit ausbleibendem Wachstum (kein Wachstum).

Linie	Alter	Grading	Diagnose	Endpunkt
#E-Ca_01	67	G1	Endometrioides Adenokarzinom	Kein Wachstum
#E-Ca_02	76	G3	Endometrioides und gemischtes Adenokarzinom	Intakte Kultur
#E-Ca_03	62	G1	Endometrioides Adenokarzinom	Intakte Kultur
#E-Ca_04	63	G2	Endometrioides Adenokarzinom	Kein Wachstum

3.4.2 Organoidkultur

Bei dem Versuch die Zellen der Linie #E-Ca_01 in Medium 0 zu kultivieren, bildeten sich keine als Organoid zu identifizierenden Strukturen. Im Zuge der Mediumoptimierung wurden weitere Karzinomzellen (#E-Ca_02-04) angesetzt und an ihnen verschiedene Nährmedien (Medium A-C) entsprechend dem Versuchsaufbau in Kapitel 2.8.1 getestet. Die Ergebnisse waren uneinheitlich, sodass keine Aussage über ein vorteilhafteres Medium getroffen werden konnte. Als finales Nährmedium wurde das Medium EC (siehe Kap 2.5.2) für alle Linien verwendet, welches auf dem Nährmedium von Boretto *et al.* (2019) basierte.

Die beobachteten Organoid in Medium EC hatten einen zystischen Aufbau mit einem zentralen Lumen, aber auch solide scheinende Anteile (Abb. 24). Bis auf dieses Merkmal konnten keine Unterschiede zum Aufbau und Wachstum physiologischer Organoid festgestellt werden.

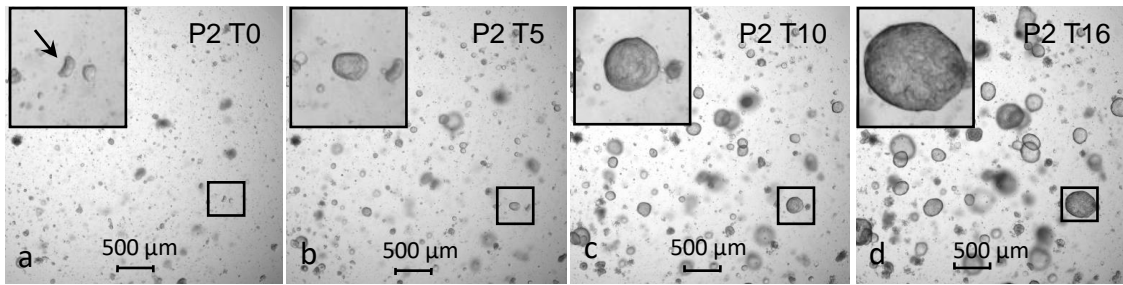


Abbildung 24: Wachstumsverlauf der Endometriumkarzinom-Linie #E-Ca_03

dargestellt ist Passage 2 (P2) in Medium EC mit vergrößertem Ausschnitt, Maßstab 500 µm, Maßstab vergrößerter Ausschnitt 500 µm, a) Tag 0 (T0), der Pfeil deutet auf die initiale Struktur des vergrößert dargestellten Organoids, b) Tag 5 (T5), c) Tag 10 (T10), d) Tag 16 (T16)

3.5 Endometriose

3.5.1 Probengewinnung und Organoidkultur

Aufgrund der geringen Größe werden Endometrioseherde häufig nicht abpräpariert, sondern koaguliert. Diese Umstände erschweren die Gewinnung von Gewebeproben. Daher wurde versucht Zytologieproben (Abb. 25) als

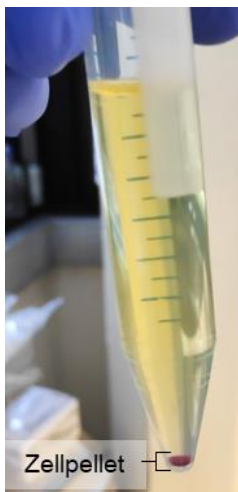


Abbildung 25: Douglaszytologie mit markiertem Zellpellet

Aufgrund der Blutbeimengung hat das Pellet eine rote Farbe.

Ausgangsmaterial zu verwenden. Die Qualität, sowie die Höhe der Zellpellets war aufgrund vieler Einflussfaktoren stark variabel. Sie hing vom Zeitpunkt der Entnahme, von vorangegangenen Untersuchungen, sowie von durchgeführten Manipulationen ab. Eine optimale Zytologieprobe gelingt, wenn sie bei laparoskopischen Eingriffen direkt nach dem Einführen der Trokare erfolgt. Eine vorherige Adhäsiolyse oder scharfe Präparation kann die Zytologieprobe durch Blutbeimengungen „verunreinigen“. Eine vorher durchgeführte Hysteroskopie hat des Weiteren zur Folge, dass Flüssigkeit durch die Eileiter in die Bauchhöhle gelangt. Dadurch wird die Probe verdünnt und die Zellpellets fallen kleiner aus.

Da es sich bei der Probe um eine Zytologie, d.h. Einzelzellen handelt, wurde die enzymatische Zerkleinerung nicht durchgeführt. Die Proben wurden direkt zentrifugiert und eine Lyse der Erythrozyten durchgeführt. Insgesamt wurden sechs Douglaszytologien und eine Gewebeprobe angesetzt

(Tabelle 12). Darunter konnte in 4 Fällen ein eindeutiges Wachstum von Organoiden nachgewiesen werden.

Tabelle 12: Übersicht der angesetzten Proben aus Patientinnen mit Endometriose und Eigenschaften

Altersangaben in Jahren, Art der Probe: Douglas-Zytologie oder Gewebe, vorherige Durchführung einer Hysteroskopie (HSK) und erreichter Endpunkt. Zu möglichen Endpunkten gehört die erfolgreiche Kultivierung mit anschließendem Einfrieren der Zelllinie (intakte Kultur) oder eine fehlgeschlagene Kultur mit ausbleibendem Wachstum (kein Wachstum).

Linie	Alter	Probe	Vorherige HSK	Endpunkt
#Endo_01	35	Zytologie	nein	Kein Wachstum
#Endo_02	31	Zytologie	nein	Intakte Kultur
#Endo_03	30	Zytologie	nein	Kein Wachstum
#Endo_04	36	Zytologie	nein	Intakte Kultur
#Endo_05.1	32	Zytologie	nein	Kein Wachstum
#Endo_05.2	32	Gewebe	nein	Intakte Kultur
#Endo_06	32	Zytologie	ja	Intakte Kultur

Im Primäransatz waren vorwiegend Einzelzellen und in geringem Maße glanduläre Strukturen zu erkennen. Zudem waren weniger Fibroblasten vorhanden. Aus den angesetzten Zytologien bildeten sich zystische Organoide, die lichtmikroskopisch einen prominenten Rand, sowie ein helles Zentrum besaßen (Abb. 26). Nach 7 bis 10 Tagen wurden sie in der Regel passagiert.

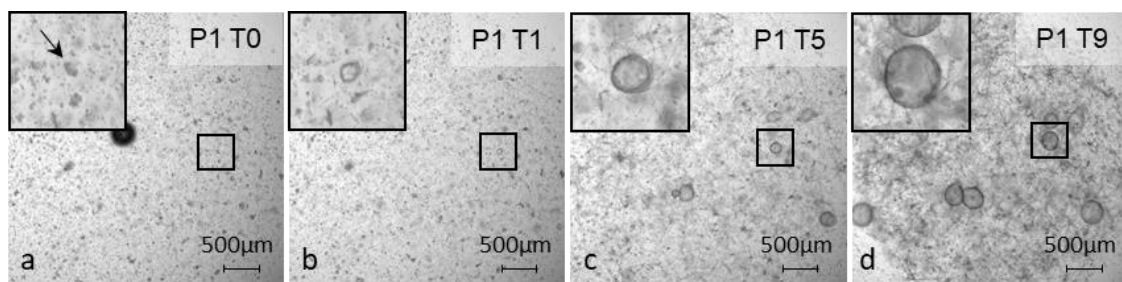


Abbildung 26: Wachstumsverlauf der Endometriose Linie #Endo_02

dargestellt ist Passage 1 (P1) in Medium E mit vergrößertem Ausschnitt, Maßstab 500 µm, Maßstab vergrößerter Ausschnitt 500 µm

a) Tag 0 (T0), der Pfeil deutet auf die initiale Struktur des vergrößert dargestellten Organoids, b) Tag 1 (T1), c) Tag 5 (T5), d) Tag 9 (T9)

Exemplarisch wurde die Gewebeprobe eines Endometrioseherdes angesetzt, welche aus dem Peritoneum der Beckenwand einer Patientin stammte. Das Gewebe war fest und besaß makroskopisch keine drüsigen Anteile. Es wurde

entsprechend Kapitel 2.4 aufgearbeitet und mit Nährmedium E angesetzt (Abb. 27).

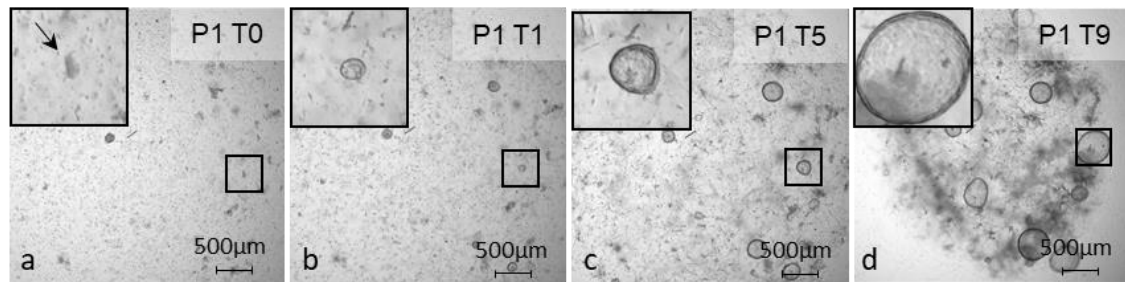


Abbildung 27: Wachstumsverlauf der Endometriose Linie #Endo_05.2

(Gewebeprobe aus dem Peritoneum der Beckenwand) an Passage 1 (P1) in Medium E mit vergrößertem Ausschnitt,

Maßstab 500 µm, Maßstab vergrößerter Ausschnitt 500 µm

a) Tag 0 (T0), der Pfeil deutet auf die initiale Struktur des vergrößert dargestellten Organoids, b) Tag 1 (T1), c) Tag 5 (T5), d) Tag 9 (T9)

Die entstandenen Organoiden waren von kugelförmiger Gestalt mit einer zentralen Aufhellung (Abb. 27) und glichen in Form und Wachstum den Organoiden aus den Zytologieproben (Abb. 26). Auffällig war die hohe Zahl an Fibroblasten, die den Matrigeltropfen stark zusammenzogen (Abb. 27d) und die Wachstumszeit der Passage limitierten.

3.5.2 Zytodiagnostik

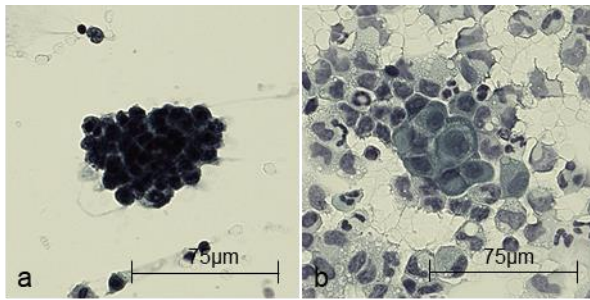


Abbildung 28: Ausschnitte von Zytologiepräparaten mit adenoiden Zellverbänden

PAP-Färbung, Maßstab 75µm, a) Positivkontrolle einer Endometriosepatientin, b) Zytologie der Linie #Endo_02

Der Befund in Abb. 28b zeigt einen adenoiden Zellverband umgeben von Granulozyten, der in Probe #Endo_02 vorhanden war. Der Befund in Abb. 28a entstammt einer Patientin mit Endometriose und diente der Referenz.

Von den gesammelten Zytologieproben waren lediglich in der Probe #Endo_02 adenoide Zellverbände vorhanden, während die anderen Proben keine Auffälligkeiten hinsichtlich Zeichen einer Endometriose aufwiesen.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein Modell zur Kultivierung von Organoiden aus humanem Endometrium bei verschiedenen Grunderkrankungen erarbeitet. Untersucht wurden Gewebeproben von prä- und postmenopausalen Patientinnen, sowie die Dezidua der Frühschwangerschaft. 2017 generierten zwei Arbeitsgruppen erstmals Organoide aus murinem und humanem Endometrium (Turco *et al.*, 2017, Boretto *et al.*, 2017). Sie kultivierten Organoide verschiedener Zyklusphasen, postmenopausales Endometrium und Dezidua. Ziel war es darauf aufbauend Endometrium Organoide mit dem Schwerpunkt verschiedener benigner Grunderkrankungen zu untersuchen. In einem weiteren Schritt wurde versucht mit dem erarbeiteten Modell pathologisch verändertes Gewebe zu kultivieren.

4.1 Ergebnisse

4.1.1 Organoide aus benignem Endometrium

Über einen Zeitraum von mehreren Monaten und einer Erfolgsrate von 88% ist es gelungen benigne Endometrium Organoide zu kultivieren. Diese organisierten sich zu dreidimensionalen, zystischen Strukturen mit einem zentralen Lumen und erreichten Durchmesser bis zu 1000 μm (vgl. Kap. 3.2, z.B. Abb. 11). Dieser Phänotyp steht im Einklang mit bereits beschriebenen Phänotypen für Endometrium Organoide (Turco *et al.*, 2017, Boretto *et al.*, 2017). Mithilfe histologischer Färbemethoden (vgl. Kap. 3.3, Abb. 21) wurde der Aufbau auf zellulärer Ebene verdeutlicht. Die Zellen bildeten ein einschichtiges isoprismatisches Epithel mit zentral liegenden Zellkernen. Diese Anordnung spiegelt den Aufbau des Endometriums *in vivo* wider (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019b).

Immunhistochemische Färbungen

Die Färbungen der Hormonrezeptoren ER α und PR wiesen eine ER $^+$ (positive) und PR $^-$ (negative) nukleäre Expression nach (Abb. 23). Diese Konstellation wurde von Turco *et al.* bei Organoiden in basalem Nährmedium, d.h. ohne

Zugabe von Hormonen, etc., ebenfalls festgestellt. Turco *et al.* beschrieben überdies eine meist schwache Expression von ER α , während die Organoide dieser Arbeit ER α durchweg stark exprimierten. (Vgl. Turco *et al.*, 2017). Diese Differenz ist u.U. auf das Phenolrot im Advanced DMEM/ F-12, welches im Nährmedium E verwendet wurde, zurückzuführen. Diesem wurde ein östrogenen Einfluss auf hormonsensitive Zellen nachgewiesen (Berthois *et al.*, 1986). Um dies zu überprüfen, müssten die Organoide in einem Phenolrot-freien Nährmedium kultiviert werden und anschließend eine erneute Färbung der Hormonrezeptoren durchgeführt werden.

Gemäß Turco *et al.* und Boretto *et al.* reagieren humane Endometrium Organoide auf eine Stimulation mit E2, P4 und cAMP ähnlich wie das Endometrium *in vivo* im Rahmen des Menstruationszykluses (Turco *et al.*, 2017, Boretto *et al.*, 2017). Basierend auf diesen Erkenntnissen kann angenommen werden, dass diese Differenzierung bei den Organoiden dieser Arbeit reproduzierbar ist. Um dies zu belegen, müssten die hier beschriebenen Organoide um diese Stimulationsversuche ergänzt werden. Die hier beobachtete stark positive ER α Expression der Zellen zeigt eine Tendenz für die beschriebene Reaktion auf hormonelle Stimuli.

Ein weiterer Aspekt im Rahmen der Charakterisierung war der Nachweis von PAX8 positiven Zellen innerhalb der Organoide (Abb. 22). Das Paired-Box-Protein 8 (PAX8) gilt als ein wesentlicher Transkriptionsfaktor in der embryonalen Entwicklung der Organe der Müllerschen Gänge (Uterus, Eileiter und oberer Teil der Vagina), der Niere und der Schilddrüse (Ozcan *et al.*, 2011). Zudem konnte PAX8 auch in Neoplasien dieser Organe nachgewiesen werden (Bowen *et al.*, 2007, Tong *et al.*, 2009). Die Relevanz dieses Transkriptionsfaktor für die Organogenese von Tier und Mensch wird durch die Versuche von Mittag *et al.* deutlich. Bei Mäusen führte die Deletion des PAX8-Gens zu einer kongenitalen Hypothyreose, sowie zur Infertilität aufgrund eines rudimentär entwickelten Uterus mit fehlendem Endometrium und schlecht entwickeltem Myometrium. Die Eileiter, die Zervix und die Vagina hingegen waren nicht betroffen und entwickelten sich regulär (Vgl. Mittag *et al.*, 2007). Gemäß Ozcan *et al.* begrenzt sich die starke Expression von PAX8 innerhalb des Uterus auf Zellen der reifen

Endozervix, sowie des Endometriums und ist auch bei gutartigen gynäkologischen Läsionen wie der Adenomyose zu finden. Sie kommen zu dem Schluss, dass PAX8 ein geeigneter Marker ist, um die Herkunft eines Gewebes einzuordnen. (Vgl. Ozcan *et al.*, 2011) Bei den Organoiden dieser Arbeit konnte eine starke Expression von PAX8 festgestellt werden, sodass unter den oben genannten Prämissen eine den Müllerschen Organen entspringenden Herkunft bestätigt werden kann. Korrekterweise kann diese Expression auch eine Herkunft aus Nieren oder Schilddrüsengewebe nicht ausschließen, dies ist aber durch die anatomische Lage der Gewebeproben unwahrscheinlich.

Gegenüberstellung der Grunderkrankungen

Es wurden 17 Organoidlinien aus benignem Endometrium fünf verschiedener Grunderkrankungen (Abort, Adenomyose, Descensus uteri, Interruptio, Uterus myomatosus) charakterisiert und auf mögliche Unterschiede untersucht (Kap. 3.2). Innerhalb dieser Grunderkrankungen wurden Organoide aller Zyklusphasen (proliferativ und sekretorisch) und verschiedenem Menopausenstatus (Prä- und Postmenopause) generiert. Zusammenfassend kann berichtet werden, dass unabhängig von Zyklusphase, Menopausenstatus und der vorliegenden Grunderkrankung alle entstandenen Endometrium Organoide eine zystische Form mit zentralem Lumen ausbildeten (Abb. 20). Anhand ihres Phänotyps allein kann folglich kein Rückschluss auf die Grunderkrankung, die Zyklusphase oder den Hormonstatus gezogen werden.

4.1.2 Limitationen der Kultivierung

In 12% der Fälle konnte kein Wachstum bzw. kein stabiles Wachstum über mehrere Passagen verzeichnet werden. Eine eindeutige Ursache für das Scheitern einer Kultur ist nur schwer zu finden, da viele Faktoren eine Rolle spielen. Zwei elementare Aspekte, die Gewebeproben und das Nährmedium, sollen in diesem Zusammenhang dennoch beleuchtet werden.

Qualität, Quantität und Umgang mit Gewebeproben

Zum einen ist die Qualität und der Umfang der Gewebeprobe von großer Bedeutung. Ist die Zahl der Stammzellen nicht ausreichend vorhanden, kann ein Organoidwachstum misslingen. Im Prinzip kann dies bei jeder Entität auftreten.

Bei postmenopausalem Gewebe haben diese Kriterien eine noch größere Gewichtung, da innerhalb dieser das atrophe Endometrium in Form eines dünnen Saumes vorlag. Die Quantität als auch die Qualität der Gewebeproben war bei dieser Entität reduziert. Ein ähnliches Problem wurde beim Passagieren festgestellt, wenn nicht genügend Zellen eingesetzt werden (Vgl. Kap 3.2.1). Andererseits beschreiben Turco *et al.*, dass die Bildung von Organoiden auch aus Einzelzellen möglich ist. Die Effizienz mit der sich Organoide formten sank jedoch mit abnehmender Zellzahl. (Vgl. Turco *et al.*, 2017). Die Qualität und Quantität einer Gewebeprobe sind folglich stets zu beachten und können durch eine aufmerksame Probenentnahme gewährleistet werden.

Zum anderen muss der Umgang mit dem Gewebe durch den Anwender als eine potenzielle Fehlerquelle berücksichtigt werden. Eine unbemerkte Abweichung vom Protokoll oder unsauberes Arbeiten kann eine Kultur gefährden. Zum Beispiel ist der Zusatz von Primocin, einem Breitspektrum-Antibiotikum, im Nährmedium nicht für das Wachstum von Organoiden vonnöten. Aufgrund einer möglichen Kontamination mit Pilzen und/oder Bakterien wird es dennoch hinzugefügt (van de Wetering *et al.*, 2015). Es sollte dabei angemerkt werden, dass eine Kontamination nicht zweifellos auf den Anwender zurückzuführen ist, sondern auch zu Beginn in der Gewebeprobe enthalten sein kann.

Nährmedium

Das Nährmedium ist für jeden Gewebetyp spezifisch (Sato and Clevers, 2015). Im Falle des Mediums E basiert die Zusammensetzung auf den Protokollen zweier Arbeitsgruppen. Diese leiteten ausgehend von der Mikroumgebung des Endometriums die notwendigen Reagenzien ab und ermöglichten die Kultivierung von Endometrium Organoiden. (Turco *et al.*, 2017, Boretto *et al.*, 2019). Aufgrund der zahlreichen Reagenzien stellt jedoch die Optimierung des Nährmediums einen aufwendigen Versuch dar. In dieser Arbeit fokussierte sich die Optimierung auf die Faktoren Wnt3a, RSPO1 und Noggin, welche im konditionierten Medium enthalten waren (vgl. Kap. 2.8). Die durchgeführten Mediumversuche ergaben jedoch, dass ein wesentlicher Einfluss nicht auf die o.g. Faktoren, sondern auf FCS zurückzuführen war (Abb. 13,17,19). Die Zugabe

von FCS hat eine reduzierte Bildung von Organoiden, sowie ein vermehrtes Bodenwachstum zur Folge. Im Verlauf wurde ein konditioniertes Medium ohne FCS produziert, welches an mehreren Organoidlinien getestet wurde und sich als einsatzfähig erwies (Abb. 14). Es wurde anschließend im Medium E verwendet (Tabelle 2). Die Vermutung, dass FCS einen negativen Einfluss auf eine Kultur hat, wurde bereits zuvor von Kopper *et al.* geäußert (Kopper *et al.*, 2019). Aufgrund der zeitlichen Abfolge erhielten einige Organoidkulturen Medium 0 und E, während andere Kulturen von Beginn an in Medium E kultiviert wurden. Um dem Medium E tatsächlich ein vorteilhafteres Wachstum nachzuweisen, müssten alle Organoidlinien separat mit beiden Medien behandelt und anschließend verglichen werden.

Fazit

Die Signalübertragungswege *in vivo* sind sehr komplex. Ein *in vitro* hergestelltes Nährmedium nähert sich den Verhältnissen *in vivo* zwar an, kann sie aber nicht komplett imitieren. Die Definition eines mustergültigen Nährmediums stellt sich damit problematisch dar. Erschwerend kommt hinzu, dass jede Zelllinie individuell auf die Veränderung der Kulturbedingungen reagiert. Allein diese zwei Aspekte zeigen, dass der Erfolg einer Organoidkultur nicht garantiert werden kann. Dutta *et al.* fassen die Problematik folgendermaßen zusammen:

„Es besteht immer die Möglichkeit, dass die Etablierung einer Organoidkultur scheitert, insbesondere wenn sie aus erkranktem Gewebe stammt und dass die Etablierung durch Faktoren wie die Größe der Biopsie und/oder unterschiedliche Anforderungen an die Wachstumsfaktoren begrenzt sein kann.“ (Vgl. Dutta et al., 2017)

4.1.3 Endometriumkarzinom

Organoide aus Endometriumkarzinomzellen

Das Aussehen der entstandenen Organoide war überwiegend zystisch mit einem zentralen Lumen (Abb. 24). Zudem konnten auch solide Anteile innerhalb der Organoide beobachtet werden. Boretto *et al.* beschreiben einen vergleichbaren Phänotyp und ergänzen, dass der zystische Typ vor allen bei gut differenzierten (Low-grade) Karzinomen auftritt, während schlecht differenzierte Karzinome

(High-grade) vorwiegend einen soliden Wachstumstyp ohne ein zentrales Lumen aufweisen (Boretto *et al.*, 2019). Diese phänotypische Vielfalt wird auch bei anderen Organoiden maligner Herkunft beobachtet (Kopper *et al.*, 2019, Sachs *et al.*, 2018). Von vier angesetzten Gewebeproben konnte in 2 Fällen ein stabiles Wachstum über mehrere Passagen erreicht werden (Tabelle 11). In diesem Kollektiv ist die Erfolgsrate mit 50% am niedrigsten. Dies soll im Folgenden anhand des Gewebes und des Nährmediums erörtert werden.

Gewebe

Malignes Gewebe scheint insgesamt problematischer in der Organoidkultivierung zu sein. In der Literatur wird dies anhand von Effizienz- und Erfolgsraten gemessen. Effizienzzraten werden aus dem Quotienten von etablierten Organoidlinien und den benötigten Versuchen gebildet. Die Erfolgsraten dagegen berechnen sich aus dem Quotienten der Anzahl der Organoidansätze und Anzahl daraus etablierter Organoidlinien. Diese Raten sind nicht gleichzusetzen, beide spiegeln aber die Schwierigkeit der erfolgreichen Kultivierung wider. Die Effizienzzraten der Arbeitsgruppen, die Organoide aus malignem Gewebe untersuchen reichen von 15% für Prostatakarzinome bis 40% für Endometriumkarzinome (Gao *et al.*, 2014, Boretto *et al.*, 2019). Die Erfolgsraten wiederum liegen in einem Bereich von 65% für Ovarialkarzinome bis ca. 90% für Kolorektalkarzinome (Kopper *et al.*, 2019, van de Wetering *et al.*, 2015). Die Erfolgsrate dieser Arbeit erreicht mit 50% den geringsten Wert. Sie ist jedoch aufgrund der geringen Stichprobe von 4 Patientinnen nur eingeschränkt vergleichbar.

Laut Sachs *et al.* bestehen die Ursachen für die unzureichende Kultivierung in einer ungenauen Probenentnahme sowie dem Nährmedium, welches initial für benignes Gewebe entworfen wurde (Sachs *et al.*, 2018). Beispielsweise wird von Übernahmen der Organoidkulturen durch andere Zellpopulationen berichtet. Dabei handelt es sich meist um benigne Epithelzellen, welche sich initial in der Gewebeprobe befanden, oder tumor-assoziierte Spindelzellen (Boretto *et al.*, 2019, Gao *et al.*, 2014). Van Wetering *et al.* führen dies u.a. auf die genomische Instabilität der Tumorzellen zurück. Dahingehend versuchen sie durch

Modifikationen des Nährmediums ein selektiveres Wachstum von Tumor Organoiden zu erreichen. (van de Wetering *et al.*, 2015).

Wie bereits erläutert gleicht der Phänotyp von Endometriumkarzinom Organoiden teilweise auch benignen Endometrium Organoiden. Daher sollte in Betracht gezogen werden, dass auch die Kulturen dieser Arbeit beide Entitäten enthalten. Eine primäre Differenzierung könnte dabei anhand der immunhistochemischen Färbung der Mismatch Repair Proteine getroffen werden.

Eine weitere wichtige Frage, die bei Kultivierung maligner Zellen stetig zu überprüfen ist, ist, ob Organoide die genetische Heterogenität des Tumors abbilden können. Gemäß Dutta *et al.* kann der Wachstumsvorteil einer Subpopulation innerhalb der Kultur nicht ausgeschlossen werden (Dutta *et al.*, 2017). Die Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen deuten aber darauf hin, dass das Organoidmodell in der Lage ist die genetische Heterogenität der Primärtumoren abzubilden. (Kopper *et al.*, 2019, Sachs *et al.*, 2018, van de Wetering *et al.*, 2015). Nichtsdestotrotz bedarf es der regelmäßigen Überprüfung dieser mittels genetischer Analysen.

Nährmedium

Boretto *et al.* arbeiten heraus, dass ihr Standardnährmedium für Endometrium Organoide nicht auf Karzinom Organoide übertragbar ist (Boretto *et al.*, 2019). Entsprechend wurde auch in dieser Arbeit ein abgeändertes Nährmedium EC für Karzinom Organoide erstellt (Tabelle 3). Dieses enthielt u.a. kein SB202190, welches für die Etablierung von Organoiden aus Endometrium- und Mammakarzinomen als unvorteilhaft beschrieben wird (Boretto *et al.*, 2019, Sachs *et al.*, 2018). Darüber hinaus enthält das Karzinom-Nährmedium von Boretto *et al.* im Gegensatz zum Nährmedium EC 17 β -Estradiol (Boretto *et al.*, 2019). In Anbetracht des hormonabhängigen Wachstums von 90% der Tumoren (Setiawan *et al.*, 2013), könnte der Einsatz eines Östrogens im Nährmedium durchaus förderlich sein und sollte untersucht werden.

Fazit

Zusammenfassend hat der Versuch malignes Gewebe zu kultivieren mehr Fragen aufgeworfen als beantwortet. Das vorgestellte Modell in seiner aktuellen Form scheint bislang unzureichend für die Kultivierung von Malignomen. Dafür bedarf es einer größeren Stichprobe, sowie weiterer Optimierung des Nährmediums. Der Vergleich zu anderen Organoidmodellen hat jedoch gezeigt, dass die Kultivierung von Zellen maligner Herkunft insgesamt eine Herausforderung darstellt.

4.1.4 Endometriose

Organoide

Ausgehend von sechs Zytologien und einer Gewebeprobe wurden vier intakte Organoidlinien generiert (Tabelle 12). Es ist jedoch nicht sicher, ob Organoide der Zytologien tatsächlich aus Endometriosezellen stammen. Auf diese Frage wird im Verlauf näher eingegangen.

Die Organoide bildeten zystische Strukturen mit einem zentralen Lumen und schienen lichtmikroskopisch keine Unterschiede zu Organoiden aus benignem Endometrium aufzuweisen (Abb. 27). 2019 beschreiben Boretto *et al.* Organoide aus physiologischem (EM-O), sowie erstmals aus ektopem (ECT-O) und eutopem (EUT-O) Endometrium von Patientinnen mit Endometriose. Diese bilden ebenfalls, unabhängig der Lage und Diagnose, die genannten zystischen Strukturen und scheinen lichtmikroskopisch nicht voneinander differenzierbar. Histologisch, sowie elektronenmikroskopisch beobachten Boretto *et al.* jedoch ein zweischichtiges Epithel bei ECT-O, während EUT-O eine einzellige Schicht bilden. Des Weiteren berichten sie von sich luminal vorwölbenden Strukturen bei ECT-O, die sie als invasiven Phänotypen werten. (Vgl. Boretto *et al.*, 2019) Diese Beobachtungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Aufgrund der schwierigen Differenzierung zwischen physiologischen und ektopen Organoiden, sowie dem abweichenden Ausgangsmaterial (Zytologie) zu Boretto *et al.* muss der Ursprung der in dieser Arbeit kultivierten Organoide

kritisch hinterfragt werden. Zunächst soll dies anhand der Eignung der Zytologieproben erfolgen.

Eignung von Douglaszytologien als Ausgangsmaterial für Organoide

Die gesammelten Douglaszytologien stammten von Patientinnen mit bereits gesicherter Endometriose, die sich einem laparoskopischen Eingriff unterzogen. Die Zytologien wurden auf mit Endometriose vereinbaren Auffälligkeiten untersucht. Aus diesem Patientenkollektiv war trotz gesicherter Diagnose lediglich 1 von 6 Befunden auffällig, während in 3 von 6 Fällen die Bildung von Endometrium ähnlichen Organoiden beobachtet wurden. Es ist daher unklar, ob die Kriterien einer gesicherten Diagnose in Kombination mit einem auffälligen Zytologiebefund hinreichend sind.

Stowell *et al.* untersuchten 50 Zytologien von Patientinnen, die sich bei Verdacht auf Endometriose einer diagnostischen Laparoskopie unterzogen. Die Proben wurden bei Vorliegen von Endometrium-ähnlichen Zellen (ELC) oder Hämosiderin beladenen Makrophagen (HLM) als auffällig gewertet.

Bei 27 Patientinnen konnte die Diagnose Endometriose intraoperativ gestellt werden. Davon hatten aber nur 15 (56%) einen auffälligen Zytologiebefund. Sie schließen aus ihren Ergebnissen, dass der Zytologiebefund bei bestimmten Konstellationen wie dem Vorhandensein von HLM mit oder ohne ELC eine Endometriose äußerst wahrscheinlich macht. (Vgl. Stowell *et al.*, 1997) Im vorliegenden Patientenkollektiv hatten nur 17% der Endometriosepatientinnen bei gleichen Kriterien (ELC und HLM) einen auffälligen Befund. Dies weicht zwar von den Ergebnissen von Stowell *et al.* stark ab, ist jedoch in Anbetracht der geringen Stichprobe nicht aussagekräftig. Daher ist der Einsatz des Zytologiebefundes als prädiktiver Marker vor dem genannten Hintergrund kritisch zu betrachten.

Die Douglaszytologie als Ausgangsmaterial für Organoide birgt eine weitere Schwachstelle. Bei Durchführung einer Hysteroskopie kann es durch die Spülflüssigkeit zu einer Dissemination von Zellen aus dem Gebärmutterkörper und den Eileitern in den Bauchraum kommen und die Zytologieprobe verfälschen. Dies konnte am Beispiel von Zellen endometrialer Korpuskarzinome

nachgewiesen werden (Obermair *et al.*, 2000). Das hat zur Folge, dass eine Douglaszytologie, die nach einer Hysteroskopie entnommen wird, nicht ausschließlich Zellen des Bauchraumes enthält und somit keine selektive Probe für Endometriose darstellt. In dem gesammelten Kollektiv ist dies bei einer Organoidlinie der Fall und sollte bei der Gewinnung zukünftiger Zytologien unbedingt beachtet werden. Aber auch ohne die externe Manipulation wie einer Hysteroskopie können in einer physiologischen Douglaszytologie in geringem Maße Endometriumzellen gefunden werden (D'Hooghe and Debrock, 2002, Bokor *et al.*, 2009). Ob Zellen der Eileiter ebenfalls in Douglaszytologien vorhanden sind, wird in der Literatur nicht beschrieben, die Möglichkeit ist durchaus gegeben.

Abgrenzung von Organoiden aus Endometriose

Folglich enthalten die verwendeten Zellisolate dieser Arbeit unter Umständen Endometriosezellen, Zellen eutopen Endometriums oder Zellen der Eileiter. Dabei stellt sich die Frage, ob diese Entitäten im Organoidmodell voneinander abgegrenzt werden können. Im Folgenden soll dies anhand der Kriterien Phänotyp und Nährmedium diskutiert werden.

Eileiter Organoide

Organoide der Eileiter bilden runde, zystische Strukturen, die sich im Verlauf stark einfalten (Kessler *et al.*, 2015). Dieser Phänotyp ähnelt Endometrium Organoiden, bei welchen sich die Faltung im Rahmen dieser Arbeit vereinzelt beobachten ließ und als Alterung dieser gewertet wurde (vgl. Abb.7). Boretto *et al.* beschreiben einen ähnlichen Phänotyp bei humanen Endometrium Organoiden, die mit Progesteron stimuliert wurden. Von einer regulären Faltung der zystischen Endometrium Organoide wird jedoch nicht berichtet (Vgl. Boretto *et al.*, 2017). Insgesamt bestehen somit einige Übereinstimmungen zwischen den Phänotypen, eine Unterscheidung sollte lichtmikroskopisch dennoch möglich sein.

Das Nährmedium von Kessler *et al.* für Eileiter stimmt in hohem Maße mit dem verwendeten Nährmedium E für Endometrium Organoide überein (vgl. Tabelle 2). Abweichendes Reagenz ist im Nährmedium für Eileiter Organoide u.a. der

verwendete ALK5 Inhibitor SB431542. Nährmedium E enthält stattdessen den MAP-Kinase Inhibitor SB202190 und A83-01, welcher ebenfalls ein ALK5 Inhibitor ist. Des Weiteren erachten Kessler *et al.* die Aktivierung des Wnt-Signalweges mittels Wnt3a als ausschlaggebend für ein stabiles Wachstum von Eileiter Organoiden, während Boretto *et al.* beobachten, dass humane Endometrium Organoide darauf nicht angewiesen sind. (Vgl. Boretto *et al.*, 2017, Kessler *et al.*, 2015) Turco *et al.* zeigten, dass Zellen innerhalb einer Kultur durch spezifische Nährmedien selektiert werden können (Turco *et al.*, 2018). Basierend darauf könnten die oben genannten Unterschiede ebenfalls eine Selektion zwischen Zellen des Endometriums und der Eileiter bewirken. Dies müsste in einem weiterführenden Versuchsaufbau untersucht werden.

Vergleich von Organoiden aus Endometrium und Endometriose

Der Ansatz den Phänotyp, bzw. das Nährmedium zu vergleichen scheitert bei der Gegenüberstellung von Organoiden aus Endometrium und Endometriose. Wie bereits beschrieben ist der lichtmikroskopisch erfassbare Unterschied marginal. Zudem wurden beide Entitäten mit Medium E kultiviert und auch Boretto *et al.* verwenden für EM-O, EUT-O und ECT-O ein Nährmedium (Boretto *et al.*, 2019). Eine Selektion, wie im Abschnitt Eileiter Organoide beschrieben, ist damit nicht möglich. Unterschiede zwischen Endometriose und eutopem Endometrium konnten dennoch u.a. anhand einer hoch- wie auch herunterregulierten Expression zahlreicher Gene festgestellt werden (Burney *et al.*, 2007, Meola *et al.*, 2010). Auch Boretto *et al.* 2019 konnten dies bestätigen (Boretto *et al.*, 2019). Der Aufwand dieser Verfahren allein für die Analyse der Herkunft scheint jedoch nicht angemessen.

Zusammenfassend ist es mithilfe des Phänotyps und dem Nährmedium nicht möglich mit Sicherheit Endometriose Organoide von Endometrium Organoiden zu unterscheiden.

Schlussfolgerung

Für die Kultivierung von Endometriose Organoiden stellt die Doulaszytologie als Ausgangsmaterial noch zu viele Unsicherheiten dar. Dahingehend können die aus Zytologieproben kultivierten Organoide nicht klar einer Entität zugeordnet

werden. Stattdessen bieten Gewebeproben weiterhin die größte Sicherheit, da die Entnahmestelle klar zuzuordnen ist und zusammen mit der histologischen Befundung dem Goldstandard zur Sicherung der Endometriose entspricht (Ulrich *et al.*, 2014).

Es konnte dennoch gezeigt werden, dass Zytologien ausreichend Zellen enthalten, um Organoide des weiblichen Reproduktionstraktes zu kultivieren. Dadurch könnte die bisher zwingende Gewinnung von Gewebe um eine Probenart erweitert werden, sodass auch Organoidkulturen von Patientinnen, die sich keinem Eingriff der Gebärmutter unterziehen, möglich sein werden. Um dies zu verwirklichen, benötigt es einige weiterführende Versuche. Dazu gehört die Untersuchung von Zytologien gesunder, sowie erkrankter Patientinnen, eine größere Stichprobe, als auch der Vergleich von Organoidkulturen, die aus der Zytologie und dem Gewebe einer Person entnommen wurden.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Patientenkollektiv

Ein- und Ausschluss Kriterien

In die Studie wurden volljährige Patientinnen eingeschlossen, die sich bei einer benignen oder malignen Läsion des Uterus einem operativen Eingriff unterzogen und ihre schriftliche Einwilligung zur Verwendung von Gewebe zu Studienzwecken erteilt hatten (Tabelle 5). Eingeschlossen wurden Patientinnen in jeder Zyklusphase und jedem Menopausenstatus. Um eine Verzerrung der Ergebnisse durch externen hormonellen Einfluss zu vermeiden, wurden Patientinnen, die innerhalb der letzten drei Monaten eine Substitution von Hormonen erhalten hatten, von der Studie ausgeschlossen. Dies konnte bei Patientinnen mit Endometriose nicht durchweg gewährleistet werden, da die Einnahme eines Gestagens ein wesentliches Prinzip der Therapie darstellt (Ulrich *et al.*, 2014). Insgesamt waren die genannten Ein- bzw. Ausschlusskriterien ausreichend geeignet, um ein passendes Patientenkollektiv aufzubauen und die Fragestellung uneingeschränkt bearbeiten zu können.

Diagnosen

Bei der Wahl der Grunderkrankungen bzw. Operationsindikationen wurde auf eine hohe Prävalenz in der Bevölkerung Wert gelegt. Mit dem gewählten Patientenkollektiv konnte ein hoher Anteil der Frauen mit gynäkologischen Beschwerden repräsentiert werden, wodurch die gewonnenen Erkenntnisse aus dem Organoidmodell eine breite Anwendbarkeit ermöglichen.

Stichprobe

Aus einem Gesamtkollektiv von 47 Patientinnen wurden 28 Organoidlinien angesetzt, um die Facetten des Endometriums exemplarisch abzubilden (Tabelle 6). Die angestrebte homogene Verteilung der gewählten Erkrankungen war mit einer Bandbreite von 2 bis 5 angesetzten Organoidlinien pro Diagnose akzeptabel, wurde aber nicht vollständig erreicht. Die Verteilung der klinischen Eigenschaften ist ebenfalls nicht gleichmäßig vertreten. So finden sich unter den angesetzten benignen Organoidkulturen 4 Linien mit Endometrium in der proliferativen und nur 1 Linie mit Endometrium in der sekretorischen Phase. Da die Auswahl der Patientinnen vorrangig nach bestehender Diagnose und nicht nach Zyklusphase getroffen wurde, ist diese Diskrepanz nachvollziehbar. Bei künftiger Patientenrekrutierung sollten zusätzlich zu den Grunderkrankungen die klinischen Eigenschaften mehr Beachtung finden. Andererseits konnte aus den Ergebnissen kein Unterschied im Hinblick auf die bestehende Zyklusphase festgestellt werden. Infolgedessen ist die Verteilung der klinischen Eigenschaften des Endometriums für die Charakterisierung der Erkrankungen im Organoidmodell möglicherweise vernachlässigbar, aber hinsichtlich einer repräsentativen Stichprobe unerlässlich.

Die gewählte Stichprobe stellt mit 28 Patientinnen wiederum keine repräsentative Menge dar, sodass aus den resultierenden Ergebnissen keine absoluten Aussagen, sondern vielmehr Tendenzen abgeleitet werden können. Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen, sollte die Fallzahl erweitert werden.

4.2.2 Gewebeproben

Prämenopause (Uterus myomatosus, Adenomyose)

Das Endometrium bei Uterusmyomen und Adenomyose ist pathologisch weitestgehend unbeeinträchtigt und spiegelt daher physiologische Organoide während der Prämenopause am nächsten wider. Darüber hinaus wurden keine Gewebeproben beschwerdefreier Patientinnen gewonnen, da unbegründete Eingriffe an dieser Patientengruppe nicht zu rechtfertigen sind. Es darf dabei nicht unerwähnt bleiben, dass sowohl bei Uterusmyomen, als auch bei der Adenomyose eine Veränderung des Endometriums nicht ausgeschlossen werden kann. So wird von einer veränderten Genexpression des Endometriums bei submukösen Uterusmyomen oder von atrophem Endometrium, welches keine Anzeichen einer zyklischen Veränderung aufweist, berichtet (Rackow and Taylor, 2010, Deligdisch and Loewenthal, 1970). Bei der Adenomyose sind die Mechanismen der Entstehung bis dato nicht abschließend geklärt. Die Invagination des basalen Endometrium wird als eine von mehreren Theorien diskutiert. (Vgl. Bergeron *et al.*, 2006). Zudem berichten Benagiano *et al.* von metabolischen und molekularen Anomalien von eutopem und ektopem Endometrium bei Patientinnen mit Adenomyose (Benagiano and Brosens, 2012). Die beschriebenen Organoide müssen dahingehend vor diesem Hintergrund betrachtet werden. Die Verwendung dieser benignen Erkrankungen stellvertretend für physiologisches Endometrium ist dennoch notwendig, um Endometrium der Prämenopause untersuchen zu können.

Dezidua

Zur Herstellung von Organoiden aus Dezidua wurden Abradate des Corpus uteri verwendet. Bei diesen konnte im Gegensatz zu den Gewebeproben das Endometrium bzw. die Dezidua nicht von anderen Bestandteilen differenziert werden, sodass der endometriale Ursprung der kultivierten Zellen diskutiert werden muss. Die verwendeten Abradate enthielten Anteile von Dezidua als auch dem Trophoblasten, welcher aus der Blastozyste entsteht und damit fetalen Ursprungs ist (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019a). Eine erste Möglichkeit diese beiden Entitäten voneinander zu unterscheiden ist durch ihre Wachstumsform im

Organoidmodell. Während Trophoblast Organoide dichte, irregulärere Strukturen bilden, entwickeln Organoide aus Endometrium eine zystische Form (*Boretto et al.*, 2017, *Haider et al.*, 2018, *Turco et al.*, 2018), (Abb. 16, 18). Zudem berichten *Turco et al.*, dass durch die Wahl eines spezifischen Nährmediums Zellen selektiert werden können, sodass Organoide verschiedenen Ursprungs aus einer Gewebeprobe generierbar sind. Dazu betonen sie die Relevanz den Ursprung aller Kulturen zu verifizieren, die aus plazentaren oder dezidualen Zellisolaten gewonnen werden. (Vgl. *Turco et al.*, 2018). Unterzieht man demzufolge das Nährmedium für Trophoblast Organoide (TOM) und das verwendete Medium E einem Vergleich, können viele Übereinstimmungen aber auch relevante Differenzen festgestellt werden. Diese bestehen u.a. in der Verwendung vom Wnt-Aktivator CHIR99021 und Prostaglandin E2 in Medium TOM (*Turco et al.*, 2018). Um über eine Selektion eine definitive Aussage treffen zu können, müssten die verwendeten Gewebeproben in einem Versuch beiden Nährmedien ausgesetzt werden. In Zusammenschau der genannten Aspekte ist es jedoch wahrscheinlich, dass die Organoide dieser Arbeit Dezidua Organoide darstellen.

4.2.3 Organoidmodell

Das Organoidmodell ist eine aufstrebende Zellkultivierungstechnik, deren Anwendung sich als durchaus praktikabel erwies. In einigen Aspekten ist das Modell dennoch nicht gänzlich ausgereift und soll anhand einiger ausgewählter Gesichtspunkte bezogen auf das in dieser Arbeit vorgestellte Modell diskutiert werden.

Limitierte Mikroumgebung

Organoide bilden die Verhältnisse *in vivo* besser nach als 2D Kulturen (*Vinci et al.*, 2012). Dennoch beschränkt sich dies bislang auf eine Zellpopulation. *Dutta et al.* bezeichnen die fehlenden Komponenten als Mikroumgebung, welche aus Stroma-, Muskel-, Blutgefäß- und Immunzellen besteht und dem Tübinger Modell ebenfalls fehlt (*Dutta et al.*, 2017), (vgl. Kap. 2.4.1-2). Dieser Mangel wird oftmals thematisiert und eine mögliche Verbesserung durch eine Anwendung von Ko-Kulturen in Betracht gezogen. (Vgl. *Dutta et al.*, 2017, *Lancaster and Knoblich*, 2014, *Rossi et al.*, 2018).

Darin eingeschlossen ist die Vaskularisierung von Organoiden, welche einen von vielen Ansätzen darstellt und schon für Gehirnorganoide und Leberorganoide beschrieben wurde (Pham *et al.*, 2018, Baptista *et al.*, 2011). Dabei werden unterschiedliche Techniken verfolgt. Pham *et al.* kultivieren die jeweiligen Zellpopulationen zunächst separat aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) und vermengen beide Populationen im Verlauf (Pham *et al.*, 2018). Baptista *et al.* dezellularisieren Lebergewebe verschiedener Spezies bis auf das Gefäßgerüst und lassen entlang dieses Gerüsts eine Flüssigkeit, welche humane Leber- und Endothelzellen enthält, strömen (Baptista *et al.*, 2011). Eine Übertragung dieser Methoden auf Endometriumorganoide wäre ein spannender Beitrag zur Weiterentwicklung dieses Modells.

Unvollkommene Matrizen

Ein weiterer optimierbarer Bestandteil des Organoidmodells sind die verwendeten Extrazellulärmatrizen im Hinblick auf Flexibilität und Abstammung.

Bezogen auf die Flexibilität wird die fehlende Anpassung der Matrizen an die individuelle Architektur der Organe bemängelt, wodurch der anatomische Aufbau der Organoide dem in echten Organen stark abweicht (Rossi *et al.*, 2018). Im Fall der Endometrium Organoide erscheint die Diskrepanz zwischen Organoid und Originalgewebe zwar gering ausgeprägt, eine tubulöse Drüsenarchitektur des Endometriums wird in den Organoiden aber nicht modelliert. Dieser Aufbau entsteht *in vivo* durch die Einbettung der Epithelzellen in das Stroma, womit die Thematik der fehlenden Mikroumgebung wieder aufgegriffen werden kann (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019b).

Andere Lösungsansätze bieten Kultursysteme, die das Epithel der Organoide auf ein gefertigtes Gerüst ansetzen, welches der Architektur des jeweiligen Zielorgans näherkommt. Diese sogenannten „organoid-on-a-chip“ Systeme, abgeleitet von der „organ-on-a-chip“ Technologie, wurden mittlerweile von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (Vgl. Bhatia and Ingber, 2014, Park *et al.*, 2019, Skardal *et al.*, 2016). Ein Vorteil soll darin liegen die Zellen in einer kontrollierten Umgebung gezielter mit unterschiedlichen Signalen und Wachstumsfaktoren zu versorgen (Park *et al.*, 2019). 2018 wurde dieses Modell

auf humane Epithelzellen des Kolons auf einer Kolonkrypten-Matrix angewandt. Dadurch konnte eine Anordnung der Zellen verschiedener Differenzierungsgrade entlang der Krypte erzielt werden. (Vgl. Wang *et al.*, 2018a) Weitere „Organoid-on-a-chip“ Systeme wurden u.a. für humane Leber und Gehirn Organoide geschildert (Bhise *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2018b). Organoide aus Endometrium scheinen dagegen noch nicht beschrieben.

Eine Arbeit von Xiao *et al.* beschreibt ein mikrofluides System, genannt EVATAR, welches dem „organ-on-a-chip“ Modell entspringt. Dieses modelliert die weiblichen Reproduktionsorgane, darunter den Uterus, sowie die Leber während eines induzierten 28 Tage Menstruationszyklus (Xiao *et al.*, 2017). Die Erkenntnisse dieser Arbeit könnten der Weiterentwicklung hinsichtlich einer optimierten Matrix, sowie einer Ko-Kultivierung für Endometrium Organoide dienlich sein.

Bezogen auf den zweiten Aspekt, der Abstammung der Matrizen, wird die Verwendung des Matrigels kritisch betrachtet (Fatehullah *et al.*, 2016, Gjorevski *et al.*, 2016). Dieses wird aus einer murinen Sarkomzelllinie, genannt EHS-Tumor, gewonnen (Kleinman and Martin, 2005). Die Forschenden weisen bei Verwendung von Substanzen tierischen Ursprungs auf das Risiko einer pathogenen oder immunogenen Übertragung hin (Dutta *et al.*, 2017). Dadurch wäre das Organoidmodell in dieser Form für den klinischen Einsatz womöglich ungeeignet. Alternativen bieten synthetisch hergestellte Hydrogele auf Basis von Polyethylenglykol (PEG), die auch schon für die Kultivierung von Organoiden, u.a. aus Endometrium, eingesetzt wurden (Gjorevski *et al.*, 2016, Hernandez-Gordillo *et al.*, 2020). Um das Tübinger Modell langfristig für klinische Zwecke tauglich zu machen, wäre die Kultivierung der Organoide auf synthetischen Hydrogelen einer der nächsten Schritte.

Einfriermedium zur Kryokonservierung

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit verarbeitete Gewebeproben und passagierte Organoide eingefroren, aufgetaut und erfolgreich angesetzt. (vgl. Kap. 2.4.4) Dadurch war es möglich den zeitlichen Fortschritt einer Kultur zu bestimmen, bei Bedarf zu unterbrechen und zu einem späteren Zeitpunkt wieder

aufzunehmen. Zur Etablierung von Gewebebanken wie in der Literatur beschrieben ist das Tübinger Modell damit ebenfalls geeignet (Clevers, 2016). In einigen Fällen konnte ein Wachstum aus aufgetauten Organoiden nicht erreicht werden, sodass auch in diesem Bereich das Potenzial zur Optimierung besteht. Die Kryokonservierung stellt eigentlich ein separates Verfahren dar und bietet per se ein weites Feld der Forschung und Diskussion. In dieser Arbeit wird vor allem auf das angewandte Protokoll zur Kryokonservierung (Kap. 2.4.4) von Endometrium Organoiden mit dem RCC Freezing Medium von Gibco eingegangen.

Die Viabilität einer Kultur aus eingefrorenen Zellen ist von zahlreichen Faktoren abhängig. Der Hersteller verweist in seinem Protokoll auf eine ausreichend hohe Zellzahl von ungefähr 1×10^6 Zellen pro Milliliter Einfriermedium, sowie das kontrollierte Herunterkühlen von ca. 1°C pro Minute (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014).

Darüber hinaus ist das Einfriermedium für humane Stammzellen bzw. Organoiden ebenfalls ein wichtiger Faktor und bereits Ziel mehrerer Arbeitsgruppen (Arai *et al.*, 2020, Martin-Ibanez *et al.*, 2008, Sasaki *et al.*, 2005). Additive des verwendeten RCC Freezing Medium sind 10% DMSO und FBS. Ein interessanter Ansatz ist die Entwicklung eines Einfriermediums ohne FBS, welches u.a. Sericin als Kälteschutzmittel enthält. Mit diesem gelang es Sasaki *et al.* humane, sowie Säugetierzellen ebenso effizient wie herkömmliche Einfriermedien mit FBS und DMSO zu konservieren. Eine Anwendung auf Stammzellen wurde jedoch nicht berichtet. (Vgl. Sasaki *et al.*, 2005) In Anbetracht der Ergebnisse, dass Endometrium Organoiden in einem Nährmedium ohne FCS ein vorteilhafteres Wachstum entwickelten, bietet ein Einfriermedium wie es Sasaki *et al.* beschreiben eine Möglichkeit die Kryokonservierung von Endometrium Organoiden weiter zu optimieren und könnte Inhalt weiterer Forschung sein.

4.2.4 Ausblick

Das in dieser Arbeit vorgestellte Modell zur Kultivierung von Endometrium Organoiden hat sich als erfolgreich und einsatzfähig erwiesen. Die Kultivierung von pathologisch verändertem Endometrium ist noch nicht suffizient gelungen und wäre der nächste Schritt zu seiner Weiterentwicklung. Insgesamt steht das Tübinger Modell noch in den Anfängen und hat großes Optimierungspotenzial wie in einigen ausgesuchten Beispielen erläutert. Die Organoidforschung ist allgemein ein deutlich wachsendes Forschungsfeld und inzwischen wurde der Etablierung von Organoidmodellen für humane Stammzellen viel Arbeit gewidmet (Clevers, 2016). Aus den gewonnenen Erkenntnissen ergeben sich neue Fragestellungen, sodass diese Technologie noch viel Forschungsbedarf bietet. Die erörterten Aspekte geben nur einen Einblick in eine ausschweifende Thematik, welche einen steten Zugewinn an neuen Erkenntnissen erfährt. Die Ambition, der Einsatz von Organoiden in der translationalen Forschung, wird unermüdlich vorangetrieben, sodass diese Zellkultivierungstechnik nicht nur Zukunftsmusik darstellt, sondern langfristig im klinischen Alltag implementiert werden kann.

5 Zusammenfassung

Die Technologie der Zellkultivierung hat durch die Etablierung dreidimensionaler Zellkulturen große Fortschritte gemacht. Die sogenannten Organoiden entstehen u.a. aus Stammzellen und können durch die Kultivierung in spezifischen Nährmedien Gewebe aller drei Keimblätter modellieren. Diese Organoiden sollen die Verhältnisse *in vivo* exakter abbilden als herkömmliche 2D-Kulturen, sodass die Anwendung dieser Technik für zahlreiche Bereiche, wie z.B. Modellierung von Erkrankungen oder Arzneimitteltests, großen Anklang findet.

Ziel dieser Arbeit war es die beschriebene Technik der Organoid-Zellkultivierung auf Zellen des Endometriums verschiedener Grunderkrankungen bzw. Indikationen zur operativen Therapie anzuwenden. Die dabei generierten Endometrium-Organoide wurden charakterisiert und auf Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten untersucht. Dazu wurde ein Kollektiv bestehend aus 47 Patientinnen mit folgenden Diagnosen aufgebaut: Abort, Adenomyose, Deszensus uteri, Endometriose, Endometriumkarzinom, Interruptio und Uterus myomatosus. Zunächst wurden Gewebeproben benigner Veränderungen des Endometriums (Abort, Adenomyose, Deszensus uteri, Interruptio, Uterusmyomatosus) kultiviert. Anschließend wurde versucht pathologisch verändertes Endometrium (Endometriose, Endometriumkarzinom) anzusetzen.

Die Kultivierung von benignem Endometrium gelang über mehrere Monate mit einer Gesamterfolgsrate von 88%. Auftretende Schwierigkeiten wie das Wachstum von Fibroblasten oder das Wachstum der Organoiden am Boden konnten durch die Anpassung des Passagierens, als auch durch die Optimierung des Nährmediums minimiert werden. Im Rahmen durchgeführter Nährmediumversuche wurde festgestellt, dass fetales Kälberserum (FCS) einen negativen Einfluss auf Endometrium-Organoide aufweisen könnte. Gemäß dieser Vermutung, welche bereits Kopper *et al.* 2019 beschrieben, wurde FCS im Verlauf aus dem Nährmedium entfernt.

Die lichtmikroskopischen, als auch histologischen Untersuchungen ergaben eine Übereinstimmung des Phänotyps und des zellulären Aufbaus der benignen Organoiden untereinander. Unabhängig von Zyklusphase, Menopausenstatus, als

auch der Grunderkrankung, bildeten die Organoide zystische Strukturen mit einem zentralen Lumen. Die verschiedenen Entitäten konnten mit den verwendeten Untersuchungsmethoden nicht voneinander differenziert werden.

Die Kultivierung von pathologisch verändertem Endometrium erwies sich problematischer als Endometrium benigner Herkunft. Es gelang Gewebeproben von Karzinomzellen aus Endometriumkarzinomen anzusetzen, wobei die Erfolgsrate mit 50% deutlich geringer als bei benignem Endometrium ausfiel. Für Endometriose-Organoide wurden Douglas-Spülzytologien gesammelt, pelletiert und angesetzt. Mithilfe dieser Methode gelang es endometriumähnliche Organoide zu kultivieren, jedoch konnte diesen keine eindeutige Entität zugeordnet werden. Es ist daher unklar, ob es sich um Endometriose-Organoide handelte. Dahingehend wird von der Verwendung von Spülzytologien abgeraten und stattdessen Gewebeproben gesicherter Endometrioseherde empfohlen, welche ebenfalls exemplarisch kultiviert wurden.

Die vorgestellten Ergebnisse als auch die verwendete Zellkultivierungstechnik wurden im Kontext des aktuellen Forschungsstandes betrachtet und anhand ausgewählter Gesichtspunkte (u.a. das Patientenkollektiv, die Gewebeproben, das Nährmedium, die Extrazellulärmatrizen, das Einfriermedium) kritisch erörtert. Überdies wurde diskutiert, ob Organoide ein geeignetes Modell für maligne veränderte Entitäten darstellen.

Dennoch ist dieses Modell nicht frei von Unzulänglichkeiten und eröffnet interessante Möglichkeiten zur Optimierung. Dazu gehört die Verwendung von Ko-Kulturen wie z.B. Stromazellen. Dadurch könnten Organoide die Architektur ihrer Herkunftsorgane individueller nachbilden. Es würde zudem die Zellkultur um weitere Zellpopulationen erweitern und so dem Modell eine verbesserte Mikroumgebung schaffen. Da Matrizen tierischen Ursprungs problematisch sein könnten, ist die Verwendung von synthetischen Hydrogelen ebenfalls ein wichtiger Schritt, um das Organoidmodell langfristig für den klinischen Einsatz tauglich zu machen. Des Weiteren sollte zusätzlich zu den genannten Aspekten das vorgestellte Modell in Folgestudien mit größeren Stichproben

weiterentwickelt werden, sodass die gewonnenen Ergebnisse eine größere Aussagekraft erreichen.

Zusammenfassend bietet das Tübinger Modell bereits in seiner aktuellen Form einen Beitrag zum umfassenden Forschungsfeld der Organoide, der Erforschung des Endometriums in seinen vielfältigen Ausprägungsformen und seinen malignen Veränderungen. Aufbauend auf diese Arbeit, sollte dieses Modell optimiert und weiterentwickelt werden, um langfristig einen Einzug in die translationale Forschung zu ermöglichen.

6 Literaturverzeichnis

- ARAI, K., MURATA, D., TAKAO, S., VERISSIOMO, A. R. & NAKAYAMA, K. 2020. Cryopreservation method for spheroids and fabrication of scaffold-free tubular constructs. *PloS one*, 15, e0230428.
- ATCC. 2016. *Culture Method* [Online]. ATCC. Available: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-3276.aspx?geo_country=de#culturemethod [Accessed 09.02.2021].
- AUMÜLLER, G., AUST, G., DOLL, A., ENGELE, J., KIRSCH, J., MENSE, S., REISSI, D., SALVETTER, J. & SCHMIDT, W. 2010. Weibliches Genitale. In: AUMÜLLER, G., AUST, G., DOLL, A., ENGELE, J., KIRSCH, J., MENSE, S., REISSI, D., SALVETTER, J. & SCHMIDT, W. (eds.) *Duale Reihe Anatomie*. 2., überarbeitete Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- BAPTISTA, P. M., SIDDIQUI, M. M., LOZIER, G., RODRIGUEZ, S. R., ATALA, A. & SOKER, S. 2011. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology*, 53, 604-617.
- BARKER, N., HUCH, M., KUJALA, P., VAN DE WETERING, M., SNIPPERT, H. J., VAN ES, J. H., SATO, T., STANGE, D. E., BEGTHEL, H. & VAN DEN BORN, M. 2010. Lgr5+ ve stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell stem cell*, 6, 25-36.
- BENAGIANO, G. & BROSENS, I. 2012. The endometrium in adenomyosis. *Women's Health*, 8, 301-312.
- BERGERON, C., AMANT, F. & FERENCZY, A. 2006. Pathology and physiopathology of adenomyosis. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 20, 511-521.
- BERTHOIS, Y., KATZENELLENBOGEN, J. A. & KATZENELLENBOGEN, B. S. 1986. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83, 2496-2500.
- BHATIA, S. N. & INGBER, D. E. 2014. Microfluidic organs-on-chips. *Nature biotechnology*, 32, 760-772.
- BHISE, N. S., MANOHARAN, V., MASSA, S., TAMAYOL, A., GHADERI, M., MISCUGLIO, M., LANG, Q., ZHANG, Y. S., SHIN, S. R. & CALZONE, G. 2016. A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids. *Biofabrication*, 8, 014101.
- BOKOR, A., DEBROCK, S., DRIJKONINGEN, M., GOOSSENS, W., FÜLÖP, V. & D'HOOGE, T. 2009. Quantity and quality of retrograde menstruation: a case control study. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7, 1-7.
- BORETTO, M., COX, B., NOBEN, M., HENDRIKS, N., FASSBENDER, A., ROOSE, H., AMANT, F., TIMMERMAN, D., TOMASSETTI, C., VANHIE, A., MEULEMAN, C., FERRANTE, M. & VANKELECOM, H. 2017. Development of organoids from mouse and human endometrium

showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability. *Development*, 144, 1775-1786.

- BORETTO, M., MAENHOUDT, N., LUO, X., HENNES, A., BOECKX, B., BUI, B., HEREMANS, R., PERNEEL, L., KOBAYASHI, H., VAN ZUNDERT, I., BREMS, H., COX, B., FERRANTE, M., UJI, I. H., KOH, K. P., D'HOOGE, T., VANHIE, A., VERGOTE, I., MEULEMAN, C., TOMASSETTI, C., LAMBRECHTS, D., VRIENS, J., TIMMERMAN, D. & VANKELECOM, H. 2019. Patient-derived organoids from endometrial disease capture clinical heterogeneity and are amenable to drug screening. *Nat Cell Biol*, 21, 1041-1051.
- BOWEN, N. J., LOGANI, S., DICKERSON, E. B., KAPA, L. B., AKHTAR, M., BENIGNO, B. B. & MCDONALD, J. F. 2007. Emerging roles for PAX8 in ovarian cancer and endosalpingeal development. *Gynecologic oncology*, 104, 331-337.
- BULUN, S. E. 2013. Uterine fibroids. *New England Journal of Medicine*, 369, 1344-1355.
- BURNEY, R. O., TALBI, S., HAMILTON, A. E., VO, K. C., NYEGAARD, M., NEZHAT, C. R., LESSEY, B. A. & GIUDICE, L. C. 2007. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology*, 148, 3814-3826.
- CLEVERS, H. 2016. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*, 165, 1586-1597.
- D'HOOGE, T. M. & DEBROCK, S. 2002. Endometriosis, retrograde menstruation and peritoneal inflammation in women and in baboons. *Human reproduction update*, 8, 84-88.
- DELIGDISH, L. & LOEWENTHAL, M. 1970. Endometrial changes associated with myomata of the uterus. *Journal of Clinical Pathology*, 23, 676-680.
- DUTTA, D., HEO, I. & CLEVERS, H. 2017. Disease modeling in stem cell-derived 3D organoid systems. *Trends in molecular medicine*, 23, 393-410.
- EIRAKU, M., WATANABE, K., MATSUO-TAKASAKI, M., KAWADA, M., YONEMURA, S., MATSUMURA, M., WATAYA, T., NISHIYAMA, A., MUGURUMA, K. & SASAI, Y. 2008. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell stem cell*, 3, 519-532.
- FATEHULLAH, A., TAN, S. H. & BARKER, N. 2016. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nature cell biology*, 18, 246-254.
- GAO, D., VELA, I., SBONER, A., IAQUINTA, P. J., KARTHAUS, W. R., GOPALAN, A., DOWLING, C., WANJALA, J. N., UNDVALL, E. A. & ARORA, V. K. 2014. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell*, 159, 176-187.

- GIUDICE, L. C. 2010. Endometriosis. *New England Journal of Medicine*, 362, 2389-2398.
- GJOREVSKI, N., SACHS, N., MANFRIN, A., GIGER, S., BRAGINA, M. E., ORDÓÑEZ-MORÁN, P., CLEVERS, H. & LUTOLF, M. P. 2016. Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature*, 539, 560-564.
- GREENDALE, G. A., LEE, N. P. & ARRIOLA, E. R. 1999. The menopause. *The Lancet*, 353, 571-580.
- HAIDER, S., MEINHARDT, G., SALEH, L., KUNIHS, V., GAMPERL, M., KAINDL, U., ELLINGER, A., BURKARD, T. R., FIALA, C. & POLLHEIMER, J. 2018. Self-renewing trophoblast organoids recapitulate the developmental program of the early human placenta. *Stem cell reports*, 11, 537-551.
- HERNANDEZ-GORDILLO, V., KASSIS, T., LAMPEJO, A., CHOI, G., GAMBOA, M. E., GNECCO, J. S., BROWN, A., BREault, D. T., CARRIER, R. & GRIFFITH, L. G. 2020. Fully synthetic matrices for in vitro culture of primary human intestinal enteroids and endometrial organoids. *Biomaterials*, 254, 120125.
- HUCH, M., KNOBLICH, J. A., LUTOLF, M. P. & MARTINEZ-ARIAS, A. 2017. The hope and the hype of organoid research. *Development*, 144, 938-941.
- KESSLER, M., HOFFMANN, K., BRINKMANN, V., THIECK, O., JACKISCH, S., TOELLE, B., BERGER, H., MOLLENKOPF, H.-J., MANGLER, M. & SEHOULI, J. 2015. The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids. *Nature communications*, 6, 1-11.
- KLEINMAN, H. K. & MARTIN, G. R. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in cancer biology*, 2005. Elsevier, 378-386.
- KOPPER, O., DE WITTE, C. J., LOHMUSSAAR, K., VALLE-INCLAN, J. E., HAMI, N., KESTER, L., BALGOBIND, A. V., KORVING, J., PROOST, N., BEGTHEL, H., VAN WIJK, L. M., REVILLA, S. A., THEEUWSEN, R., VAN DE VEN, M., VAN ROOSMALEN, M. J., PONSIOEN, B., HO, V. W. H., NEEL, B. G., BOSSE, T., GAARENSTROOM, K. N., VRIELING, H., VREESWIJK, M. P. G., VAN DIEST, P. J., WITTEVEEN, P. O., JONGES, T., BOS, J. L., VAN OUDENAARDEN, A., ZWEEMER, R. P., SNIPPERT, H. J. G., KLOOSTERMAN, W. P. & CLEVERS, H. 2019. An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity. *Nat Med*, 25, 838-849.
- LANCASTER, M. A. & KNOBLICH, J. A. 2014. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, 345.
- LEE, G. Y., KENNY, P. A., LEE, E. H. & BISSELL, M. J. 2007. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nature methods*, 4, 359-365.

- LI, M. L., AGGELER, J., FARSON, D. A., HATIER, C., HASSELL, J. & BISSELL, M. J. 1987. Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 136-140.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. 2019a. Befruchtung und Frühentwicklung. In: LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. (eds.) *Taschenlehrbuch Histologie*. 6., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. 2019b. Uterus. In: LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. (eds.) *Taschenlehrbuch Histologie*. 6., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.
- MARTIN-IBANEZ, R., UNGER, C., STRÖMBERG, A., BAKER, D., CANALS, J. & HOVATTA, O. 2008. Novel cryopreservation method for dissociated human embryonic stem cells in the presence of a ROCK inhibitor. *Human reproduction*, 23, 2744-2754.
- MASTERS, J. R. 2002. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer*, 2, 315-319.
- MAYBIN, J. A. & CRITCHLEY, H. O. 2015. Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond. *Human reproduction update*, 21, 748-761.
- MEOLA, J., E SILVA, J. C. R., DENTILLO, D. B., DA SILVA JR, W. A., VEIGA-CASTELLI, L. C., DE SOUZA BERNARDES, L. A., FERRIANI, R. A., DE PAZ, C. C. P., GIULIATTI, S. & MARTELLI, L. 2010. Differentially expressed genes in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Fertility and sterility*, 93, 1750-1773.
- MITTAG, J., WINTERHAGER, E., BAUER, K. & GRUMMER, R. 2007. Congenital hypothyroid female pax8-deficient mice are infertile despite thyroid hormone replacement therapy. *Endocrinology*, 148, 719-725.
- MORICE, P., LEARY, A., CREUTZBERG, C., ABU-RUSTUM, N. & DARAI, E. 2016. Endometrial cancer. *The Lancet*, 387, 1094-1108.
- NAKANO, T., ANDO, S., TAKATA, N., KAWADA, M., MUGURUMA, K., SEKIGUCHI, K., SAITO, K., YONEMURA, S., EIRAKU, M. & SASAI, Y. 2012. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell stem cell*, 10, 771-785.
- NNOAHAM, K. E., HUMMELSHOJ, L., WEBSTER, P., D'HOOGHE, T., DE CICCIO NARDONE, F., DE CICCIO NARDONE, C., JENKINSON, C., KENNEDY, S. H., ZONDERVAN, K. T. & STUDY, W. E. R. F. G. 2011. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertility and sterility*, 96, 366-373. e8.
- OBERMAIR, A., GERAMOU, M., GUCER, F., DENISON, U., GRAF, A. H., KAPSHAMMER, E., NEUNTEUFEL, W., FRECH, I., KAIDER, A. &

- KAINZ, C. 2000. Does hysteroscopy facilitate tumor cell dissemination? Incidence of peritoneal cytology from patients with early stage endometrial carcinoma following dilatation and curettage (D & C) versus hysteroscopy and D & C. *Cancer*, 88, 139-143.
- OZCAN, A., SHEN, S. S., HAMILTON, C., ANJANA, K., COFFEY, D., KRISHNAN, B. & TRUONG, L. D. 2011. PAX 8 expression in non-neoplastic tissues, primary tumors, and metastatic tumors: a comprehensive immunohistochemical study. *Modern Pathology*, 24, 751-764.
- PARK, S. E., GEORGESCU, A. & HUH, D. 2019. Organoids-on-a-chip. *Science*, 364, 960-965.
- PHAM, M. T., POLLOCK, K. M., ROSE, M. D., CARY, W. A., STEWART, H. R., ZHOU, P., NOLTA, J. A. & WALDAU, B. 2018. Generation of human vascularized brain organoids. *Neuroreport*, 29, 588.
- RACKOW, B. W. & TAYLOR, H. S. 2010. Submucosal uterine leiomyomas have a global effect on molecular determinants of endometrial receptivity. *Fertility and sterility*, 93, 2027-2034.
- RAMATHAL, C. Y., BAGCHI, I. C., TAYLOR, R. N. & BAGCHI, M. K. Endometrial decidualization: of mice and men. *Seminars in reproductive medicine*, 2010. NIH Public Access, 17.
- RAVI, M., PARAMESH, V., KAVIYA, S. R., ANURADHA, E. & SOLOMON, F. D. 2015. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol*, 230, 16-26.
- ROBERT KOCH INSTITUT. 2020. *Gesundheitliche Lage der Frauen in Deutschland* [Online]. Berlin: Robert Koch Institut. Available: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/Gesundheitliche_Lage_der_Frauen_2020.pdf?__blob=publicationFile [Accessed 17.01.2021].
- ROSSI, G., MANFRIN, A. & LUTOLF, M. P. 2018. Progress and potential in organoid research. *Nature Reviews Genetics*, 19, 671-687.
- SACHS, N., DE LIGT, J., KOPPER, O., GOGOLA, E., BOUNOVA, G., WEEBER, F., BALGOBIND, A. V., WIND, K., GRACANIN, A. & BEGTHEL, H. 2018. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity. *Cell*, 172, 373-386. e10.
- SASAKI, M., KATO, Y., YAMADA, H. & TERADA, S. 2005. Development of a novel serum-free freezing medium for mammalian cells using the silk protein sericin. *Biotechnology and applied biochemistry*, 42, 183-188.
- SATO, T. & CLEVERS, H. 2015. SnapShot: growing organoids from stem cells. *Cell*, 161, 1700-1700. e1.
- SATO, T., VRIES, R. G., SNIPPERT, H. J., VAN DE WETERING, M., BARKER, N., STANGE, D. E., VAN ES, J. H., ABO, A., KUJALA, P. & PETERS, P. J. 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459, 262-265.

- SETIAWAN, V. W., YANG, H. P., PIKE, M. C., MCCANN, S. E., YU, H., XIANG, Y.-B., WOLK, A., WENTZENSEN, N., WEISS, N. S. & WEBB, P. M. 2013. Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? *Journal of Clinical Oncology*, 31, 2607.
- SKARDAL, A., SHUPE, T. & ATALA, A. 2016. Organoid-on-a-chip and body-on-a-chip systems for drug screening and disease modeling. *Drug discovery today*, 21, 1399-1411.
- SPENCE, J. R., MAYHEW, C. N., RANKIN, S. A., KUCHAR, M. F., VALLANCE, J. E., TOLLE, K., HOSKINS, E. E., KALINICHENKO, V. V., WELLS, S. I. & ZORN, A. M. 2011. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*, 470, 105-109.
- STOWELL, S. B., WILEY, C. M., PEREZ-REYES, N. & POWERS, C. N. 1997. Cytologic diagnosis of peritoneal fluids. Applicability to the laparoscopic diagnosis of endometriosis. *Acta cytologica*, 41, 817-822.
- TAKASATO, M., ER, P., BECROFT, M., VANSLAMBROUCK, J. M., STANLEY, E., ELEFANTY, A. G. & LITTLE, M. H. 2014. Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney. *Nature cell biology*, 16, 118-126.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. 2014. *Recovery Cell Culture Freezing Medium* [Online]. Available: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F12648010_cell_culture_freeze_media_PI.pdf&title=UmVjb3ZlcnkgQ2VsbCBGcmVlemluZyBNZWZWRpYQ== [Accessed 09.02.2021].
- THOMAS, C. 2004. *Histopathologie kompakt: Kursbuch der allgemeinen und speziellen Histopathologie*, Schattauer Verlag.
- THOMSON, J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S. S., WAKNITZ, M. A., SWIERGIEL, J. J., MARSHALL, V. S. & JONES, J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *science*, 282, 1145-1147.
- TONG, G.-X., WOOJIN, M. Y., BEAUBIER, N. T., WEEDEN, E. M., HAMELEBENA, D., MANSUKHANI, M. M. & O'TOOLE, K. M. 2009. Expression of PAX8 in normal and neoplastic renal tissues: an immunohistochemical study. *Modern Pathology*, 22, 1218-1227.
- TURCO, M. Y., GARDNER, L., HUGHES, J., CINDROVA-DAVIES, T., GOMEZ, M. J., FARRELL, L., HOLLINSHEAD, M., MARSH, S. G. E., BROSENS, J. J., CRITCHLEY, H. O., SIMONS, B. D., HEMBERGER, M., KOO, B. K., MOFFETT, A. & BURTON, G. J. 2017. Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nat Cell Biol*, 19, 568-577.
- TURCO, M. Y., GARDNER, L., KAY, R. G., HAMILTON, R. S., PRATER, M., HOLLINSHEAD, M. S., MCWHINNIE, A., ESPOSITO, L., FERNANDO, R., SKELTON, H., REIMANN, F., GRIBBLE, F. M., SHARKEY, A.,

- MARSH, S. G. E., O'RAHILLY, S., HEMBERGER, M., BURTON, G. J. & MOFFETT, A. 2018. Trophoblast organoids as a model for maternal-fetal interactions during human placentation. *Nature*, 564, 263-+.
- ULRICH, U., BUCHWEITZ, O., GREB, R., KECKSTEIN, J., VON LEFFERN, I., OPPELT, P., RENNER, S., SILLEM, M., STUMMVOLL, W. & DE WILDE, R.-L. 2014. National German guideline (S2k): Guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis: long version—AWMF Registry No. 015-045. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 74, 1104.
- VAN DE WETERING, M., FRANCIES, H. E., FRANCIS, J. M., BOUNOVA, G., IORIO, F., PRONK, A., VAN HOUDT, W., VAN GORP, J., TAYLOR-WEINER, A. & KESTER, L. 2015. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell*, 161, 933-945.
- VINCI, M., GOWAN, S., BOXALL, F., PATTERSON, L., ZIMMERMANN, M., LOMAS, C., MENDIOLA, M., HARDISSON, D. & ECCLES, S. A. 2012. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC biology*, 10, 29.
- WALLACH, E. E. & VLAHOS, N. F. 2004. Uterine myomas: an overview of development, clinical features, and management. *Obstetrics & Gynecology*, 104, 393-406.
- WANG, Y., KIM, R., GUNASEKARA, D. B., REED, M. I., DISALVO, M., NGUYEN, D. L., BULTMAN, S. J., SIMS, C. E., MAGNESS, S. T. & ALLBRITTON, N. L. 2018a. Formation of human colonic crypt array by application of chemical gradients across a shaped epithelial monolayer. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 5, 113-130.
- WANG, Y., WANG, L., ZHU, Y. & QIN, J. 2018b. Human brain organoid-on-a-chip to model prenatal nicotine exposure. *Lab on a Chip*, 18, 851-860.
- XIAO, S., COPPETA, J. R., ROGERS, H. B., ISENBERG, B. C., ZHU, J., OLALEKAN, S. A., MCKINNON, K. E., DOKIC, D., RASHEDI, A. S. & HAISENLEDER, D. J. 2017. A microfluidic culture model of the human reproductive tract and 28-day menstrual cycle. *Nature communications*, 8, 1-13.

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde an der Universitätsfrauenklinik Tübingen, Department für Frauengesundheit unter Betreuung von Frau Prof. Dr. med. K. Katharina Rall durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau Prof. Dr. med. Katharina Rall (Leiterin der Kinder- und Jugendgynäkologie) und Herr Dr. rer. nat. André Koch (Laborleiter des Forschungsinstitutes für Frauengesundheit).

Die Kultivierung der Organoidlinien, sowie sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. André Koch unter Zuarbeit einer MTA, Frau Sabine Hofmeister, von mir eigenständig durchgeführt. Das Einbetten der Organoide in Paraffin, sowie die HE-Färbung der Objektträger wurden von einer MTA, Frau Ingrid Teufel, durchgeführt. Die Gewebeproben wurden vom Institut für Pathologie zur Verfügung gestellt. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Annette Staebler (Oberärztin mit Bereichsleitung Gynäkologische Pathologie) wurden die immunhistochemischen Färbungen durch Frau Karen Greif durchgeführt. Die Befundung der Zytologien erfolgte durch die ZTAs Frau Mayer-Pfanner und Frau Amann.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch Frau PD Dr. Birgitt Schönfisch durch mich. Alle im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigten Abbildungen und Tabellen wurden von mir eigenständig erstellt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Ort, Datum

Lilija Kern

8 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich sehr über die Möglichkeit einer Promotion an der Universitätsfrauenklinik Tübingen bedanken.

Mein Dank gilt vor allem Prof. Katharina Rall, deren außerordentliche Betreuung diese Promotion möglich gemacht hat, sowie Dr. rer. nat. André Koch, welcher mir das wissenschaftliche Arbeiten nähergebracht hat. Ich bedanke mich für die sehr lehrreichen und konstruktiven Gespräche, die mich äußerst positiv und nachhaltig geprägt haben.

Weiterhin möchte ich Frau Ingrid Teufel, Frau Hofmeister, Frau Mayer-Pfanner und Frau Amann für ihre tatkräftige Unterstützung in der Umsetzung dieses Projektes danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann Ilja Kern und Frau Angelina Röchner, die mich seit Beginn des Studiums stets motivierten, Zweifel zunichtemachten und immer an mich geglaubt haben, ohne euch wäre ich nicht so weit gekommen – Danke!

Ein abschließendes Dankeschön gilt meinen Eltern, die mir diesen Weg überhaupt ermöglicht haben und mich in allen Lebenslagen unterstützen und bekräftigen.

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausgangsnährmedium 0 für Endometrium Organoide.....	14
Tabelle 2 Endgültiges Nährmedium E für Endometrium Organoide	15
Tabelle 3: Nährmedium EC für Endometriumkarzinom Organoide.....	15
Tabelle 4: Zusammensetzung der Nährmedien A, B und C	17
Tabelle 5: Eingeschlossenes Patientenkollektiv	20
Tabelle 6: Angesetzte Organoidkulturen	22
Tabelle 7: Zusammensetzung der getesteten Nährmedien 0, A, B und C bezogen auf die unterschiedlichen Wachstumsfaktoren.	30
Tabelle 8: Durchschnittswerte der Anzahl Organoide pro Matrixtropfen der Linie #Myo_02.....	32
Tabelle 9: Durchschnittswerte der Anzahl Organoide pro Matrixtropfen der Linie #Inter_03.....	39
Tabelle 10: Durchschnittswerte der Anzahl Organoide pro Matrixtropfen der Linie #Abort_02	42
Tabelle 11: Übersicht der angesetzten Gewebeproben aus Endometriumkarzinomen.....	46
Tabelle 12: Übersicht der angesetzten Proben aus Patientinnen mit Endometriose und Eigenschaften.....	48

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentuale Verteilung aller eingeschlossenen Diagnosen	21
Abbildung 2: Gewebeprobe mit Anteilen von Endometrium und Myometrium: .	22
Abbildung 3: Schritte der Gewebeverarbeitung	23
Abbildung 4: Aufbau einer Organoidkultur	23
Abbildung 5: Primäransatz der Organoidkultur #Abort_04 zum Zeitpunkt des Ausplattierens.....	24
Abbildung 6: Wachstumsverlauf der Linie #Abort_04 an Passage 0 (P0)	25
Abbildung 7: Wachstum und Alterung von Organoiden am Beispiel der Linie #Desc_02	26
Abbildung 8: Bodenwachstum und Aufbruch der dreidimensionalen Architektur eines Organoids am Beispiel der Linie #Myo_04	27
Abbildung 9: Wachstum von Fibroblasten innerhalb einer Organoidkultur	27
Abbildung 10: Wachstumsverlauf der Organoidlinie #Myo_02	28
Abbildung 11: Wachstum der Linie #Myo_02 in verschiedenen Nährmedien (0, A, B, C).....	31
Abbildung 12: Anzahl Organoide in Abhängigkeit vom verwendeten Nährmedium.....	32
Abbildung 13: Wachstum der Linie #Myo_02 in verschiedenen Nährmedien (A, B, B*)	34
Abbildung 14: Wachstum der Organoidkultur #Myo_02 in Nährmedium A*	35
Abbildung 15: Gewebeprobe eines Abradates, Maßstab 1 cm.....	37
Abbildung 16: Wachstum der Linie #Inter_03 in verschiedenen Nährmedien (A, B, C)	38
Abbildung 17 Wachstum der Linie #Inter_03 in verschiedenen Nährmedien (B, B*)	39

Abbildung 18: Wachstum der Linie #Abort_02 in verschiedenen Nährmedien (A, B, C)	41
Abbildung 19 Wachstum der Linie #Abort_02 in verschiedenen Nährmedien (B, B*)	42
Abbildung 20: Organoide verschiedener Gewebeproben in Kultur.....	43
Abbildung 21: Aufbau eines Organoids mit Vergleich zum Originalgewebe der Linie #Myo_02	44
Abbildung 22: PAX8 Färbung eines Organoids am Beispiel der Linie #Abort_01	44
Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung der Hormonrezeptoren ER und PR von Organoiden und Originalgewebe	45
Abbildung 24: Wachstumsverlauf der Endometriumkarzinom-Linie #E-Ca_03	47
Abbildung 25: Douglaszytologie mit markiertem Zellpellet	47
Abbildung 26: Wachstumsverlauf der Endometriose Linie #Endo_02	48
Abbildung 27: Wachstumsverlauf der Endometriose Linie #Endo_05.2	49
Abbildung 28: Ausschnitte von Zytologiepräparaten mit adenoiden Zellverbänden.....	50