

Aus dem
Department für Frauengesundheit
Universitäts-Frauenklinik

**Das Endometrium in Uterus-Rudimenten von
Patientinnen mit Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-
Syndrom – Etablierung und Charakterisierung eines
Organoid-Modells sowie Analyse klinischer Daten**

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

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

**vorgelegt von
Pietzsch, Martin**

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Brucker

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Bakchoul

3. Berichterstatter: Professor Dr. S. Becker

Tag der Disputation: 21.05.2025

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung.....	11
1.1 Embryologische Entwicklung des weiblichen Genitaltrakts	12
1.2 Klinische Aspekte des MRKH-Syndroms	15
1.3 Diagnostik und Therapie des MRKH-Syndroms.....	17
1.3.1 Diagnostik.....	17
1.3.2 Therapie	17
1.3.2.1 Neovagina-Verfahren	17
1.3.2.2 Uterus-Transplantation.....	19
1.4 Ätiologie des MRKH-Syndroms.....	21
1.4.1 Umweltfaktoren und Vererbung	21
1.4.2 Chromosomale Aberrationen und Kandidatengen-Ansatz.....	22
1.4.2.1 Anti-Müller-Hormon und die Gruppe der HOX-Gene.....	22
1.4.2.2 Die WNT-Familie.....	23
1.4.2.3 LHX1, TBX6 und weitere CNVs	24
1.4.3 Epigenetik und die Hormonrezeptor-Hypothese	25
1.5 Organoide	28
1.5.1 Organoide als Modell.....	28
1.5.2 Endometriumorganoide	29
1.5.3 Matrigel.....	31
1.6 Fragestellung und Zielsetzung	32
2 Material und Methoden	34
2.1 Patientenkollektiv für die Etablierung patientenabgeleiteter Organoidmodelle.....	34
2.1.1 Einverständniserklärung und Ethikvotum.....	34
2.1.2 MRKHS-Gruppe und Gewebe	34
2.1.3 Hormonprofil und Zyklusphasen des MRKHS-Patientinnenkollektivs	35

2.1.4	Kontroll-Gruppe und Gewebe	35
2.2	Patientenkollektiv für die Auswertung von Operations- und Pathologieberichten	36
2.3	Verwendetes Material.....	37
2.3.1	Gerätschaften	37
2.3.1.1	CO ₂ -Inkubator	37
2.3.1.2	Lichtmikroskop	37
2.3.2	Verbrauchsmaterialien	37
2.4	Methoden und Protokolle	40
2.4.1	Verarbeitung von Patientengewebe zum Ansetzen einer Organoid-Zellkultur	40
2.4.1.1	Inhaltsstoffe und Ansetzen des Lysepuffers.....	40
2.4.2	Nährmedium zur Kultivierung von Endometrium-Organoid-Linien in Well-Platten	41
2.4.2.1	Verwendung von konditioniertem Medium (CM)	41
2.4.2.2	Inhaltsstoffe des Kulturnährmediums Version 1	42
2.4.2.3	Inhaltsstoffe des Kulturnährmediums Version 2.....	42
2.4.2.4	Inhaltsstoffe des Kulturnährmediums Version 3.....	43
2.4.2.5	Inhaltsstoffe des Kulturnährmediums für Experimente.....	43
2.4.3	Umsetzen einer Organoid-Zellkultur	44
2.4.3.1	Verdau mit TrypLE	44
2.4.3.2	Mechanische Zerkleinerung	44
2.4.4	Einfrieren und Auftauen von Organoid-Kulturen	45
2.4.5	Formalin-Fixierung und Konservierung von Organoiden	46
2.4.6	Paraffin-Einbettung der konservierten Organoiden.....	47
2.4.7	Schnitt-Anfertigung der Organoid-Kulturen	47
2.4.8	Entparaffinierung der Organoid-Kulturen	48
2.4.9	Immunhistochemische Färbungen der Organoid-Schnitte.....	48
2.4.10	Anfertigung von Immunfluoreszenz-Färbungen.....	48
2.4.10.1	Verwendete Antikörper	49

2.4.11	Dezidualisierung von Organoid-Kulturen	50
2.4.12	Kultivierung und Dezidualisierung von HESC.....	51
2.4.13	RNA-Isolierung	52
2.4.14	cDNA-Synthese	52
2.4.15	Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).....	53
2.4.15.1	Verwendete Primer	53
2.4.15.2	Statistische Auswertung der qPCR-Daten.....	54
2.4.16	Statistische Auswertung von Operations- und Pathologie- Berichten für Patientinnen mit MRKH-Syndrom.....	55
3	Ergebnisse.....	57
3.1	Etablierung von Endometrium-Organoidkulturen	57
3.1.1	Etablierung von Organoiden aus MRKHS-Gewebe	57
3.1.2	Etablierung von Organoiden aus Kontrollgewebe.....	60
3.2	Optimierung der Kultivierungsmethoden für eine erfolgreiche Etablierung des Endometrium-Organoidmodells.....	61
3.2.1	Umsetzen von Organoidkulturen	61
3.2.2	Fibroblasten-ähnliche Zellen im Erstanatz einer Kultur.....	62
3.2.3	Kulturnährmedium und Mediumoptimierung	63
3.3	Wachstum der MRKHS-Organoiden	67
3.4	Dezidualisierung von MRKHS-Organoiden	73
3.4.1	Aufbau des Experimentes und Kollektiv	73
3.4.2	Hormonwerte und Zyklusphasen	74
3.4.3	Lichtmikroskopischer Verlauf.....	75
3.4.4	Expressionsveränderungen von Markergenen	81
3.4.4.1	Progesteron assoziiertes endometriales Protein (PAEP)	82
3.4.4.2	17-beta-Hydroxy-Steroiddehydrogenase (17-HSD)	84
3.4.4.3	Osteopontin (SPP1)	87
3.4.4.4	SOX9	90
3.4.4.5	Mucin (MUC1).....	93
3.4.5	Schnitte, immunhistochemische und immunfluoreszierende Färbungen	96

3.4.5.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von MRKHS- und Kontrollorganoiden	96
3.4.5.2	Färbung von ERa, PR, MIB1 und PAX8 an MRKHS- und Kontrollorganoiden sowie Gewebeschnitten	97
3.4.5.3	Färbung von Panzytokeratin und Perlecan an MRKHS- Organoiden.....	101
3.4.6	Überprüfung des verwendeten Progesterons in der 2D-Zellkultur 102	
3.4.6.1	Prolaktin	102
3.4.6.2	Insulin growth factor binding protein 1.....	104
3.5	Analyse von Patienteneigenschaften und Uterus-Rudimenten	106
4	Diskussion	111
4.1	Etablierung von Endometrium-Organoidkulturen aus MRKHS- und Kontrollgewebe	111
4.2	Optimierung der Kultivierung von Endometrium-Organoiden	113
4.3	Wachstum der MRKHS-Organoiden	114
4.4	MRKHS-Organoiden zeigen keine Hinweise auf eine gestörte Hormonrezeptorfunktion.....	116
4.4.1	Vergleich der Expressionsveränderung von Markergenen für MRKHS- und Kontroll-Kulturen	117
4.4.2	Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit früheren Erkenntnissen zu MRKHS-Stromazellen	119
4.5	Uterus-Rudimente und mögliche Unterschiede zwischen MRKHS- Subtypen.....	122
4.6	Konklusion, Limitationen und Ausblick	125
5	Zusammenfassung	127
6	Literaturverzeichnis.....	129
7	Erklärung zum Eigenanteil	141
8	Veröffentlichungen.....	143
9	Danksagung.....	144

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

ABBILDUNG 1 DAUER DER HORMONELLEN STIMULATION FÜR DIE DREI GRUPPEN EXM, E2 UND P4.....	50
ABBILDUNG 2 INTRAOPERATIV ENTFERNTES UTERUSRUDIMENT.....	58
ABBILDUNG 3 ERSTANSATZ EINER MRKHS-ORGANOIDKULTUR.....	59
ABBILDUNG 4 ERSTANSATZ AUS GEWEBE OHNE MAKROSKOPISCHES ENDOMETRIUM.....	60
ABBILDUNG 5 KONTROLLGEWEBE VOR DER VERARBEITUNG	61
ABBILDUNG 6 UMSETZEN EINER ORGANOID-LINIE.	62
ABBILDUNG 7 FIBROBLASTEN-ÄHNLICHE ZELLEN IN DEN ORGANOIDKULTUREN.	63
ABBILDUNG 8 WACHSTUM DER ORGANOIDE UNTER KULTURNÄHRMEDIUM VERSION 1.	64
ABBILDUNG 9 WIEDERANSETZEN VON ORGANOIDEN UNTER KULTURNÄHRMEDIUM 1.	65
ABBILDUNG 10 UNTERSCHIEDE IN DER ORGANOID-ANZAHL AN TAG 6 NACH KULTIVIERUNG MIT NM 1 ODER NM 2.	66
ABBILDUNG 11 SELBSTORGANISATION EINES ENDOMETRIALEN DRÜSENSTÜCKS ZU EINEM ORGANOID UND WACHSTUM ÜBER MEHRERE TAGE.....	67
ABBILDUNG 12 WACHSTUMSVERLAUF EINES ERSTANSATZES EINER MRKHS-ORGANOID-KULTUR VON TAG 1 BIS TAG 10	68
ABBILDUNG 13 WACHSTUMSVERLAUF EINER KONTROLL-KULTUR NACH EINER ERSTEN PASSAGIERUNG VON TAG 1 BIS TAG 13.....	69
ABBILDUNG 14 SCHRUMPFEN UND VERDUNKELUNG GRÖßERER ORGANOIDE NACH CA. 8 TAGEN.....	70
ABBILDUNG 15 LICHTMIKROSKOPISCHE MORPHOLOGIE VON MRKHS-ORGANOIDEN.....	71
ABBILDUNG 16 WACHSTUMSGESCHWINDIGKEIT VON MRKHS-ORGANOIDEN.	72
ABBILDUNG 17 LICHTMIKROSKOPISCHER VERLAUF EINES DEZIDUALISIERUNGSEXPERIMENTS EINER MRKHS-ORGANOIDKULTUR.....	76
ABBILDUNG 18 LICHTMIKROSKOPISCHER VERLAUF EINES DEZIDUALISIERUNGSEXPERIMENTS AM BEISPIEL EINER KONTROLL-ORGANOIDLINIE.	77
ABBILDUNG 19 AUSWIRKUNG DER STIMULATION AUF DIE MORPHOLOGIE EINES EINZELNEN ORGANOIDS AM BEISPIEL DER KONTROLLORGANOIDLINIE 44.	78
ABBILDUNG 20 ORGANOIDDURCHMESSER EINER MRKHS-LINIE AM ENDE EINES DEZIDUALISIERUNGSEXPERIMENTS.....	79
ABBILDUNG 21 ORGANOIDDURCHMESSER EINER KONTROLL-LINIE AM ENDE EINES DEZIDUALISIERUNGSEXPERIMENTS.....	80
ABBILDUNG 22 RELATIVE EXPRESSIONSVERÄNDERUNG FÜR DAS GEN PAEP IN DEN ORGANOIDKULTUREN.....	83
ABBILDUNG 23 RELATIVE EXPRESSIONSVERÄNDERUNG FÜR DAS GEN 17HSD IN DEN ORGANOIDKULTUREN.....	86

ABBILDUNG 24 RELATIVE EXPRESSIONSVERÄNDERUNG FÜR DAS GEN SPP1 IN DEN ORGANOIDKULTUREN.....	89
ABBILDUNG 25 RELATIVE EXPRESSIONSVERÄNDERUNG FÜR DAS GEN SOX9 IN DEN ORGANOIDKULTUREN.....	92
ABBILDUNG 26 RELATIVE EXPRESSIONSVERÄNDERUNG FÜR DAS GEN MUC1 IN DEN ORGANOIDKULTUREN.....	94
ABBILDUNG 27 HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNGEN VON ORGANOIDEN EINER MRKHS- (LINKS) UND KONTROLL-LINIE (RECHTS).....	96
ABBILDUNG 28 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN DER MARKER ERA, PR, MIB1 UND PAX8 AN GEWEBESCHNITTEN, SOWIE UNSTIMULIERTEN UND STIMULIERTEN ORGANOIDEN EINER EXEMPLARISCHEN MRKHS-LINIE.....	99
ABBILDUNG 29 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN DER MARKER ERA, PR, MIB1 UND PAX8 AN GEWEBESCHNITTEN, SOWIE UNSTIMULIERTEN UND STIMULIERTEN ORGANOIDEN EINER EXEMPLARISCHEN KONTROLL-LINIE.	100
ABBILDUNG 30 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG EINER EXEMPLARISCHEN MRKHS-LINIE FÜR DIE MARKER PANZYTOKERATIN (GRÜNE FLUORESCENZ) UND PERLECAN (ROTE FLUORESCENZ).....	101
ABBILDUNG 31 RELATIVE EXPRESSION VON PROLAKTIN IN HESC, DIE MIT PROGESTERON (P4) ODER MPA STIMULIERT WURDEN.	103
ABBILDUNG 32 RELATIVE EXPRESSION VON IGFBP1 IN HESC, DIE MIT PROGESTERON (P4) ODER MPA STIMULIERT WURDEN.....	104
ABBILDUNG 33 VERTEILUNG VON UTERUS-RUDIMENTEN IN VERSCHIEDENEN MRKHS-SUBGRUPPEN.	107
ABBILDUNG 34. VOLUMEN DER UTERUS-RUDIMENTE.....	109

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN VERBRAUCHSMATERIALIEN	37
TABELLE 2 KULTURNÄHRMEDIUM VERSION 1	42
TABELLE 3 KULTURNÄHRMEDIUM VERSION 2	42
TABELLE 4 KULTURNÄHRMEDIUM VERSION 3	43
TABELLE 5 KULTURNÄHRMEDIUM FÜR DEZIDUALISIERUNGSEXPERIMENTE.	43
TABELLE 6 ÜBERSICHT ÜBER DIE FÜR DIE IMMUNFLUORESCENZ VERWENDETEN ANTIKÖRPER.	49
TABELLE 7 ÜBERSICHT ÜBER DIE IN DER QPCR VERWENDETEN PRIMER-SEQUENZEN.....	54
TABELLE 8 MRKHS-PATIENTENGRUPPE, BEI DER DIE ENTNAHME VON GEWEBEPROBEN ZUR ETABLIERUNG VON ORGANOIDKULTUREN ERFOLGTE.	58
TABELLE 9 ALTER UND EIGENSCHAFTEN DER VERWENDETEN MRKHS-KULTUREN.	73
TABELLE 10 ALTER UND DIAGNOSEN DER VERWENDETEN KONTROLLKULTUREN.	74

TABELLE 11 LABORCHEMISCH GEMESSENE HORMONKONZENTRATIONEN IM BLUT VON MRKHS-PATIENTINNEN AM TAG VOR DER OP.....	75
TABELLE 12 HISTOLOGISCH ODER ANAMNESTISCH FESTGESTELLTE ZYKLUSPHASE DER KONTROLL-PATIENTINNEN.....	75
TABELLE 13 DICKE DER RANDSTÄNDIGEN ZELLSCHICHT IN ORGANOIDEN NACH HORMONELLER STIMULATION.	81
TABELLE 14 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT UND RELATIVE EXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN (EFC) IN DER MRKHS-KOHORTE FÜR PAEP	83
TABELLE 15 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT UND RELATIVE EXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN (EFC) IN DER KONTROLL-KOHORTE FÜR PAEP.....	84
TABELLE 16 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT UND RELATIVE EXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN (EFC) IN DER MRKHS-KOHORTE FÜR 17HSD	86
TABELLE 17 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT UND RELATIVE EXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN (EFC) IN DER KONTROLL-KOHORTE FÜR 17HSD	87
TABELLE 18 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT UND RELATIVE EXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN (EFC) IN DER MRKHS-KOHORTE FÜR SPP1.....	89
TABELLE 19 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT UND RELATIVE EXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN (EFC) IN DER KONTROLL-KOHORTE FÜR SPP1	90
TABELLE 20 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT UND RELATIVE EXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN (EFC) IN DER MRKHS-KOHORTE FÜR SOX9	92
TABELLE 21 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT UND RELATIVE EXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN (EFC) IN DER KONTROLL-KOHORTE FÜR SOX9.....	93
TABELLE 22 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT UND RELATIVE EXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN (EFC) IN DER MRKHS-KOHORTE FÜR MUC1.....	95
TABELLE 23 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT UND RELATIVE EXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN (EFC) IN DER KONTROLL-KOHORTE FÜR MUC1	95
TABELLE 24 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT UND RELATIVE EXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN (EFC) DER HESC-KULTUREN FÜR PROLAKTIN.....	103
TABELLE 25 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT UND RELATIVE EXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN (EFC) DER HESC-KULTUREN FÜR IGFBP1.....	105
TABELLE 26 PATIENTENEIGENSCHAFTEN UND JEWEILIGE HÄUFIGKEIT VON UTERUS-RUDIMENTEN.....	108
TABELLE 27 EIGENSCHAFTEN ALLER PATIENTINNEN MIT RUDIMENT-ENTFERNUNG, JEWEILIGES DURCHSCHNITTLICHES RUDIMENT-VOLUMEN UND HÄUFIGKEIT VON ENDOMETRIUM IN DEN JEWEILIGEN PATIENTINNEN.....	110

Abkürzungsverzeichnis

17-HSD	17-beta-Hydroxy-Steroiddehydrogenase
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
Abb.	Abbildung
advDMEM/F12	advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
AMH	Anti-Müller-Hormon
ANOVA	One-way analysis of variance
BSA	Bovines Serum-Albumin
BME	Basement Membrane Extract
BMP	Bone morphogenetic protein
CAIS	Complete Androgen Insensitivity Syndrome
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CNV	Copy Number Variation
CK	Zytokeratin
CM	Conditioned medium
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	Cycle threshold
d	Durchmesser
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCC-FBS	Dextran-coated charcoal-treated fetal bovine serum
DES	Diethylstilbestrol
DHEAS	Dehydroepiandrosteron
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNase	Doppelstrangspezifische DNase
E2	17β-Estradiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor

ESR1/ER α	Estrogenrezeptor alpha
EFC	Expression fold change
ExM	Expansionsmedium
Exp.-ExM	Experimente-Expansionsmedium
FAI	Freier Androgen-Index
FBS/FCS	Fetales Kälberserum
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FGF10	Fibroblast growth factor 10
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GALT	Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferase
h	Höhe
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HESC/ESC	Humane endometriale Stromazellen
HGF	Hepatocyte growth factor
HKG	Housekeeping gene
HOX	Homöobox
ID	Identifikator
IGFBP-1	Insulin-like growth factor binding protein 1
IPS	Induzierte pluripotente Stammzellen
IVF	In-vitro-Fertilisation
Lgr5	Leucin-reicher G-Protein-gekoppelter Rezeptor 5
LH	Luteinisierendes Hormon
LHX1 (Lim 1)	LIM Homeobox 1
L-WRN	Modifizierte L-Zelllinie, die WNT3a, R Spondin und Noggin sezerniert
MIB1	Mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1
miRNA	Micro Ribonukleinsäure
MPA	Medroxyprogesteronacetat
MRKH	Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser
MRKHS	Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-Syndrom
MRT	Magnetresonanztomographie

MUC1	Muzin
MURCS	Müllerian duct aplasia, renal aplasia, and cervicothoracic somite dysplasia
NM	Nährmedium
OLFM4	Olfactomedin 4
OP	Operation
P4	Progesteron
P	Passage
Pax	Paired-box
PAEP	Progesteragen assoziiertes endometriales Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
P(G)R	Progesteronrezeptor
PRL	Prolaktin
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Revolutions per minute (deutsch: Umdrehungen pro Minute)
SEM	Standard error of the mean (deutsch: Standardfehler)
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
SOX9	SRY-Box Transkriptionsfaktor 9
SPP1	Sekretiertes Phosphoprotein 1
SRY	Sex determining region of Y
T	Tag
Tab.	Tabelle
TBX	T-Box Transkriptionsfaktor
TGFβ	Transforming Growth Factor β
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WNT	Wingless/Integrated

1 Einleitung

Als Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-Syndrom (MRKH-Syndrom, MRKHS) wird eine von Geburt an vorhandene Aplasie des Uterus, der Zervix und der oberen zwei Drittel der Vagina bei Frauen mit einem normalen weiblichen 46, XX-Karyotyp bezeichnet. Zugrunde liegend ist eine Unterbrechung der normalen embryonalen Entwicklung des weiblichen Genitaltraktes im ersten Trimester der Schwangerschaft (4.-12. Woche), wobei es zu einer Hemmungsfehlbildung der Müllerschen Gänge (Ductus paramesonephricus) kommt [128]. Da die Ovarien in der Regel funktionstüchtig sind, zeigen die Patientinnen einen sonst unauffälligen weiblichen Phänotyp mit regelrecht ausgebildetem äußerlichem Genitale und unauffälligen sekundären Geschlechtsmerkmalen [19]. Das MRKH-Syndrom tritt mit einer Inzidenz von einer aus 4.500 weiblichen Lebendgeburten auf [1, 38, 63] und stellt mit 15-20% die zweithäufigste Ursache für eine primäre Amenorrhoe dar [19, 63].

1.1 Embryologische Entwicklung des weiblichen Genitaltrakts

Zum besseren Verständnis der Fehlbildungen, die dem MRKH-Syndrom zugrunde liegen, soll an dieser Stelle ein kurzer Überblick über die embryologische Entwicklung des weiblichen Genitaltrakts gegeben werden.

Mit der fünften Fetalwoche beginnt in einem Embryo die Entwicklung der zunächst undifferenzierten Gonaden. Zuerst verdickt sich das Zölomepithel und Mesenchym medial der Mesonephros und formt die paarigen Gonadenleisten. In der 6. Fetalwoche wandern die primordialen Keimzellen (Urkeimzellen) entlang des dorsalen Mesenteriums des Hinterdarms in das Mesenchym der Gonadenleisten ein [78]. Während ihrer Ankunft kommt es durch weitere Proliferation des Zölomepithels zur Ausbildung der Keimstränge. Diese formen sich aus primordialen Keimzellen, dem Mesothel der hinteren Abdominalwand und dem angrenzenden Mesenchym [78]. Dieser Zustand wird auch als indifferente Gonadenanlage bezeichnet, da noch nicht zwischen männlich und weiblich unterschieden werden kann. Bei Männern kommt es durch die Sex determining region des Y-Chromosoms zur Expression des SRY-Proteins, welches die Ausbildung von Sertoli- und Leydigzellen und damit eine männliche Differenzierung der Gonadenanlage bewirkt [78, 129]. In Abwesenheit eines Y-Chromosoms entstehen bei Frauen aus dem Kortex der indifferenten Gonadenanlage die sekundären Keimstränge, während die primären Keimstränge degenerieren. Die sekundären Keimstränge stellen das Reservoir für die primordialen Keimzellen dar, wobei ungefähr ab der 10. Fetalwoche erstmals das Ovar abgegrenzt werden kann [78, 129].

Für die Entstehung der inneren Geschlechtsorgane sind paarige, zunächst indifferente Gangsysteme verantwortlich. Die Müller-Gänge (Ductus paramesonephricus) entwickeln sich in ihrer ersten Phase in der siebten Fetalwoche als eine fokale Einstülpung des Zölomepithels am oberen Pol des Mesonephros [78]. In ihrer zweiten Phase wachsen die paarigen Müller-Gänge nach kaudal bis zum Sinus urogenitalis und überkreuzen dabei jeweils den Ductus mesonephricus (Wolff-Gang), so dass sie in der achten Fetalwoche medial davon liegen [78] und bis in das Becken reichen. Dort kommt es nun zur Fusion der beiden Müllerschen Gänge [78, 129].

Während die erste Entwicklungsphase der Müller-Gänge mit Invagination des Zölomepithels unabhängig von den Wolff-Gängen verläuft, scheint für ihre Elongation nach kaudal die Präsenz der Wolff-Gänge unabdingbar zu sein, auch wenn die Wolff-Gänge keine Zellen zur Entwicklung der Müller-Gänge beitragen [131]. So führte die selektive Inaktivierung von LHX1/Lim1 in den Wolff-Gängen im Mausmodell zu einem Entwicklungsstopp derselben und konsekutiv zu einer unvollständigen Entwicklung der Müller-Gänge [99, 131]. WNT9B, ein sezerniertes Glykoprotein und Mitglied der WNT-Familie, wird in der Embryonalphase im Epithel der Wolff-Gänge exprimiert. Sein Knockout führt im Mausmodell zu einem Ausbleiben des Wachstums der Müller-Gänge nach kaudal bei erhaltener Entwicklung der Wolff-Gänge [27]. WNT9B scheint daher als Signal der Zellen der Wolff-Gänge für die zweite Phase des Wachstums der Müller-Gänge notwendig zu sein [27, 131].

Ab diesem Punkt trennt sich die weitere Entwicklung abhängig vom Geschlecht. Bei Männern führt das Testosteron aus den Leydig-Zellen des Hodens zur weiteren Ausdifferenzierung der paarigen Wolff-Gänge zum Nebenhoden, den Samenleitern und Samenbläschen. Die Müller-Gänge hingegen degenerieren durch das Anti-Müller-Hormon, das von den Sertoli-Zellen im Hoden gebildet wird [129].

Hingegen kommt es bei Frauen durch das Fehlen des SRY-Gens zur weiteren Ausdifferenzierung der Müller-Gänge [129]. Die nicht-verschmolzenen kranialen Anteile der Müller-Gänge entwickeln sich zu den späteren Tuben, wobei die Spitze des jeweiligen Ganges offen zur späteren Peritonealhöhle bleibt und den Fimbrientrichter bildet [78, 120, 129]. Im oberen Bereich der verschmolzenen Gänge bildet sich der spätere Uterus, wobei das enthaltene Mesoderm für die Bildung von Myometrium und Endometrium verantwortlich ist [78, 120]. Die kaudalen Anteile der fusionierten Gänge formen die oberen zwei Drittel der Vagina. Zunächst besteht noch eine mediane Zwischenwand der Müller-Gänge im Bereich des Cavum uteri, die sich normalerweise um die 20. Woche zurückbildet. Sollte dies nicht der Fall sein, kann ein septierter Uterus entstehen [78, 120]. Das untere Drittel der Vagina entwickelt sich aus dem Sinus urogenitalis und entsteht daher unabhängig von den Müller-Gängen [152]. Durch

das Fehlen von Androgenen degenerieren die Wolff-Gänge bei Frauen bis zum dritten Monat, wobei funktionslose Überbleibsel wie der Gartner-Gang vorhanden bleiben [78, 129].

Fehler im Vorgang der Verschmelzung der Müller-Gänge in der 4. bis 12. Schwangerschaftswoche, welcher auch als „Müllerian Organogenesis“ bezeichnet wird [78], können zu einer Vielzahl an Fehlbildungen des weiblichen Genitaltraktes führen [129, 152]. Diese werden als Müller-Gang-Anomalien zusammengefasst und haben eine Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung von bis zu 6,7% [29, 154]. Auch das MRKH-Syndrom zählt als Hemmungsfehlbildung der Müller-Gänge mit konsekutiver Aplasie von Uterus und Vagina zu dieser Gruppe.

Sowohl der Genitaltrakt als auch die Nieren entstehen aus intermediärem Mesoderm, wodurch ihre Entwicklung embryologisch eng gekoppelt ist. Das intermediäre Mesoderm steht zudem in nahem räumlichen Bezug zum paraxialen Mesoderm, aus dem die Bildung der Somiten und damit auch die späteren Wirbelkörper, Rippen und Muskeln hervorgehen [70]. Hierbei scheint es auch funktionelle Abhängigkeiten zu geben, so führte die einseitige Unterbrechung des Kontakts zwischen dem intermediären und paraxialen Mesoderm zu einem Ausbleiben der Entwicklung der Niere auf dieser Seite bei Hühnerembryonen [113]. Der enge Bezug dieser Systeme erklärt, wieso Fehlbildungen des Genitaltraktes häufig mit renalen oder skelettalen Anomalien einhergehen können.

1.2 Klinische Aspekte des MRKH-Syndroms

Durch die funktionierenden Ovarien zeigen Patientinnen mit MRKH-Syndrom weibliche Hormonspiegel, die mit denen von gesunden Gleichaltrigen vergleichbar sind [19, 162]. Eine Hyperandrogenämie scheint dabei signifikant häufiger bei MRKH-Patientinnen aufzutreten, meist ohne klinische Zeichen wie Hirsutismus [79, 130]. Durch die weiblichen Hormone weisen die sekundären Geschlechtsmerkmale (Brustwachstum und Schambehaarung) der Patientinnen eine regel- und zeitgerechte Entwicklung auf und auch das äußere Genitale mit Labien und Klitoris ist normal entwickelt [19, 38]. Die Vagina entspricht jedoch meist nur einem vaginalen Grübchen von variabler Länge (0,1 - 6 cm), welches häufig von einem hypoplastisch bis normal ausgeprägten Hymenalsaum bedeckt wird [19].

Als Folge der Hemmungsfehlbildung kommt es zur Ausbildung eines nur rudimentären Uterus, meist in Form von ein bis zwei Uterusknospen jeweils am proximalen Tubenende. Diese Uterusknospen werden bis zu mehreren Zentimetern groß und können neben Myometrium auch endometriales Gewebe beinhalten [147]. Die Beschränkung der Malformation auf das innere Genitale verzögert häufig die Diagnosestellung und Patientinnen werden oftmals erst durch eine primäre Amenorrhoe ohne Unterbauchbeschwerden im Jugendalter oder eine unzureichende bis fehlende Kohabitationsfähigkeit auffällig [19].

Bezüglich der Manifestation werden zwei verschiedene Typen des MRKH-Syndroms unterschieden: Typ I ist charakterisiert durch eine isolierte Aplasie bzw. Hypoplasie von Uterus und Vagina. Typ II hingegen ist mit zusätzlichen nicht-genitalen Fehlbildungen assoziiert, wobei die Häufigkeitsangaben für diese Form des MRKH-Syndroms für Patientenkohorten aus Zentraleuropa in der Literatur von 35,2% bis zu 53% reichen [82, 126, 128, 140, 149]. Oftmals betreffen die assoziierten Deformitäten das Nierensystem, bspw. in Form einer einseitigen Nierenagenesie, einer Beckeniere oder einer Doppelniere [128]. Am zweithäufigsten sind skelettale Fehlbildungen, welche vorwiegend die Wirbelsäule (Skoliose, Blockwirbel und das Klippel-Feil-Syndrom [164]), aber auch das Gesicht (faziale Asymmetrie [191]) und die Extremitäten (bspw.

Ektrodaktylie [111], fehlender Radius [6], Brachymesophalangie [163]) betreffen können [126, 128, 141].

In selteneren Fällen werden auch Mittel- oder Innenohrdeformitäten wie Stapesankylose [43] und/oder Schwerhörigkeit [165], sowie kardiale Fehlbildungen wie Pulmonalstenosen [100], Fallot-Tetralogie [109] oder atriale Septumdefekte [60] beobachtet.

In 5-15% [141, 149] der Fälle liegen sowohl renale als auch skelettale Veränderungen kombiniert mit einer uterovaginalen Aplasie vor. In diesen Fällen spricht man auch von einer MURCS-Assoziation (Aplasie der Müllerschen Gänge, Nierenaplasie und Dysplasie der zervikothorakalen Somiten). Diese komplexe Kombination wird auf mögliche Veränderungen im Blastem der Vornieren-Gänge (Pronephros) und der zervikothorakalen Somiten zurückgeführt, da diese eine enge räumliche Beziehung gegen Ende der 4. Embryonalwoche aufweisen [50]. Veränderungen zu diesem Zeitpunkt könnten sowohl die Entwicklung der Wirbelkörper, Rippen und oberen Extremitäten beeinflussen, als auch zu Nierenfehlbildungen und einer Müller-Gang-Aplasie führen [50, 74].

Interessanterweise ergab eine Studie von Pan et al. aus dem Jahr 2016, welche eine Kohorte von 594 chinesischen MRKHS-Patientinnen analysierte, eine deutlich geringere Rate an assoziierten Fehlbildungen. Lediglich 43 der 594 Patientinnen (7.2%) wiesen assoziierte Malformationen auf, wobei Nierenfehlbildungen am häufigsten vorkamen [133]. Eine andere Studie von Wang et al. (2017) wiederum ergab eine Fehlbildungsrate von 46% innerhalb einer chinesischen Kohorte von 92 MRKHS-Patientinnen [182]. Dies unterstreicht vor allem die Heterogenität des MRKH-Syndroms, wobei geographische bzw. ethnische Unterschiede sowohl bezüglich der Häufigkeit assoziierter Fehlbildungen als auch hinsichtlich der zugrunde liegenden Ätiologie anhand der genannten Daten möglich erscheinen.

1.3 Diagnostik und Therapie des MRKH-Syndroms

1.3.1 Diagnostik

Der unauffällige weibliche Phänotyp und die Beschränkung der Fehlbildungen auf den inneren Genitaltrakt führen dazu, dass das MRKH-Syndrom im Rahmen der Vorsorgeuntersuchungen im Kindes- und Jugendalter meist unentdeckt bleibt [19]. Der erste Kontakt mit dem Gynäkologen oder der Gynäkologin erfolgt daher wie bereits erwähnt in den meisten Fällen im Jugendalter wegen einer primären Amenorrhoe oder einer fehlenden Kohabitationsfähigkeit [19, 38]. Patientinnen mit MRKH-Syndrom weisen hierbei bei der körperlichen Untersuchung und anamnestisch eine altersgerechte Thelarche und Adrenarche auf und dürfen deshalb nicht aufgrund der Amenorrhoe als Fälle verzögerter Pubertät (Pubertas tarda) abgestempelt werden [38, 84]. Neben einer vaginalen Untersuchung sowie abdominalen und rektalen Sonographie sollte bei Patientinnen mit Verdacht auf MRKH-Syndrom eine Magnetresonanztomographie des Urogenitalbereichs erfolgen, um mögliche assoziierte renale Fehlbildungen zu diagnostizieren [19, 126]. Bei Hinweisen auf eventuelle skelettale Anomalien, ist auch eine weitere Diagnostik diesbezüglich anzudenken. Zur Abgrenzung gegenüber Differentialdiagnosen wie der kompletten Androgenresistenz (CAIS; Karyotyp 46 XY) sollte standardmäßig auch eine Bestimmung der Hormonspiegel und des Karyotyps erfolgen [19, 126].

1.3.2 Therapie

1.3.2.1 Neovagina-Verfahren

Bei der Therapie des MRKH-Syndroms zur Rekonstruktion der Vagina wird zwischen operativen und nicht-operativen Verfahren unterschieden. Ziel dieser Verfahren ist die Bildung einer Neovagina, die den Patientinnen ein normales Sexualleben ermöglicht.

Die nicht-operative Therapie der Wahl ist dabei die Dilatation des bestehenden Vaginalrübchens, entweder durch die Patientin selbst mit einem entsprechenden Dilatator oder über Geschlechtsverkehr. Beide Varianten bedürfen dabei einer sehr regelmäßigen Anwendung über einen längeren

Zeitraum, um zufriedenstellende Ergebnisse hervorzubringen [26]. Dies setzt eine gewisse Reife und hohe Selbstdisziplin seitens der Patientin voraus [26]. Aufgrund der geringen Komplikationsrate und oftmals erreichten funktionellen Zufriedenheit wird die eigenständige Dilatation häufig als Therapie der ersten Wahl empfohlen [30, 38]. Zudem schließt ein vorangegangener eigenständiger Dilatationsversuch bei Misserfolg eine anschließende erfolgreiche operative Korrektur in der Regel nicht aus [26].

Zur operativen Therapie steht eine Reihe verschiedener Verfahren zur Verfügung. Neovagina-Anlagen, die auf Traktion beruhen, scheinen dabei die höchsten anatomischen und funktionellen Erfolgsraten aufzuweisen [26]. Ein solches wird auch an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen mit der laparoskopischen, modifizierten Methode nach Vecchiotti standardmäßig durchgeführt. Hierbei erfolgt die Dehnung einer Neovagina durch Einbringung einer Olive, die durch subperitoneal verlaufende Fäden an einem Spannapparat an der Bauchdecke befestigt ist. Durch tägliches Nachspannen der Fäden erfolgt hierbei innerhalb von durchschnittlich fünf Tagen die Bildung einer Neovagina, bevor der Spannapparat wieder entfernt wird [20]. Postoperativ ist noch mehrere Monate lang das Tragen eines Vaginalphantoms notwendig, um einer postoperativen Verklebung und Verkürzung der gedehnten Neovagina entgegenzuwirken. Der große Vorteil dieser Technik ist dabei die hohe Erfolgsrate bei wenigen Komplikationen [20, 26]. Zudem wird die geschaffene Neovagina vom Körper vom Scheideneingang aus mit physiologischem Vaginalepithel ausgekleidet und zeigt eine natürliche Lubrikation, wodurch sich praktisch keine funktionellen Unterschiede zu einer natürlichen Vagina ergeben.

Ein anderes Verfahren ist die Methode nach McIndoe. Hierbei wird chirurgisch ein Kanal zwischen Blase und Rektum geschaffen, der anschließend mittels zuvor entnommener Spalthaut ausgekleidet wird [114]. Nachteil der Methode ist dabei der Entnahmedefekt mit möglicher Narbenbildung sowie eine erhöhte Rate an postoperativen Stenosebildungen der Neovagina [26]. Als Alternative zur Spalthaut wurden in der Vergangenheit auch bereits Amnionmembranen [18, 192] oder autogene Mundschleimhaut [108] verwendet.

Als weitere Möglichkeit wird Darm zur Schaffung einer Neovagina verwendet. Durchgesetzt hat sich dabei am ehesten die Nutzung von Sigma-Segmenten [65], während man in der Vergangenheit auch auf Teile des Ileums oder Jejunums zurückgriff [55, 94]. Vorteil dieser Technik ist dabei die fehlende Notwendigkeit der postoperativen Phantomanwendung sowie die natürliche zum Teil aber leider auch exzessive Lubrikation durch den sezernierten Mucus. Jedoch bestehen die typischen Risiken einer Darm-Operation wie Anastomoseninsuffizienz, postoperativem Ileus oder Stenosierung [26] sowie ein erhöhtes Entartungsrisiko [61, 158]. Ein ausgeprägter und übelriechender vaginaler Ausfluss wird zudem oftmals als störend berichtet [118].

1.3.2.2 Uterus-Transplantation

Nach langer Forschung am Tiermodell mit Versuchen an Mäusen [54], Schweinen [189], Schafen [46] und letztlich Primaten [11, 56] konnten Brännström et al. 2014 erstmalig eine Fallserie von neun erfolgreichen Uterus-Transplantationen am Menschen publizieren (darunter acht Frauen mit MRKH-Syndrom), wobei in zwei Fällen das Transplantat innerhalb einer 6 monatigen Follow-Up-Phase wieder entnommen werden musste [12]. Zwar hatte es bereits vorher einzelne Versuche von Uterus-Transplantationen am Menschen geben, bei diesen kam es aber entweder zu Komplikationen im Follow-Up mit darauffolgender Entnahme des Organs [59] oder zu Frühaborten beim Versuch einer Schwangerschaft [57]. Aus der Patientenkohorte von Brännström et al. erfolgte im September 2014 die weltweit erste Lebendgeburt nach Uterus-Transplantation bei einer Frau mit MRKH-Syndrom [13]. Mittlerweile sind international mehr als 80 Uterus-Transplantationen erfolgt, mit über 40 erfolgreichen Lebendgeburten [16, 17, 92]. Die erste Lebendgeburt nach Transplantation der Gebärmutter einer hirntoten Spenderin fand dabei 2017 in Brasilien statt [52]. Die ersten Uterus-Transplantationen Deutschlands wurden im Oktober 2016 und Juni 2017 in der Universitäts-Frauenklinik Tübingen an zwei MRKHS-Patientinnen durchgeführt [21], wobei im Jahr 2019 die ersten beiden erfolgreichen Lebendgeburten berichtet werden konnten. Stand März 2024 wurden in Tübingen insgesamt sieben Uterus-Transplantationen durchgeführt mit bislang fünf erfolgreichen Lebendgeburten.

Die Frauen erhalten dabei 12 bis 14 Monate nach der Transplantation bei vorausgegangener IVF einen Embryotransfer und müssen auch für die Dauer der Schwangerschaft Immunsuppressiva einnehmen [13, 15]. Die Geburt der Kinder erfolgt in der Regel durch eine Sectio caesarea [14]. Spätestens nach einer zweiten Schwangerschaft sollte die Hysterektomie der Patientinnen durchgeführt werden, um die Immunsuppression absetzen zu können und mögliche Langzeitfolgen zu vermeiden [14].

Die Uterus-Transplantation stellt damit für Frauen, die an einer absoluten uterinen Infertilität leiden, insbesondere für Patientinnen mit MRKH-Syndrom, eine einzigartige Möglichkeit dar, eigene Kinder zu bekommen. Auch wenn die Transplantation einen enormen Aufwand mit langer Operationsdauer und nicht zu unterschätzenden Risiken für Spender (im Falle von Lebendspende) und Empfänger darstellt [2], scheint das Interesse bei MRKHS-Patientinnen an dieser neuen Therapieoption groß zu sein [32].

1.4 Ätiologie des MRKH-Syndroms

1.4.1 Umweltfaktoren und Vererbung

Der ursächliche Pathomechanismus des MRKH-Syndroms scheint die ausbleibende Verschmelzung und Hemmung der Müllerschen Gänge in der 4.-12. Schwangerschaftswoche zu sein, wodurch die Ausbildung des Uterus, der Cervix und des oberen Teils der Vagina ausbleibt. Da das MRKH-Syndrom in den meisten Fällen sporadisch auftritt, wurden zu Beginn Umweltfaktoren wie eine Exposition zu Thalidomid-artigen Teratogenen [50, 85] diskutiert. Schwangerschaftsberichte konnten jedoch keine Assoziation zu Krankheiten oder bekannten Teratogenen nachweisen [74].

Weil das MRKH-Syndrom neben sporadischen Fällen auch familiäre Häufungen [81] zeigt, wird mittlerweile eine genetische Ursache vermutet. Untersuchungen an den familiären Fällen des MRKH-Syndroms weisen auf eine weitervererbte Prädisposition hin, jedoch konnte bis heute noch kein klares Vererbungsmuster festgestellt werden. Die wahrscheinlichste Option für die familiären Fälle scheint eine autosomal-dominante Vererbung mit unvollständiger Penetranz und variabler Expressivität zu sein als Erklärung für die variablen phänotypischen Äußerungen [64, 74, 81, 121]. Die hohe Anzahl an Patienten ohne weitere betroffene Familienmitglieder lässt allerdings auch eine multifaktorielle Pathogenese möglich erscheinen [28, 81, 188]. Dabei sollten jedoch auch mögliche Informationsdefizite wie die ausbleibende Diagnose asymptotisch betroffener Familienangehöriger mit nur minimalen Anomalien bedacht werden, was einer der Gründe für die Seltenheit einer gesicherten familiären Häufung sein könnte. So wurden in betroffenen Familien sowohl Fälle von MRKHS Typ I als auch MRKHS Typ II beschrieben [64, 81]. In manchen Familien wurden von Verwandten auch andere, oftmals asymptotische, uterovaginale Malformationen berichtet [64, 73, 81, 134], was Parallelen bezüglich der Ätiologie nahelegt. Beides unterstreicht die Variabilität der Expressivität des MRKH-Syndroms sogar innerhalb desselben Stammbaumes.

1.4.2 Chromosomale Aberrationen und Kandidatengen-Ansatz

Die genaue Ätiologie des MRKH-Syndroms ist weiterhin unklar. Für einen kleineren Teil der Patientinnen wurden chromosomale Aberrationen berichtet, die unter anderem die Chromosomen 1, 4-5, 7-8, 10, 13, 16-17, 22 und X betreffen und ursächlich für die Fehlbildung sein könnten [7, 64, 106, 124, 143]. Der Großteil der MRKH-S-Patientinnen weist allerdings einen normalen 46, XX Karyotypen auf [74]. Daher wurden in der Vergangenheit verschiedene Kandidatengene untersucht, die eine Rolle in der Pathogenese spielen könnten.

So wurde beispielsweise eine Mutation in der Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferase (GALT) mit konsekutiv verringerter Aktivität und erhöhter intrauteriner Exposition zu Galaktose mit der Entstehung des MRKH-Syndroms in Verbindung gebracht [42], nachdem gezeigt wurde, dass eine erhöhte Galaktose-Exposition in Ratten zu einer verzögerten Öffnung der Vagina führt [31]. Jedoch scheint keine Mutation oder Polymorphismus der GALT mit dem MRKH-Syndrom assoziiert zu sein [97]. Untersuchungen bezüglich einer möglichen Assoziation mit Mutationen im Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) erbrachten ebenfalls kein positives Ergebnis [171].

1.4.2.1 Anti-Müller-Hormon und die Gruppe der HOX-Gene

In der Folge wurden vor allem Kandidatengene analysiert, die eine wichtige Rolle in der frühen embryonalen Entwicklung spielen. So wurde beispielsweise das Anti-Müller-Hormon (AMH) und sein Rezeptor (AMHR), die beide notwendig sind für die Rückbildung der Müllerschen Gänge in männlichen Feten [93], als mögliche Ursache untersucht. Die bisherigen Studien konnten jedoch keine genetischen Polymorphismen und auch keine erhöhten AMH-Serumspiegel in Patientinnen mit MRKH-Syndrom nachweisen [125, 151]. Ebenfalls als Kandidaten galt die Gruppe der HOX-Gene, welche für Transkriptionsfaktoren codieren, die eine große Bedeutung für die Organogenese und Gliederung des Körpers in der Embryonalphase, insbesondere des Skeletts und des Urogenitaltrakts, innehaben [53, 87]. Für die Entwicklung des weiblichen Genitaltrakts sind hierbei vor allem HOXA9 (für die Tubenentwicklung) und

HOXA10 (für die Entwicklung des Uterus), sowie HOXA11 (für die unteren Uterusanteile und Cervix) und HOXA13 (für die Ektozervix und oberen Anteile der Vagina) wichtig [49, 127]. Ein Knock-out oder eine Frameshift-Mutation dieser Gene führt in Mausmodellen zu Fehlbildungen des Reproduktionstraktes [25, 69, 145, 183]. Es konnten jedoch keine pathogenen Mutationen bei MRKHS-Patientinnen festgestellt werden [25, 104].

1.4.2.2 Die WNT-Familie

Aus der WNT-Familie, einer Gruppe von Genen deren Produkte großen Einfluss auf die interzelluläre Kommunikation in der Embryogenese haben [135, 187], konnte für WNT4, das für die vollständige Ausbildung der Müllerschen Gänge und Differenzierung der weiblichen Gonaden notwendig ist [174], in einer kleinen Subgruppe von MRKHS-Patientinnen verschiedene Defekte als Ursache nachgewiesen werden [8, 137, 138]. Zwar scheint die Festlegung von Vorläuferzellen der Müllerschen Gänge im Mausmodell unabhängig von WNT4 zu verlaufen, ein Knockout führt allerdings bei beiden Geschlechtern zu einem Ausbleiben der Formierung der Müller-Gänge [98, 99, 174]. WNT4 unterdrückt zudem normalerweise die Ausbildung von Testosteron-produzierenden Leydig-Zellen in den Ovarien [174]. Ein Ausfall von WNT4 führt daher neben einer Müllerschen Aplasie auch zu Hyperandrogenämie in den Patientinnen [8, 137, 138], wodurch sich dieser Phänotyp vom klassischen MRKH-Syndrom als eigene klinische Entität differenziert. Bei betroffenen Frauen ohne klinische Hyperandrogenämie, dem überwiegenden Teil der MRKHS-Patientinnen, lässt sich daher meist keine WNT4-Mutation als Ursache finden [34, 48, 150].

Ein weiteres Mitglied der WNT-Familie, WNT9B, ist aufgrund seiner Rolle in der Entwicklung des weiblichen Genitaltrakts ebenfalls von Interesse. Carroll et al. (2005) konnten in einem Mausmodell nachweisen, dass WNT9B bei beiden Geschlechtern in den Epithelzellen der Wolffschen Gänge exprimiert wird und Upstream von WNT4 in der Entwicklung des Urogenitaltrakts wirkt [27]. Seine Expression ist dabei essentiell für die Bildung der Tubuli des Mesonephros und Metanephros und die Verlängerung der Müllerschen Gänge nach kaudal [27]. WNT9B-Knockout-Mäuse zeigen daher einen Phänotyp, dem bei Weibchen der

untere Teil der Müllerschen Gänge und damit große Teile der Tube, der Uterus und der obere Teil der Vagina fehlt, wobei die Ovarien aber funktionsfähig sind [27]. Aufgrund der Parallelen dieses Phänotypus mit dem MRKH-Syndrom bei Menschen wurde auch WNT9B als mögliches Kandidatengen untersucht. Eine Studie an 42 chinesischen Patientinnen (Han-Ethnie) mit MRKH-Syndrom konnte hierbei zwei heterozygote Mutationen in WNT9B bei einer Patientin feststellen [181]. Im Gegensatz dazu fand eine Untersuchung an 542 chinesischen Patientinnen mit Müller-Gang-Anomalien keine höhere Frequenz von Mutationen oder Variationen in WNT9B im Vergleich zu gesunden Kontrollen [167] (darunter waren auch 34 Patientinnen mit Agenesie des Uterus, wobei keine klare Einordnung bezüglich eines möglichen MRKH-Syndroms erfolgte). In einer Studie an einer kaukasischen Kohorte von u.a. 109 Patientinnen mit MRKH-Syndrom (59 mit Typ 1, 50 mit Typ 2) wiederum konnten Waschke et al. (2016) eine Nonsense und vier Missense Mutationen bei fünf Frauen mit MRKHS Typ 1 feststellen [184]. Bei zwei dieser Patientinnen war in früheren Studien bereits eine Deletion im Gen für LHX1 bzw. eine Missense Mutation in TBX6 gefunden worden [106, 170, 184], was eine digenische Krankheitsursache für diese Fälle als möglich erscheinen lässt.

1.4.2.3 LHX1, TBX6 und weitere CNVs

Eine bei einigen Patientinnen gefundene Mikrodeletion betrifft die Region 17q12 [7, 124]. Das in diesem Bereich liegende Gen LHX1 (auch als Lim1 bekannt) codiert für einen Transkriptionsfaktor und wird in der Embryonalphase sowohl in den Wolff-Gängen als auch den Müllerschen Gängen exprimiert [88, 99]. Seine Inaktivierung führt im Mausmodell bei Weibchen zu einer Wachstumshemmung der Müllerschen Gänge mit funktionierenden Ovarien, verkürzter Tube, hypoplastischem Uterus und fehlender Cervix & oberer Vagina [88, 99], was es als mögliches Kandidaten-Gen interessant macht. Die Funktion von LHX1 scheint dabei zellautonom für die Formierung des Epithels der Müllerschen Gänge und der Wolff-Gänge von Nöten und seine Expression in den Vorläuferzellen der Müllerschen Gänge unabhängig von PAX2, WNT7a und WNT4 zu sein [99]. LHX1 ^{-/-} Knockout-Mäuse weisen zudem fehlende Nieren und keine Entwicklung der vorderen Kopfstrukturen auf, weshalb der Großteil

während der Embryonalphase verstirbt und nur wenige als Totgeburt auf die Welt kommen [161]. Mehrere Studien konnten mittlerweile Missense- und Frame-shift Mutationen in LHX1 als mögliche Ursache bei kleineren Gruppen von MRKHS-Patientinnen nachweisen [106, 107, 153].

Eine zweite mit dem MRKH-Syndrom assoziierte Mikrodeletion liegt bei 16p11.2 und beinhaltet u.a. das Gen T-Box Transkriptionsfaktor 6 (TBX6) [124, 153]. TBX6 spielt eine wichtige Rolle für die Differenzierung des paraxialen Mesoderms [186], weshalb Funktionsverluste von TBX6 mit verschiedenen Malformationen der Wirbelsäule wie beispielsweise kongenitaler Skoliose assoziiert sind [132]. Eine herunterregulierte Genexpression in einem homozygoten *Tbx6^{iv}* (*rip-vertebrae*) Mausmodell führt zu einem Phänotyp mit skelettalen Anomalien, reduzierter weiblicher Fruchtbarkeit und teilweise einseitiger Nierenaplasie [153, 169, 185]. Eine Reihe an Varianten im Gen für TBX6 scheint mit Anomalien der Müllerschen Gänge assoziiert zu sein [153, 169, 170]. In zwei Studien von Tewes et al. (2015 & 2019) traten möglicherweise krankheitsursächliche Sequenzvarianten im TBX6-Gen allerdings nur bei fünf von 292 Patientinnen (~ 1,7%) mit Müller-Gang-Anomalien auf [169, 170].

Pontecorvi et al. (2021) untersuchten in einer weiteren Studie eine Kohorte von 35 italienischen MRKHS-Patientinnen hinsichtlich möglicher ursächlicher genetischer Veränderungen. Hierbei zeigten sich bei 9 Patientinnen (25%) sogenannte Kopienzahlvariationen (englisch Copy Number Variations, CNVs), also Abweichungen der Kopienzahl für ein Gen vom Referenzgenom. Durch Netzwerk-Analysen von Protein-Interaktionsdaten ist es mittlerweile möglich, die dabei festgestellten veränderten Gen-Regionen in einen biologischen Kontext zu setzen. Hierbei zeigte sich, dass zahlreiche veränderte Gene über verschiedene Wege mit der Entwicklung von anatomischen Strukturen in Verbindung stehen [143].

1.4.3 Epigenetik und die Hormonrezeptor-Hypothese

Die Untersuchung diverser Kandidaten-Gene konnte bisher keine genetischen Defekte oder Polymorphismen aufzeigen, die in einer größeren Anzahl von Patientinnen reproduzierbar gewesen wäre. Die Publikation einiger Fälle

diskordanter monozygoter Zwillinge mit MRKH-Syndrom [51, 148] lässt auch epigenetische Mechanismen oder Gewebe-spezifische Mosaik als mögliche Ursachen erscheinen. Rall et al. (2011) konnten anhand eines kombinierten Transkriptom-Methylom-Ansatzes zeigen, dass eine Reihe von Genen, die für die Entwicklung des weiblichen Genitaltraktes wichtig sind, in den Uterus-Rudimenten von MRKHS-Patientinnen anders exprimiert sind [146]. Unter diesen Genen war neben HOXA5 und HOXA9 auch der Östrogen- (ESR1) und der Progesteronrezeptor (PGR), die beide im uterinen Gewebe höher exprimiert waren als bei gesunden Kontrollen [146]. Rall et al. führen diesen Umstand der Hochregulierung auf einen möglichen positiven Feedback-Mechanismus zurück, mit defizienten lokalen Hormonrezeptoren als potenzielle Ursache. Die wichtige Funktion von Östrogen für die Entwicklung des weiblichen Reproduktionstraktes konnte bereits im Mausmodell gezeigt werden, wo eine Inaktivierung von ER α zu einer hypoplastischen Gebärmutter und Scheide führte [40, 112]. Rall et al. verweisen zudem auf die regulatorische Rolle von Östrogen für die AMH-Expression als weitere Möglichkeit. So könnte die Hochregulierung von ESR1 in den Uterusrudimenten eine verstärkte Aktivität des AMH-Promoters in der Embryonalphase bedingen mit konsekutiver Aplasie von Uterus und Vagina [146].

Das Gen des Östrogenrezeptor alpha (ESR1) wurde daher von Brucker et al. (2017) an einem Kollektiv von 93 Patientinnen mit MRKHS auf mögliche Mutationen und Varianten untersucht. Hierbei konnten sie eine möglicherweise schädigende Variante mit einem Aminosäureaustausch sowie zwei Punktmutationen feststellen, die zu einer Modifikation einer Spleiß-Stelle bzw. einer miRNA Bindungsstelle führen [23].

In einer weiteren Studie haben Rall et al. (2013) histologisch und immunhistochemisch den Aufbau der Uterus-Rudimente bei MRKHS-Patientinnen untersucht. Hierbei konnten sie zeigen, dass die Rudimente alle typischen uterinen Gewebearten aufweisen können. Bezüglich der Expression von ER α und PGR im Endometrium und Myometrium konnten keine signifikanten quantitativen Unterschiede zu gesundem Kontrollgewebe festgestellt werden [147]. Allerdings wies sowohl das endometriale Epithel als auch das Stroma von

MRKHS-Patientinnen eine stark verminderte Proliferationskapazität (Ki67-Expression) auf. Auch in der Proliferationsphase des Zyklus zeigte das Endometrium der MRKHS-Patientinnen vorwiegend schwach- oder nicht-proliferierendes Epithel vom Basalis-Typ [147]. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass defiziente Hormonrezeptoren eine Rolle in der Pathogenese des MRKH-Syndroms spielen könnten.

Brucker et al. (2017) konnten diese Hypothese mit einer Studie an endometrialen Stroma-Zellen (ESC) von MRKHS-Patientinnen weiter stützen: Die ESC, etabliert und kultiviert aus MRKHS-Uterusrudimenten, zeigten *in vitro* als Reaktion auf die Stimulation mit Östrogen und Progesteron einen signifikant geringeren Anstieg der Sekretion von Prolaktin und IGFBP-1 gegenüber Kontrollkulturen. Zudem war der Anstieg der Transkriptionsrate zahlreicher für die Dezidualisierung wichtiger Gene signifikant geringer als bei Kontrollen [22]. Die Dezidualisierung, der physiologische Wandel von endometrialen Fibroblasten zu sekretorischen Dezidualzellen, wird *in vitro* über Östrogen und Progesteron (und cAMP), bzw. ihre jeweiligen Kernrezeptoren, induziert und dient daher als indirekte Möglichkeit, die Funktion der Hormonrezeptoren und ihrer Pathways zu überprüfen [68, 177]. Die Unfähigkeit der endometrialen Stromazellen von MRKHS-Patientinnen eine angemessene Dezidualisierung zu vollziehen, kann daher als weiterer Hinweis für eine mögliche lokal vorliegende Störung der Hormonrezeptorfunktion angesehen werden [22].

Hentrich et al. (2020) untersuchten in einer weiteren Studie das rudimentäre Uterus-Gewebe von MRKHS-Patientinnen im Vergleich zu Kontrollgewebe hinsichtlich möglicher Unterschiede in der Gen-Expression. Passend zu den vorherigen Ergebnissen zeigte sich hierbei, dass das Endometrium von MRKHS-Patientinnen deutlich weniger zyklusabhängige genetische Veränderungen aufweist als bei gesunden Kontrollpatientinnen. Die Expression von zyklusabhängigen Genen blieb zudem über den gesamten Zyklus vorwiegend auf dem Niveau der Proliferationsphase [80], was als weiteres Indiz für die lokale Beeinträchtigung der Hormonrezeptorfunktion gewertet werden kann.

1.5 Organoide

1.5.1 Organoide als Modell

Als Organoide bezeichnet man dreidimensionale, sich selbst erneuernde Zellverbände, die strukturell und auch funktionell eine große Homologie zu bestimmten Gewebearten aufweisen [37]. Der Begriff des „Organoids“ entstand bereits zwischen Mitte und Ende des letzten Jahrhunderts, in seiner heutigen Konnotation wurde er aber maßgeblich durch die Fortschritte und Entwicklungen der letzten Jahre geprägt.

Organoide können sowohl aus pluripotenten embryonalen Stammzellen und induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS), als auch aus organspezifischen adulten Stammzellen generiert werden [37]. Humane embryonale Stammzellen entstammen dem Embryoblasten und können sich in fast alle Zellarten des menschlichen Körpers ausdifferenzieren [75]. Adulte Stammzellen hingegen befinden sich in gewebespezifischen Lokalisationen (Stammzellnischen) und sind meist multipotent, d.h. bei ihrer Teilung entstehen Nachkommen, die sich nur in die Zelltypen ihres Herkunftsgewebes weiter differenzieren können [95]. Adulte Stammzellen dienen so der Erneuerung eines Gewebes (z.B. das Darmepithel) und auch der Regeneration nach einer Verletzung [179].

Für die Herstellung von Organoiden aus pluripotenten Stammzellen werden diese durch Wachstumsfaktoren und Nährstoffe unter Ausnutzung natürlicher Entwicklungsvorgänge zum Erwerb einer Vorläuferidentität eines spezifischen Gewebetyps getrieben [105]. Durch das Einsetzen in eine 3D-Matrix wie Matrigel kommt es durch Selbstorganisation zur Ausbildung von Strukturen, die dem Gewebe sehr ähnlich sind. Solche Organoide aus pluripotenten Stammzellen wurden bereits für eine Reihe an Gewebearten beschrieben, wie beispielsweise Retina, Darm, Lunge oder Kleinhirn [37, 105]. Für die Herstellung von Organoiden aus adulten Stammzellen wird versucht, in den Kulturen ähnliche Bedingungen wie in den Stammzellnischen des jeweiligen Gewebetyps während der Gewebeerneuerung oder -reparatur zu schaffen [37]. Für epitheliale Gewebearten ist hierbei der Wnt-Pathway von enormer Bedeutung, da er *in vivo* die Selbsterneuerung des Gewebes durch Steigerung der Stammzellaktivität

antreibt [36]. Wnt-responsive Zellen exprimieren in der Regel Lgr5 (Leucinreicher G-Protein-gekoppelter Rezeptor 5), weshalb dieser als Marker für adulte Stammzellen zahlreicher epithelialer Gewebe verwendet werden kann [3, 4, 36, 159]. Lgr5 dient auch als Rezeptor für R-Spondin, welches aufgrund seiner Wnt-amplifizierenden Wirkung in vielen Kulturmedien enthalten ist. Eine einzelne Lgr5-positive Stammzelle scheint genug Informationen zu tragen, um über Teilung und Differenzierung der Nachkommen die Organstruktur in Form eines Organoids nachzubauen [36, 89, 155].

Da Organoiden sowohl die Struktur als auch die Funktion des jeweiligen Organs nah widerspiegeln, bieten sie eine einzigartige Möglichkeit zur *in vitro* Grundlagenforschung an zahlreichen Themen. So erlauben sie beispielsweise die Forschung an gewebespezifischen infektiösen Erkrankungen, wie bereits am Beispiel von Magenorganoiden und Helicobacter-pylori-Infektionen gezeigt wurde [5]. Die Etablierung von Patienten-abgeleiteten Tumor-Organoiden für unter anderem Kolorektale Karzinome [176], Prostatakarzinome [67] oder Endometriumkarzinome [173] eröffnet zudem vielfältige neue Möglichkeiten in Bezug auf die Testung therapeutischer Strategien (z.B. Ansprechen auf Medikamente) und könnte dadurch eine personalisierte Therapieplanung für Krebspatienten ermöglichen [37, 67, 176]. Organoiden beherbergen zusätzlich großes Potential für die Regenerative Medizin, was im Mausmodell durch das erfolgreiche Einwachsen und Übernehmen der Funktion *in vivo* bereits unter anderem für Leber- und Schilddrüsenorganoiden gezeigt werden konnte [90, 103].

1.5.2 Endometriumorganoiden

Das Endometrium mit seiner besonderen Rolle für die Fruchtbarkeit und Reproduktion ist schon lange Gegenstand der Forschung. Bisherige Modelle mit Primärzellen erlaubten zwar eine einfache *in vitro* Proliferation der Zellen und diese sprachen initial auf Hormone an, waren aber nicht langfristig kultivierbar [110]. Zwar sind auch immortalisierte und Karzinom-abgeleitete Zelllinien wie die Ishikawa-Zellen verfügbar, welche langfristig expandierbar sind. Diese spiegeln aber aufgrund ihres transformierten Phänotyps nur bedingt die *in vivo* Situation wider [9, 110].

Die Etablierung von Endometriumorganoiden aus adulten Stammzellen wurde erstmals durch Turco et al. (2017) und Boretto et al. (2017) beschrieben [9, 173]. Hierzu wurden endometriale Gewebeproben enzymatisch verdaut (Kollagenase/Dispase), gefiltert und die Drüsenstücke in Matrigeltropfen ausplattiert. Mithilfe eines Wachstumsmediums aus WNT-Pathway-Aktivatoren (R-Spondin), TGF β -Inhibitoren (A83-01), BMP-Inhibitoren (Noggin), Wachstumsfaktoren (EGF, FGF10) und Nicotinamid, gelang es Turco et al. so, sowohl aus prä- und postmenopausalem Endometrium als auch aus Dezidua endometriale Organoiden herzustellen [83, 173]. Diese Organoiden zeigen eine ball-artige, dreidimensionale Form mit Ausrichtung der Zellen auf ein inneres Lumen bei erhaltener epithelialer Polarität und apikalem Mikrovilli-Saum [9, 173]. Dabei scheint theoretisch eine einzelne Zelle auszureichen, um durch Teilung und Selbstorganisation ein Organoid zu bilden, in dem sowohl sekretorische Zellen (PAEP positiv) als auch ziliotragende Zellen (acetyliertes alpha-Tubulin) vorkommen [173].

In Kultur sind die Endometriumorganoiden langfristig (mehrere Monate) expandierbar, zeigen sekretorische Aktivität und eine deutliche Expression typischer Markerproteine glandulären Epithels wie MUC1 oder CK7 [173]. Turco et al. konnten zudem nachweisen, dass das genetische Profil der Organoiden nah an dem von endometrialen Drüsen ist und dass die Organoiden auch nach Monaten der Kultivierung genetisch stabil sind im Vergleich zu ihrem Ursprungsgewebe [173]. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass die Organoiden eine erhaltene Hormonreaktivität besitzen. So kommt es durch die Stimulation mit Östrogen und/oder Progesteron zur Expressionssteigerung typischer Markergene der Proliferationsphase (z.B. OLFM4) bzw. der Sekretionsphase (z.B. PAEP, 17HSD) in den Organoiden [9, 62, 173]. Die Hinzugabe von cAMP scheint diese Effekte noch zu verstärken [173]. Neben diesen Markergenen kommt es zudem zu einer Vielzahl an genetischen Veränderungen in den Organoiden durch die Stimulation [62, 173]. Mit Hilfe von RNA-Sequenzierungsanalysen an Einzelzellen konnten Fitzgerald et al. (2019) fünf verschiedene Zelltypen (ziliotragend, epithelial, proliferativ, nicht-ziliert und stammzell-artig) in 6 Tage alten Endometriumorganoiden

feststellen. Nach 12 Tagen ergab sich zusätzlich noch ein sekretorischer Zelltyp [62]. Auch hier zeigten sich Veränderungen durch eine Hormonbehandlung: Die Stimulation mit Östrogen und Progesteron führte an Tag 12 zu einer vermehrten Anzahl an sekretorischen, epithelialen und zilienträgenden Zellen und zu einer verminderten Anzahl an nicht-zilierten und stammzell-artigen Zellen in den Organoiden im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen [62].

Mittlerweile wurden Endometriumorganoide auch für das Krankheitsbild der Endometriose und verschiedene Entitäten endometrialer Karzinome beschrieben [10], was das große Potential des Organoidmodells für die Forschung an Krankheitsbildern unterstreicht. Organoide erlauben Zell-Zell-Interaktionen und Zell-Extrazelluläre-Matrix-Interaktionen im dreidimensionalen Raum, was bei 2D-Zellkulturen durch das Wachstum als Monolayer nicht möglich ist. Organoide stellen daher eine deutlich bessere Annäherung an die strukturellen und funktionellen Eigenschaften des *in vivo* Gewebes dar als vorherige Modelle [83]. Aus diesem Grund wurde auch im Rahmen dieses Projektes auf ein dreidimensionales Endometriumorganoid-Modell zurückgegriffen, um eine möglichst enge Annäherung an die *in vivo* Verhältnisse zu erlangen.

1.5.3 Matrigel

Matrigel ist eine Mischung aus Proteinen der extrazellulären Matrix, die von den Zellen des murinen Engelbreth-Holm-Swarm-Tumors sekretiert wird. Es besteht überwiegend aus Laminin, Kollagen IV und Entactin/Nidogen und ähnelt daher bezüglich seiner Zusammensetzung der Basalmembran [91, 96]. Da sein Ursprung tierische Zellen sind, enthält es auch Wachstumsfaktoren und Zytokine [91]. Es eignet sich sehr gut zur Kultivierung von Stammzellen, da es diese in einem undifferenzierten Stadium behält [91]. Da Matrigel den Zellen eine Selbstorganisation im dreidimensionalen Raum zur Bildung von Organoiden erlaubt, eignet es sich gut als Wachstumsmatrix.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Die genaue Ätiologie des MRKH-Syndroms ist bis heute unklar, wodurch das rudimentäre Uterus-Gewebe vermehrt in den Fokus der Wissenschaft gerückt ist. Eine Reihe von Studien weist dabei auf eine mögliche lokale Störung der Hormonrezeptoren hin. So konnten Rall et al. (2013) zeigen, dass das Endometrium von MRKHS-Patientinnen eine stark verminderte Proliferationskapazität aufweist [147]. Brucker et al. (2017) fanden zudem eine eingeschränkte Dezidualisierung bei endometrialen Stromazellen von MRKHS-Patientinnen [22]. Das Ziel dieses Projekts war es daher, neue Erkenntnisse über die Uterus-Rudimente von MRKHS-Patientinnen sowie das darin enthaltene endometriale Gewebe zu erlangen.

Zum einen sollten hierbei die Eigenschaften des endometrialen Epithels von MRKHS-Patientinnen untersucht werden. Dies erfolgte mit der Fragestellung, ob die Zellen normal in der Lage sind zu proliferieren und ob sie adäquat auf hormonale Stimulation ansprechen oder ebenfalls Hinweise bezüglich einer eingeschränkten Hormonrezeptorfunktion aufweisen. Als Modell für die *in vivo* Situation sollten hierbei Organoidkulturen dienen, die das endometriale Epithel der jeweiligen Patientin repräsentieren. Das erste Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung von patientenabgeleiteten Organoidkulturen aus MRKHS- und Kontrollendometrium. Zudem sollten Protokolle zur Kultivierung der Endometriumorganoide etabliert werden. Angestrebt wurde weiter eine vollständige Charakterisierung und Phänotypisierung der Organoide im Vergleich zu Kontrollorganoiden und zum Originalgewebe. Hierfür sollten die Organoide fixiert und verschiedene Marker immunhistochemisch gefärbt werden. Mittels Stimulationsversuchen mit Östrogen und Progesteron sollte zudem die Hormonrezeptorfunktionalität der MRKHS-Organoiden im Vergleich zu Kontrollen untersucht werden.

Des Weiteren sollte im Rahmen dieser Arbeit genauer beleuchtet werden, wie verschiedene Faktoren das Vorkommen von Uterus-Rudimenten sowie deren Größe und die Häufigkeit von Endometrium beeinflussen. Hierzu sollten die Operations- und Pathologie-Berichte einer großen Kohorte von MRKHS-Patientinnen ausgewertet und mit allgemeinen Patienten-Daten wie assoziierten

Fehlbildungen und MRKHS-Subtyp verglichen werden, um mögliche Zusammenhänge zu beleuchten.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv für die Etablierung patientenabgeleiteter Organoidmodelle

2.1.1 Einverständniserklärung und Ethikvotum

Alle Patientinnen erhielten vor der Operation und Gewinnung von Studiengewebe eine Aufklärung über die pseudonymisierte Weiterverwendung von Rest-Gewebe zu Forschungszwecken. Alle in die Studie aufgenommenen Patientinnen stimmten der wissenschaftlichen Weiterverarbeitung von entnommenem Gewebe und Blut schriftlich zu (Einwilligungserklärung zur Verwendung von Biomaterial und Daten in der Forschungsdatenbank und Biobank der Medizinischen Fakultät & des Universitätsklinikums Tübingen). Ein entsprechendes Votum der Ethik-Kommission an der medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen wurde am 24.07.2020 und 02.12.2020 für die Projektnummer 205/2014BO1 verlängert.

2.1.2 MRKHS-Gruppe und Gewebe

Die Entnahme von Uterus-Rudimenten erfolgte bei MRKHS-Patientinnen im Rahmen einer laparoskopischen Neovagina-Anlage (modifizierte Methode nach Vecchiatti). Die Rudimente wurden intraoperativ meist als Ganzes entfernt, in einem Fall war die Morcellierung der Rudimente zur Entnahme notwendig. Die Rudimente wurden anschließend mit sterilen Instrumenten eröffnet, in Schichten von ungefähr 5 Millimetern lamelliert und makroskopisch auf mögliches Endometrium untersucht. Eine Gewebeprobe wurde bei makroskopisch sichtbarem Endometrium oder Verdacht auf eine Gangstruktur entnommen und weiterverarbeitet. Die Entnahme von Endometrium, wenn vorhanden, erfolgte stets mit möglichst wenig anhängendem Myometrium. Sollte auf den Schnittflächen des Rudiments lediglich fibromuskuläres Stroma abgrenzbar gewesen sein, wurde in der Regel keine Probe entnommen. Eine genauere Deskription der makroskopischen Aspekte erfolgt in Kapitel 3.1.1.

2.1.3 Hormonprofil und Zyklusphasen des MRKHS-Patientinnenkollektivs

Zwar weisen MRKHS-Patientinnen einen erhaltenen ovariellen Zyklus auf, eine anamnestische Erhebung des Zykluszeitpunkts ist aber aufgrund der Amenorrhö bei Uterusaplasie nicht möglich. Auch eine histologische Feststellung der Zyklusphase ist aufgrund der meist geringen Menge an Endometrium in der Regel schwierig und zudem auch nicht sinnvoll, da es Hinweise auf inadäquate zyklische Veränderungen im Endometrium der Uterusrudimente gibt. Im Rahmen der klinischen Routine erhielten alle MRKHS-Patientinnen am Tag vor der Operation eine Blutentnahme mit Anfertigung eines Hormonprofils, welches zur laborchemischen Bestimmung der Zyklusphase herangezogen werden konnte.

Als Grenzwert für die Follikel-/Proliferationsphase galt hierbei ein Progesteron-Wert von < 2,5 ng/ml und für die Luteal-/Sekretionsphase ein Progesteron-Wert von > 5 ng/ml. Eine mögliche Hyperandrogenämie wurde anhand des Gesamt-Testosterons, des Sexualhormon-bindenden Globulins (SHBG) und des freien Androgen-Indexes untersucht. Hierbei wurde ein Gesamt-Testosteron von 0,35 – 1,4 nmol/l bei einem Alter von 11-19 Jahren, bzw. von 0,4 – 2,1 nmol/l bei einem Alter von 20-39 Jahren als Grenzwerte festgelegt. Bezüglich des SHBGs wurde für Frauen in einem Alter von 15-55 Jahren ein Normbereich von 30 – 90 nmol/l festgelegt. Der freie Androgen-Index als indirektes Maß für die tatsächlich bioverfügbare Menge an Testosteron wurde mit der Formel

$$\text{FAI} = \text{Gesamt-Testosteron (nmol/l)} * 100 / \text{SHBG (nmol/l)}$$

berechnet. Hierbei wurde für Frauen im Alter von 16-50 Jahren ein Wert von 0,3 – 5,62 als normal erachtet.

2.1.4 Kontroll-Gruppe und Gewebe

Als Vergleich zum MRKHS-Gewebe wurde Endometrium von prämenopausalen Frauen vor dem 47. Lebensjahr verwendet. Die Frauen erhielten in der Regel eine Hysterektomie (Entfernung des Uterus) aufgrund einer benignen Ursache. Die häufigste Indikation war dabei ein Uterus myomatosus. Weitere Indikationen waren ein Descensus genitalis, sowie einmalig eine Interruptio aus sozialer Indikation, bei der Endometrium per Kürettage gewonnen wurde. Bei einer Patientin (27E) erfolgte postoperativ in der Gewebe-Aufarbeitung durch die

Pathologie der Nachweis einer fokalen Adenomyosis uteri. Sämtliche Kontrollpatientinnen, die in die Hormon-Experimente eingeschlossen wurden, wiesen seit mindestens drei Monaten vor der Operation keine Einnahme von Hormonen auf. Die Entnahme von Endometrium aus den teils intakten, teils morcellierten Uteri der hysterektomierten Kontrollpatientinnen erfolgte durch einen Arzt oder eine Ärztin für Pathologie.

2.2 Patientenkollektiv für die Auswertung von Operations- und Pathologieberichten

In einem weiteren Teil dieser Arbeit erfolgte eine retrospektive Analyse von Patientendaten aller MRKHS-Patientinnen, die im Zeitraum vom 01.01.2014 bis 31.12.2022 an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen operiert wurden. Die meisten dieser Patientinnen erhielten eine laparoskopische Neovagina-Anlage nach Vecchiatti. Intraoperativ wurden die Patientinnen auf mögliche vorliegende Fehlbildungen sowie das Vorhandensein von Uterus-Rudimenten untersucht. Jedes Rudiment wurde hierbei basierend auf Größe, Farbe und Konsistenz hinsichtlich des Vorhandenseins von intrauterinem Endometrium evaluiert. Eine Entnahme der Rudimente erfolgte perioperativ, falls die Patientin bekannte zyklische Unterbauchbeschwerden hatte, falls aufgrund eines präoperativen MRTs oder einer Ultraschall-Untersuchung bereits der Verdacht auf intrauterines Endometrium bestand oder falls eine Entfernung nach ausführlicher Beratung von der Patientin gewünscht wurde. Jedes so entfernte Rudimente wurde in der Folge standardisiert histopathologisch untersucht und ausgemessen (Höhe, Breite und Länge). Falls kein endometriales Gewebe makroskopisch sichtbar war, erfolgte eine zufällige Probenentnahme für die histopathologische Aufarbeitung. Alle Patientinnen wurden über die systematische Analyse von hierbei erhobenen Daten zu Forschungszwecken aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis (Einwilligungserklärung zur Verwendung von Biomaterial und Daten in der Forschungsdatenbank und Biobank der Medizinischen Fakultät & des Universitätsklinikums Tübingen). Die retrospektive Analyse dieser Daten wurde zudem unter dem Antrag 077/2022BO2 durch das Votum der Ethik-Kommission der Eberhard-Karls-Universität Tübingen am 23.02.2022 genehmigt.

2.3 Verwendetes Material

2.3.1 Gerätschaften

2.3.1.1 CO₂-Inkubator

Um optimale Bedingungen für die Kultivierung der Endometrium-Organoiden und der humanen endometrialen Stromazellen (HESC) zu schaffen, wurde ein Brutschrank (Firma Binder, Tuttlingen) verwendet, in dem bei 37°C eine gesättigte Luftfeuchtigkeit und 5%-CO₂-Atmosphäre vorhanden waren.

2.3.1.2 Lichtmikroskop

Für sämtliche lichtmikroskopische Aufnahmen der Organoiden wurde ein EVOS M7000 Imaging System (ThermoFisher) verwendet. Hierbei kamen sowohl 2x, 4x als auch 10x Objektive für die Aufnahmen zum Einsatz.

2.3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1 Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Produktname	Produkt/Kat.-nummer	Firma
A83-01	2939	Tocris
Advanced DMEM/F12	12634010	Gibco
Aktivkohle, Dextran- beschichtet (DCC)	C6241	Sigma Aldrich
Ammoniumchlorid	P9144-500G	Sigma Aldrich
B27 supplement	17504-44	Gibco
Beta-Estradiol	E8875	Sigma Aldrich
Basement Membrane Extract	3533-001-2	Trevigen
BSA	05488	Fluka BioChemika
cAMP	1140	Tocris
Cellstar 6 Well Multiwellplatte, TC	657 160	greiner bio-one
Cellstar 24 Well Multiwellplatte, TC	662 160	greiner bio-one

Cellstar 48 Well Multiwellplatte, TC	677 180	greiner bio-one
Collagenase/Dispase	10269638001	Sigma Aldrich
Collagenase Type II	17101015	Gibco
Cultrex reduced growth factor BME2	3533-001-02	Trevigen
Dispase II	D4693	Sigma Aldrich
DMEM/F12, HEPES, ohne Phenolrot	11039047	Gibco
Dulbeccos Phosphate buffered Saline (1xPBS)	D8537	Sigma Aldrich
EDTA	E5134-100G	Sigma Aldrich
EGF	AF-100-15	Peprotech
FBS		Gibco
FGF 10	100-26	Peprotech
Formalin	100496	Merck
GlutaMax	35050-038	Gibco
HEPES	15630-056	Gibco
HGF	100-39	Peprotech
Histogel	HG-4000-012	Thermo Fisher
IP ActivFlo Biopsy I Kassetten	39LC-605	Leica Biosystems
Kaliumhydrogencarbonat	P9144-500G	Sigma Aldrich
Matrigel	356231	Corning
Maxima™ H Minus cDNA Synthesis Master Mix (with dsDNase) Kit	M1681	Thermo Fisher
Medroxyprogesteronacetat	PHR1589	Sigma Aldrich
N2 supplement	17502048	Life Technologies
N-Acetylcysteine	A9165-5G	Sigma Aldrich
Natronlauge	109137	Merck
Nicotinamide	NO-636	Sigma Aldrich
Noggin	120-10C	Peprotech

Paraplast™ X-tra	39503002	Leica Biosystems
PBS	10010023	Thermo Fisher
Penicillin/Streptomycin	15140-122	Gibco
Power SYBR™ Green PCR-Master Mix	4367659	Thermo Fisher
Primocin	Ant-pm-1	Invivogen
Progesteron	P8783	Sigma Aldrich
ProLong™ Diamond mit DAPI	P36966	Thermo Fisher
PureLink® RNA Mini Kit	12183020	Thermo Fisher
Recombinant Human R- Spondin 1	120-38	Peptotech
Recovery™ Cell Culture Freezing Medium	12648010	Gibco
SB202190	S7067	Sigma Aldrich
TrypLE	12604013	Gibco
Trypsin EDTA 0,05%	25300-054	Gibco
Xylol	131769	PanReac AppliChem
Y-27632	TMO-T1725-50	Hölzel

2.4 Methoden und Protokolle

2.4.1 Verarbeitung von Patientengewebe zum Ansetzen einer Organoid-Zellkultur

Sämtliches Gewebe wurde unter einer biologischen Sicherheitswerkbank verarbeitet. Gewebe von MRKHS- oder Kontroll-Patientinnen wurde in eine Petrischale überführt und das Endometrium mit einem Skalpell vom Myometrium getrennt. Ersteres wurde mit dem Skalpell in kleine Stücke (1-3 mm³) geschnitten und in ein 2 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Nach Zugabe von 1 ml Collagenase/Dispase wurde das Endometrium für eine Stunde bei 37°C auf einem Schütteltisch („Thermomixer comfort“, Eppendorf, 1000 rpm) verdaut. Der Inhalt wurde in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 10 mL advDMEM/F12 +/+ (Gibco Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12 mit den Zusätzen 1% Glutamax, 1% HEPES und 1% Penicillin + Streptomycin, allesamt Thermo Fisher Scientific) gewaschen. Anschließend wurde das 15 mL Reaktionsgefäß für 10 Minuten bei 478 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. War im Zellpellet nun eine deutliche Schicht Erythrozyten zu sehen, wurde eine Lyse der roten Blutkörperchen durchgeführt. Hierfür wurde das Zellpellet in 0,7 mL Lyse-Puffer (Inhaltsstoffe siehe 2.4.1.1) resuspendiert und das Reaktionsgefäß für 2 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 10 Minuten (478 g) zentrifugiert und der Überstand erneut abgenommen.

Das Zellpellet wurde daraufhin in 60 – 120 µL advDMEM/F12 +/+ resuspendiert, die gewünschte Menge entnommen und in einem Verhältnis von 45:55 mit Matrigel/BME vermischt. Die entstandene Suspension wurde auf einer 48 Well (20 µL Tropfen) bzw. 24 Well Platte (40 µL Tropfen) ausplattiert und für 30 Minuten umgekehrt in einen CO₂-Inkubator (37°C, 5% CO₂) gestellt. Anschließend wurden jedem Well 270 µL bzw. 540 µL Endometrium-Organoid-Kulturmedium hinzugegeben.

2.4.1.1 Inhaltsstoffe und Ansetzen des Lysepuffers

Der zur Lyse von Erythrozyten verwendete Lysepuffer wurde wie folgt angesetzt: 24,9 g Ammoniumchlorid (Sigma Aldrich, Cat. No. A9434-500G), 3 g

Kaliumhydrogencarbonat (Sigma Aldrich, Cat. No. P9144-500G) und 0,111 g EDTA (Sigma Aldrich, Cat. No. E5134-100G) wurden mit 3 Litern destilliertem Wasser vermischt. Der pH wurde anschließend mit ca. 3 mL 1 M NaOH (Merck, Cat. No. 109137) auf 7,5 titriert.

2.4.2 Nährmedium zur Kultivierung von Endometrium-Organoid-Linien in Well-Platten

2.4.2.1 Verwendung von konditioniertem Medium (CM)

Als Basis sämtlicher Kulturnährmedien wurde konditioniertes Medium eingesetzt. Hierfür wurde eine murine Fibroblasten-Zelllinie (LWRN (ATCC® CRL3276™)) verwendet, die genetisch so modifiziert wurde, dass sie die Faktoren WNT3a, R-Spondin und Noggin (L-WRN) sezerniert und damit ihr Medium konditioniert. Diese Zelllinie wurde nach einem Protokoll von Miyoshi & Stappenbeck (Nature Protocols, 2013) [119] mit advDMEM und 10% FBS kultiviert. Das Kultivierungsmedium wurde dabei alle 24 Stunden komplett erneuert. Das abgenommene, konditionierte Medium wurde zentrifugiert, steril gefiltert und anschließend bei -80°C gelagert. Dieses CM wurde als Basis der ersten Version des Kulturnährmediums eingesetzt.

WNT-Proteine wie WNT3a tendieren aufgrund ihrer stark hydrophoben Eigenschaften dazu, außerhalb von Zellen zu aggregieren und verklumpen, was ihre biologische Aktivität stark reduziert. Ein in FBS vorkommendes Glykoprotein namens Afamin geht u.a. mit WNT3A einen 1:1-Komplex ein. Durch die Bindung von Afamin wird der Komplex wasserlöslich und behält auch in einem Medium seine biologische Aktivität bei [116]. Bei Kultivierung der oben genannten LWRN-Zelllinie ohne den Einsatz von FBS oder andere Bindungsmoleküle, die WNT3a stabilisieren können, sollte eine biologische Aktivität von WNT3a im Medium daher weitestgehend verhindert [178] und lediglich die Faktoren R-Spondin und Noggin in stabiler und biologisch aktiver Form im konditionierten Medium enthalten sein. Diese Form des CM wurde deshalb in Kulturnährmedium Version 3 verwendet (L-WRN 0% FBS). Für die Dezidualisierungsexperimente wurde ein mit dem Faktor R-Spondin konditioniertes Medium, sowie rekombinantes Noggin benutzt, um eine Beeinflussung durch mögliche aktive Reste von WNT3a im CM

zu vermeiden. Zur Herstellung des R-Spondin konditionierten Mediums wurden Cultrex® R-spondin1 Zellen (Trevigen, Kat.-Nr. 3710-001-K) nach einem Protokoll von Drost et al. [47] kultiviert.

2.4.2.2 Inhaltstoffe des Kulturnährmediums Version 1

Tabelle 2 Kulturnährmedium Version 1

Inhaltsstoff	Finale Konzentration	30 mL
L-WRN cond. medium	50%	15 mL
HGF	50 ng/mL	30 µL
FGF 10	50 ng/mL	75 µL
EGF	50 ng/mL	150 µL
A83-01	500 nM	3 µL
N2 supplement	1%	300 µL
B27 supplement	2%	600 µL
N-Acetylcysteine	1.25 mM	75 µL
Nicotinamide	10 nM	20 µL
SB202190	500 nM	3 µL
Primocin	100 µg/mL	60 µL
Y-27632	5 µM	1.5 µL
Adv. DMEM/F12 +/+	46,6%	14 mL

2.4.2.3 Inhaltstoffe des Kulturnährmediums Version 2

Tabelle 3 Kulturnährmedium Version 2

Inhaltsstoff	Bestandslösung	Finale Konzentration
HGF	50 µg/mL	50 ng/mL
FGF-10	20 µg/mL	50 ng/mL
EGF	10 µg/mL	50 ng/mL
A83-01	5 mM	0.5 µM
B27 supplement	50x	2%
N2 supplement	100x	1%
N-Acetylcysteine	500 mM	1.25 mM
Nicotinamide	10 µM	10 nM

Primocin	50 mg/mL	100 µg/mL
Y-27632	100 mM	5 µM
Noggin	100 µg/mL	100 ng/mL
R-SPON CM		10%
Adv. DMEM/F12 +/+		86,6%

2.4.2.4 Inhaltstoffe des Kulturnährmediums Version 3

Tabelle 4 Kulturnährmedium Version 3

Inhaltsstoff	Bestandslösung	Finale Konzentration
FGF-10	20 µg/mL	10 ng/mL
EGF	10 µg/mL	50 ng/mL
A83-01	5 mM	0.5 µM
B27 supplement	50x	2%
N2 supplement	100x	1%
N-Acetylcysteine	500 mM	1.25 mM
Nicotinamide	1 M	2 mM
SB202190	5 mM	1 µM
Y-27632	100 mM	10 µM
L-WRN 0% FBS		10%
Adv. DMEM/F12 +/+		86,6%

2.4.2.5 Inhaltstoffe des Kulturnährmediums für Experimente

Tabelle 5 Kulturnährmedium für Dezidualisierungsexperimente.

β-Estradiol, Progesteron und cAMP wurden je nach Untersuchungskondition hinzugegeben.

Inhaltsstoff	Bestandslösung	Finale Konzentration
FGF-10	20 µg/mL	10 ng/mL
EGF	10 µg/mL	50 ng/mL
A83-01	5 mM	0.5 µM
B27 supplement	50x	2%
N2 supplement	100x	1%
N-Acetylcysteine	500 mM	1.25 mM
Nicotinamide	1 M	2 mM

SB202190	5 mM	1 μ M
Noggin	100 μ g/mL	0,1 ng/mL
Y-27632	100 mM	10 μ M
β -Estradiol	10 μ M	10 nM
Progesteron	1 mM	1 μ M
cAMP	1 mM	1 μ M
R-SPON CM		10%
Adv. DMEM/F12 +/+/+		86,6%

2.4.3 Umsetzen einer Organoid-Zellkultur

2.4.3.1 Verdau mit TrypLE

Zum Umsetzen einer Organoidkultur mit Trypsinierung zu Einzelzellen wurde das Wachstumsmedium aus allen Wells (48 Well Platte) abgenommen und in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Wells mit 1 mL PBS gewaschen und das PBS ebenfalls in das Gefäß überführt. 1 mL TrypLE wurde in eine Pipettenspitze aufgenommen und mit der Pipettenspitze der Matrigeltropfen am Boden jedes Wells zerkratzt. Die Wells wurden daraufhin mit dem 1 mL TrypLE gewaschen und der Inhalt in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde für 8 Minuten bei 37°C auf einem Schütteltisch platziert (1000 rpm), bevor 500 μ L advDMEM/F12 +/+/+ mit 10% FBS hinzugegeben und der gesamte Inhalt danach in das 15 mL Reaktionsgefäß transferiert wurde. Das 15 mL Reaktionsgefäß wurde für 10 Minuten bei 478 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in advDMEM/F12 +/+/+ resuspendiert, die gewünschte Menge Zellsuspension entnommen und in einem Verhältnis von ca. 45:55 mit Matrigel/BME vermischt. Anschließend wurden Tropfen von je 20 μ L auf einer 48 Well Platte ausplattiert. Die Platte wurde umgedreht für 30 Minuten in den CO₂-Inkubator gestellt. Danach wurde jedem Well 270 μ L Kulturmedium hinzugegeben.

2.4.3.2 Mechanische Zerkleinerung

Zum Umsetzen einer Organoidkultur mit mechanischer Zerkleinerung der Organoide wurde das Nährmedium aus allen Wells entfernt und in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt. Es wurde 1 mL advDMEM/F12 +/+/+ in eine

Pipettenspitze aufgenommen und mit der Spitze die Matrigeltropfen am Boden der Wells zerkratzt. Die Wells wurden anschließend mit dem 1 mL advDMEM/F12 +/+ gewaschen und der Inhalt in ein 2 mL Reaktionsgefäß gegeben. Hierin wurde die Zellsuspension sechs Mal durch eine 27 ³/₄ G Nadel mithilfe einer 1 mL Spritze auf- und abgezogen und danach in das 15 mL Reaktionsgefäß gegeben. Das 2 mL Reaktionsgefäß wurde mit 200 µL advDMEM/F12 +/+ nachgespült und der Inhalt ebenfalls in das 15 mL Reaktionsgefäß gegeben, welches dann für 10 Minuten bei 478 g zentrifugiert wurde.

Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 60 – 120 µL advDMEM/F12 +/+ resuspendiert. Die gewünschte Menge Zellsuspension wurde entnommen und in einem Verhältnis von 45:55 mit Matrigel/BME vermischt. Die entstandene Suspension wurde in Tropfen von je 40 µL auf einer 24 Well Platte ausplattiert und für 30 Minuten umgekehrt in einen CO₂-Inkubator (37°C, 5% CO₂) gestellt. Danach wurde jedem Well 540 µL Kulturmedium hinzugegeben.

2.4.4 Einfrieren und Auftauen von Organoid-Kulturen

Zum Einfrieren wurden Organoid-Kulturen wie in 2.4.3 beschrieben vom Boden der Wells abgekratzt und anschließend durch eine 27 ³/₄ G Nadel und Spritze zerkleinert. Nach dem Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes wurden das Zellpellet in Recovery™ Cell Culture Freezing Medium (Gibco) resuspendiert und portionsweise in Cryo-Röhrchen überführt. Hierbei wurden jeweils 0,7 mL Recovery Cell Culture Freezing Medium pro Cryo-Röhrchen zum Resuspendieren verwendet. Die Cryo-Röhrchen wurden daraufhin in einem CellCooler mit Metallring platziert. Der CellCooler wurde anschließend auf -80°C gestellt.

Zum Auftauen von Organoidkulturen wurden die Cryo-Röhrchen von -80°C für bis zu zwei Minuten in ein Wasserbad (37°C) gegeben, mindestens aber bis der Inhalt komplett aufgetaut war. Die Cryo-Röhrchen wurden anschließend gründlich desinfiziert und ihr Inhalt unter einer sterilen Sicherheitswerkbank in 10 mL vorgewärmtes (37°C) advDMEM/F12 +/+ in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde daraufhin für 10 Minuten bei 478 g

zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in advDMEM/F12 +/+ resuspendiert und wie unter 2.4.1 beschrieben ausplattiert.

2.4.5 Formalin-Fixierung und Konservierung von Organoiden

Zum späteren Anfertigen von Paraffin-Schnitten wurden Organoide mit Formalin fixiert und in Ethanol gelagert. Hierzu wurde das Nährmedium aus allen Wells abgenommen und verworfen. Anschließend wurde jeder Well mit 300 µL 1xPBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, Thermo Fisher) gewaschen und das 1xPBS ebenfalls verworfen. Zur Auflösung des Matrigels wurden 375 µL Dispase II (1 mg/mL) in jeden Well pipettiert und der Tropfen mit der Pipettenspitze zerkratzt. Die Platte wurde daraufhin 15 Minuten lang in einen CO₂-Inkubator bei 37°C inkubiert.

In ein frisches 15 mL Reaktionsgefäß wurden 3 mL PBS/1% BSA (Bovines Serum-Albumin) gegeben, um das Reaktionsgefäß zu beschichten. Danach wurde 1 mL PBS/1%BSA in eine Pipettenspitze aufgenommen, gleichmäßig auf alle Wells verteilt und mit der Lösung aus Dispase und Zellen resuspendiert. Die Suspension wurde aus jedem Well vorsichtig in das 15 mL Reaktionsgefäß überführt, ohne die Wände des Tubes zu berühren. Anschließend wurden die Wells nochmal mit 1 mL PBS/1%BSA gewaschen und der Inhalt ebenfalls in das 15 mL Reaktionsgefäß gegeben. Dieses wurde danach für 10 Minuten bei 250 g in der Multifuge 3 S-R zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer 1 mL Pipette abgenommen.

Für die folgenden Schritte wurden Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen jeweils vor Berührung mit Organoiden mit 1xPBS/1% BSA befeuchtet/beschichtet. Das zuvor erhaltene Zellpellet aus dem 15 mL Reaktionsgefäß wurde vorsichtig mit 1 mL 4% Formalin (Merck) resuspendiert und in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt, welches anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend mit PBS/1%BSA aufgefüllt und für 3 Minuten bei 2000 rpm (381 g) in der Biofuge pico zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Mit 1 mL 1xPBS/1% BSA wurde das Zellpellet erneut resuspendiert und das Reaktionsgefäß mit 1xPBS/1% BSA aufgefüllt, bevor erneut für 3 Minuten in der Biofuge pico

zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abgenommen und erneut verworfen. Anschließend wurde in drei Schritten erst 250 µL 25% Ethanol, dann 300 µL 70% Ethanol und schließlich 600 µL 96% Ethanol hinzugegeben, wobei das Reaktionsgefäß nach jedem Hinzugeben und Resuspendieren für 10 Minuten stehen gelassen wurde. Nach dem letzten Schritt wurde das Reaktionsgefäß mit den Organoiden bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.4.6 Paraffin-Einbettung der konservierten Organoide

Zur Einbettung in Paraffin wurde zunächst das überstehende Ethanol aus dem Eppendorf Reaktionsgefäß vorsichtig abgenommen. Als Form wurde ein kleiner Plastikring von der Größe des Anfangsstücks einer 100 µL Pipettenspitze einseitig mit Parafilm verschlossen und auf einen gefrorenen Metallblock gelegt. Nun wurde Histogel (Thermo Fisher, Art. Nr. HG- 4000-012) in das Reaktionsgefäß mit den Organoiden gegeben und dieses für 30 Sekunden bei 65°C in den Heizblock gestellt. Anschließend wurde die Probe in die vorbereitete Form gegeben und nach kurzem Anfrieren für 5 Minuten zu -20°C gestellt. Danach wurde die Probe in eine Plastikkassette (IP ActivFlo Biopsy I Kassetten, Leica Biosystems) überführt und zweimal eine Stunde lang bei Raumtemperatur in 70% Ethanol gegeben, gefolgt von zwei Stunden in 96% Ethanol und einer Stunde in 100% Ethanol. Anschließend wurde die Kassette über Nacht in 100% Ethanol inkubiert. Als nächster Schritt wurde die Probe zweimal eine Stunde in Xylol (Isomerengemisch zur Analyse, PanReac AppliChem) gegeben und hinterher dreimal für 45 Minuten in Paraffin (Paraplast™ X-tra, Leica Biosystems) bei 65°C. Auf einer Heizplatte wurde die Probe in eine Metallform auf ein Bett aus Paraffin gegeben. Die Form wurde daraufhin mit Paraffin aufgefüllt und für 15 Minuten zu -20°C gestellt. Anschließend wurde kurz erwärmt, um die Form zu entfernen.

2.4.7 Schnitt-Anfertigung der Organoid-Kulturen

Aus Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten (FFPE) Organoid-Kulturen wurden mittels eines Mikrotoms (HM 355S, Eprexia™, Michigan, USA) 4 µm große Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden im Anschluss auf TOMO Adhäsiv

Mikroskop-Objektträger (Matsunami Glass) übertragen und schließlich bei Raumtemperatur getrocknet.

2.4.8 Entparaffinierung der Organoid-Kulturen

Um das Paraffin vor eventuellen Färbungen aus den Organoid-Schnitten zu entfernen, wurden die Objektträger mit den Schnitten drei Mal für je 10 Minuten in Xylol gewaschen. Im Anschluss wurden die Objektträger zwei Mal für drei Minuten in 100% Ethanol platziert, gefolgt von zweimalig drei Minuten in 96% Ethanol und drei Minuten in 75% Ethanol. Danach wurden die Objektträger in 75% Ethanol mit 3% Wasserstoffperoxid platziert und schließlich für fünf Minuten mit destilliertem Wasser gespült.

Schnitte, die später mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt werden sollten, wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Schnitte für spätere immunhistochemische Färbungen wurden bis zur weiteren Verarbeitung in PBS gelagert.

2.4.9 Immunhistochemische Färbungen der Organoid-Schnitte

Die immunhistochemischen Färbungen der angefertigten Organoid-Schnitte wurden in Kooperation mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Hierzu wurde ein automatisiertes Färbesystem der Reihe Ventana Discovery (Ventana Medical Systems, Tucson, USA) verwendet sowie in der klinischen Routine eingesetzte *in vitro* Diagnostik-Antikörper gegen ERα, PR, MIB1 und PAX8.

2.4.10 Anfertigung von Immunfluoreszenz-Färbungen

Zur Anfertigung von Immunfluoreszenz-Färbungen wurde eine 0,1% Tween 20 (Polysorbat, nichtionisches Detergens) -PBS-Lösung hergestellt (im Folgenden PBS-T genannt), sowie eine weitere mit zusätzlich 4% BSA (BSA-PBS-T). Alle Antikörper wurden in einem den Hersteller-Angaben entsprechenden Verhältnis verdünnt. Sämtliche Inkubationen wurden in einer zum Lichtausschluss mit Aluminium-Folie ausgekleideten Box bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle Lösungen wurden so auf die Deckgläser aufgetragen, dass diese von einem Tropfen vollkommen bedeckt waren (60-100 µL).

Zunächst wurde PBS-T für fünf Minuten als Wasch-Schritt aufgetragen, gefolgt von 0,2% Triton X (in PBS) für drei Minuten. Daraufhin wurde erneut PBS-T für fünf Minuten aufgetragen. Dieser Schritt wurde zwei weitere Male wiederholt. Im Anschluss wurde BSA-PBS-T auf das Deckglas pipettiert und für 30 Minuten belassen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem ersten verdünnten Antikörper für eine Stunde.

Nach der abgeschlossenen Inkubation wurde erneut drei Mal für je fünf Minuten mit PBS-T gewaschen und in der Folge der zweite verdünnte Antikörper aufgetragen. Auch dieser wurde für eine Inkubationszeit von einer Stunde belassen, bevor erneut drei Mal mit PBS-T für 5 Minuten gewaschen wurde. Zuletzt wurde 1 Tropfen ProLong™ Diamond mit DAPI als Eindeckmittel (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Katalognummer P36966) aufgetragen und die Schnitte über Nacht auf einer flachen Unterlage belassen.

2.4.10.1 Verwendete Antikörper

Tabelle 6 Übersicht über die für die Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper.

Antigen	Zielspezies	Wirtstier	Kat.-Nr.	Hersteller	Verdünnung
Zytokeratin AE1/AE3	Mensch	Maus	M3515	Agilent Technologies (DAKO)	1:200
Perlecan	Mensch	Hase	PA5- 79416	Invitrogen	1:100
Ziege anti- Maus IgG (Alexa Fluor 488)	Maus	Ziege	A- 11029	Invitrogen	1:400
Ziege anti- Hase IgG (Alexa Fluor 594)	Hase	Ziege	A- 11012	Invitrogen	1:400

2.4.11 Dezidualisierung von Organoid-Kulturen

Die Organoiden wurden wie unter 2.4.3 beschrieben umgesetzt und zu gleichen Teilen in sechs Wells auf einer 24 Well Platte ausplattiert. Alle Wells erhielten zunächst 540 μ L Kulturnährmedium für Experimente (Zusammensetzung siehe 2.4.2.5), welches in der Folge als Exp.-ExM (Experimente-Expansionsmedium) abgekürzt wird. Nach vier Tagen erfolgte die Aufteilung in drei Gruppen zu jeweils 2 Wells (siehe auch Abbildung 1).

Gruppe 1 (ExM) diente als unbehandelte Kontrollprobe und erhielt für weitere 96 Stunden Exp.-ExM, wobei das Medium nach 48 Stunden gewechselt und erneuert wurde. Bei Gruppe 2 (E2) wurde auf E2-Exp.-ExM als Medium gewechselt, welches zusätzlich 10 nM beta-Estradiol (Sigma, Cat. No. E8875) enthält. Auch hier wurde das Medium nach 48 Stunden erneuert. Gruppe 3 (P4) wurde zuerst für 48 Stunden mit E2-Exp.-ExM geprimed, danach wurde für weitere 48 Stunden auf P4-Exp.-ExM gewechselt, welches zusätzlich zu den 10 nM beta-Estradiol noch 1 μ M Progesteron (Sigma, Cat. No. P8783) und 1 μ M cAMP (Tocris, Cat. No. 1140) beinhaltet.

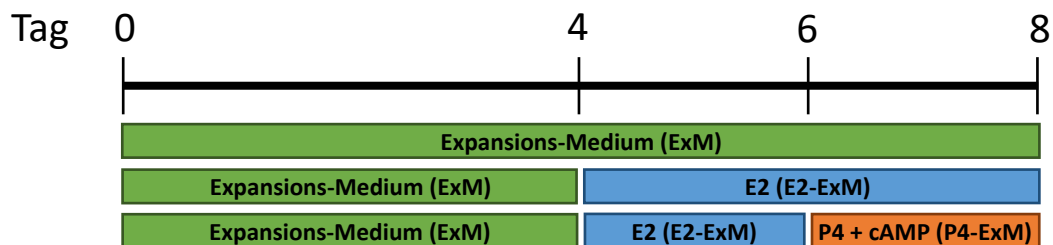


Abbildung 1 Dauer der hormonellen Stimulation für die drei Gruppen ExM, E2 und P4, in Anlehnung an Turco et al. [173]

96 Stunden nach der Aufteilung wurden alle Wells geerntet. Hierzu wurde das Medium aus allen Wells abpipettiert und verworfen. Jeder Well wurde mit 1 mL 1xPBS mehrmals gewaschen und das PBS in ein der Gruppe zugehöriges 15 mL Tube gegeben. Jeweils für zwei Wells wurden die Matrigeltropfen zerkratzt und die Wells mit 1 mL TrypLE (Gibco™, Thermo Fisher, Cat. No. 12604013) gespült, welches anschließend mit dem Matrigel in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt wurde. Dieses wurde für 10 Minuten auf dem Schütteltisch (37°C) inkubiert. Der Inhalt wurde danach in das zugehörige 15 mL Reaktionsgefäß gegeben und

dieses mit 1xPBS auf 15 ml aufgefüllt und für 10 Minuten zentrifugiert (478 g). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 15 mL 1xPBS resuspendiert. Nachdem erneut für 10 Minuten zentrifugiert (478 g) und der Überstand abgenommen wurde, wurde das Zellpellet mit Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.4.12 Kultivierung und Dezidualisierung von HESC

Humane endometriale Stromazellen (HESC) wurden in DMEM/F12 (mit HEPES) mit zusätzlich 1% GlutaMax, 1% Pencillin/Streptomycin und 10% DCC-FBS (dextran-coated charcoal-treated fetal bovine serum) kultiviert. Bei letzterem handelt es sich um Fetales Rinderserum, aus dem nicht-polare Inhaltsstoffe wie gewisse Wachstumsfaktoren und Hormone herausgefiltert wurden, um eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse in den folgenden hormonellen Stimulationsversuchen zu vermeiden.

Für Dezidualisierungsexperimente wurden die Zellen trypsiniert und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden 300.000 Zellen pro Well in die Wells einer 6 Well Multiwellplatte pipettiert. Die Zellen wurden weiter in DMEM/F12 mit 10% DCC-FBS kultiviert. Sobald sie zu 75-80% Konfluenz erreicht hatten (nach ca. 48 Stunden), wurde auf DMEM/F12 mit 2% DCC-FBS gewechselt. Ab diesem Punkt wurden die HESC je nach Kondition für bis zu 6 Tage mit 1 µM Progesteron oder 1 µM Medroxyprogesteronacetat (Sigma Aldrich) und 0,5 mM cAMP behandelt. Das Medium wurde dabei alle 48 Stunden erneuert.

Zum Ernten der Zellen wurde das Medium aus jedem Well abpipettiert und in ein 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, welches anschließend bei -80°C eingefroren wurde. Jeder Well wurde mit 1 mL 1xPBS gewaschen, welches verworfen wurde. Danach wurden 800 µL vorgewärmtes Trypsin EDTA 0,05% in jedes Well gegeben und die Multiwellplatte für 10 Minuten in den CO₂-Inkubator (37°C) gestellt. Noch anhaftende Zellen wurden durch leichtes Klopfen vom Boden gelöst. Pro Well wurden 2 mL DMEM/F12 mit 10% DCC-FBS hinzugegeben und der Inhalt eines jeden Wells in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt. Jedes Reaktionsgefäß wurde mit PBS auf 10 mL aufgefüllt und

anschließend für 6 Minuten zentrifugiert (478 g). Der Überstand verworfen und jedes Reaktionsgefäß mit 1xPBS erneut auf 7 mL gefüllt. Nach erneutem Zentrifugieren für 4 Minuten (478 g) wurde der Überstand verworfen und die Zellpellets in Flüssigstickstoff eingefroren, bevor sie bei -80°C gelagert wurden.

2.4.13 RNA-Isolierung

RNA wurde aus gefrorenen Zellpellets mittels des PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher, Cat. No. 12183020) nach den Instruktionen des Herstellers isoliert. Die RNA wurde in 30 µL RNase-freiem Wasser eluiert und aliquotiert, um wiederholte Zyklen von Auftauen und Einfrieren zu vermeiden. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch mithilfe des Varioskan LUX™ (Thermo Scientific™). Zur Bewertung der Reinheit der RNA-Proben wurde die Absorption bei verschiedenen Wellenlängen des Lichtes erfasst. Hierbei wurde ein Quotient von A260nm/A280nm von $\geq 1,8$ als Mindestwert für weiter verwendete RNA-Proben verwendet. Die RNA wurde anschließend entweder direkt für die Synthese von cDNA weiterverwendet oder bei -80°C für weitere Anwendungen gelagert.

2.4.14 cDNA-Synthese

Zur Herstellung der cDNA wurde das Maxima™ H Minus cDNA Synthesis Master Mix (with dsDNase) Kit (Thermo Fisher, Cat. No. M1681) nach den Instruktionen des Herstellers verwendet. Hierfür wurden jeweils 300 µg bzw. 450 µg RNA eingesetzt. Zur Elimination einer möglichen Kontamination der Probe mit genomischer DNA erfolgte als erster Schritt eine Inkubation bei 37°C mit doppelstrangspezifischer DNase, bevor der Maxima™ H Minus cDNA Synthesis Master Mix hinzugegeben wurde. Dieser enthält neben der reversen Transkriptase zur Herstellung der cDNA auch einen RNase Inhibitor zum Schutz der RNA vor Degradation. Nach Inkubation bei 25°C für 10 Minuten, gefolgt von 50°C für 15 Minuten, wurde die Reaktion durch 5 Minuten bei 85°C terminiert. Die cDNA mit einem Endvolumen von 20 µL wurde mit 20 µL (bei 300 µg RNA) bzw. 40 µL (bei 450 µg RNA) RNase-freiem Wasser verdünnt. Die cDNA wurde im Anschluss entweder direkt für eine qPCR weiterverwendet oder bei -80°C für spätere Analysen gelagert.

2.4.15 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Um die in jedem Well enthaltene Menge des PCR-Produktes erfassbar zu machen, wurde ein Power SYBR™ Green PCR-Master Mix (Thermo Fisher) verwendet. Der enthaltene SYBR Green Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA und daher während einer PCR an das amplifizierte Produkt. Die abgegebene Menge an Fluoreszenz wird gemessen und ermöglicht eine Aussage über die im jeweiligen Well enthaltene Menge an PCR-Produkt. Für die qPCR wurde in jedes Well

- 5 µL SYBR Green
- 0,8 µL Vorwärts-Primer
- 0,8 µL Rückwärts-Primer
- 2,4 µL Molekulares Wasser

sowie 1 µL der jeweiligen Proben-cDNA zu einem Reaktionsvolumen von 10 µL je Well pipettiert. Jede Reaktion wurde für Organoid-Versuche als Duplikat und für HESC-Versuche als Triplikat durchgeführt. Für alle Reaktionen wurde das QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher) verwendet.

Um die Ausgangsmenge der Ziel-DNA in jedem Well zu beurteilen, wird der sogenannte ‚cycle threshold‘, auch Ct-Wert genannt, verwendet. Dieser bezeichnet denjenigen Zyklus der PCR-Reaktion, in dem das Fluoreszenzsignal des PCR-Produktes in diesem Well sich vom unspezifischen Hintergrundsignal abhebt. Der Ct-Wert ist dabei invers proportional zur Ausgangskonzentration der Ziel-DNA in der jeweiligen Probe.

Um eine relative Quantifizierung zu ermöglichen, ist die Normalisierung der Expression des Zielgenes mittels eines homogen exprimierten und nicht regulierten Haushaltsgen (HKG) notwendig. Hierfür wurde das ribosomale Protein L19 als HKG verwendet.

2.4.15.1 Verwendete Primer

Für die quantitative PCR wurden folgende Primer-Sequenzen verwendet:

Tabelle 7 Übersicht über die in der qPCR verwendeten Primer-Sequenzen

Gen	Orientierung	Sequenz (5'-3')
PAEP	Forward	GCGACCAACAACATCTCCCTC
	Reverse	GGACCTTCTTCTCAACACAGC
17HSDb2	Forward	TCAAAACTCCGGCAAATACC
	Reverse	ACCTGTGGATCAGAAGGCAG
SPP1	Forward	GGAGTTGAATGGTGCATACAAGG
	Reverse	CCACGGCTGTCCCAATCAG
SOX9	Forward	GTACCCGCACTTGCACAAC
	Reverse	TCTCGCTCTCGTTCAGAAGTC
MUC1	Forward	AGAGAAGTTCAGTGCCCAGC
	Reverse	TGACATCCTGTCCCTGAGTG
L19	Forward	GCGGAAGGGTACAGCCAAT
	Reverse	GCAGCCGGCGAAA
IGFBP1	Forward	CGAAACTCTCGATGTCACCA
	Reverse	TGTCTCCTGTGCCTTGGCTAAAC
PRL	Forward	TCAGGATGAACCTGGCTGAGTA
	Reverse	AAGCTGTAGAGATTGAGGAGCAAAC

2.4.15.2 Statistische Auswertung der qPCR-Daten

Zur relativen Quantifizierung der qPCR-Daten wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Die gemessenen Werte der hormonbehandelten Proben wurden dabei auf eine jeweilige unstimulierte, passagen-gleiche Kontrollprobe (ExM) bezogen. Berechnungen erfolgten mithilfe der Statistiksoftware JMP (Version 14, SAS Institute) und folgenden Formeln:

1. $\Delta C_t = C_t \text{ Mittelwert Zielgen} - C_t \text{ Mittelwert Haushaltsgen}$
2. $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ Test-Probe} - \Delta C_t \text{ Kontroll-Probe}$
3. Relative Expressionsveränderung = $2^{-\Delta\Delta C_t}$

Die Standardabweichung des ΔC_t -Wertes wurde aus den Standardabweichungen der Werte für das Ziel- und das Haushaltsgen errechnet:

4. $s = ((s_1)^2 + (s_2)^2)^{1/2}$, wobei s für die Standardabweichung steht und $x^{1/2}$ = Quadratwurzel aus x

Da die Berechnung des $\Delta\Delta Ct$ -Wertes die Subtraktion des ΔCt -Wertes der Kontroll-Probe beinhaltet und damit die Subtraktion einer willkürlichen Konstanten, entspricht die Standardabweichung des ΔCt -Wertes der des $\Delta\Delta Ct$ -Wertes.

Um die Standardabweichung des $\Delta\Delta Ct$ -Wertes bei der Berechnung der relativen Expressionsveränderung miteinzubeziehen, wird jede relative Expressionsveränderung mit einer Spannweite/Range angegeben, die wie folgt berechnet wurde:

5. $2^{-\Delta\Delta Ct \pm s}$, wobei s die Standardabweichung des $\Delta\Delta Ct$ -Wertes bezeichnet.

Die errechneten ΔCt -Werte, $\Delta\Delta Ct$ -Werte und relativen Expressionsveränderungen (EFC) sind im Ergebnisteil für das jeweilige Gen angegeben. Da statistische Tests auf Basis der ΔCt -Werte durchgeführt wurden, bezieht sich der dabei angegebene Mittelwert für die relativen Expressionsveränderungen auf den Mittelwert der jeweiligen $\Delta\Delta Ct$ -Werte. Der so berechnete Mittelwert entspricht aufgrund der Logarithmisierung nicht dem arithmetischen Mittel der einzelnen relativen Expressionsveränderungen.

Als statistischer Test zum Vergleich der Expressionsniveaus bzw. dessen Veränderungen innerhalb einer Gruppe von Organoidlinien (MRKHS oder Kontrollen) wurde ein One-way ANOVA mit post-hoc Tukey-Test verwendet. Zum Vergleich des Expressionsniveaus bzw. dessen Veränderung zwischen den Gruppen MRKHS-Organoidkulturen und Kontrollkulturen wurde ein ungepaarter t-Test auf Basis der $\Delta\Delta Ct$ -Werte durchgeführt.

2.4.16 Statistische Auswertung von Operations- und Pathologie-Berichten für Patientinnen mit MRKH-Syndrom

Die Daten des unter 2.2 beschriebenen Patienten-Kollektivs wurden in einer REDCap-Datenbank auf den Servern der Universitäts-Frauenklinik Tübingen erfasst. Hierzu gehörten sowohl allgemeine Patienten-Informationen wie MRKHS-Subtyp und assoziierte Fehlbildungen als auch sämtliche an der

Universitäts-Frauenklinik vorliegenden Operationsberichte dieser Patientinnen. Hierbei wurde für jede Patientin erfasst, ob intraoperativ Uterus-Rudimente festgestellt werden konnten und falls ja, ob ein- oder beidseitig.

Zur genaueren Analyse dieses Daten-Satzes erfolgte ein Export nach Microsoft Excel (Version 2401, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Für alle Patientinnen, deren Uterus-Rudimente entfernt wurden, wurde anhand der Pathologie-Berichte die Größe der Rudimente ergänzt und ob histopathologisch der Nachweis von Endometrium im Rudiment erfolgte.

Die Größe der Uterus-Rudimente wurde in den Pathologie-Berichten in der Regel mit Höhe, Breite und Tiefe in Zentimetern angegeben, wodurch das jeweilige Volumen durch Multiplikation (Höhe x Breite x Tiefe) errechnet wurde. In einigen Fällen erfolgte nur die Angabe von Höhe (h) und Durchmesser (d), weshalb in diesen Fällen das Volumen analog einem Zylinder mit folgender Formel berechnet wurde:

$$\text{Volumen} = \pi \times (d/2)^2 \times h$$

Rudimente, für die entweder nur eine einzige Größendimension angegeben wurde oder die intraoperativ morcelliert wurden, wurden aufgrund der zu hohen Messungengenauigkeit von der Analyse ausgeschlossen.

Anschließend wurde mittels des Programms GraphPad Prism (Version 9.5.1, GraphPad Holdings, LLC, San Diego, CA, USA) eine statistische Auswertung der Daten durchgeführt, wobei eine Einteilung der Patientinnen anhand ihres Fehlbildungstyps in verschiedene Subgruppen sowie ein Vergleich dieser Subgruppen untereinander hinsichtlich Charakteristika wie der Häufigkeit von Uterus-Rudimenten oder endometrialem Gewebe erfolgte. Der Chi-Quadrat bzw. Chi-Square Test wurde hierbei für Zähldaten verwendet, der Welch's t-Test für kontinuierliche Variablen.

3 Ergebnisse

Die folgenden Daten wurden nach vorheriger schriftlicher Information an das Promotionsbüro auszugsweise bereits im Journal „Disease Models & Mechanisms“ [24] sowie im „Journal of Clinical Medicine“ [140] veröffentlicht.

3.1 Etablierung von Endometrium-Organoidkulturen

3.1.1 Etablierung von Organoiden aus MRKHS-Gewebe

Über einen Zeitraum von sechs Monaten wurden 24 Patientinnen mit MRKH-Syndrom auf Uterus-Rudimente untersucht, die in der Universitäts-Frauenklinik zur Anlage einer Neovagina (modifizierte Methode nach Vecchiotti) operiert wurden. 18 dieser Patientinnen wiesen ein MRKH-Syndrom vom Typ 1 auf. Lediglich sechs Patientinnen besaßen assoziierte Fehlbildungen und wurden daher als Typ 2 klassifiziert, wobei renale Malformationen am häufigsten vorkamen. Bei 18 Patientinnen, 16 davon mit MRKH-Syndrom Typ 1, wurden intraoperativ Uterus-Rudimente entnommen. In allen Fällen erfolgte die Entnahme beidseitiger Rudimente, sodass eine Gesamtzahl von 36 Rudimenten auf Endometrium untersucht wurde.

Jedes Rudiment wurde nach der Entnahme mit einem sterilen Skalpell in Schichten von ungefähr fünf Millimetern komplett lamelliert und die Schnittflächen makroskopisch begutachtet. Besondere Aufmerksamkeit galt hierbei einer möglichen Cavum-artigen Struktur im Inneren der Rudimente. Mehrmals ergab sich hierbei trotz vertikaler Lamellierung eine Art „Zapfen“ im Rudiment, was in Abbildung 2B zu erkennen ist, wobei an der Spitze dieses Zapfens wiederholt Endometrium zu finden war. Bei vier Rudimenten von vier unterschiedlichen Patientinnen war so bei der Lamellierung des Rudiments Gewebe abgrenzbar, welches makroskopisch als Endometrium eingeschätzt wurde (s. Tab. 8). Dieses Gewebe, das sich zumeist gelblich darstellte, wurde entnommen und, wie unter 2.4.1. beschrieben, weiterverarbeitet.

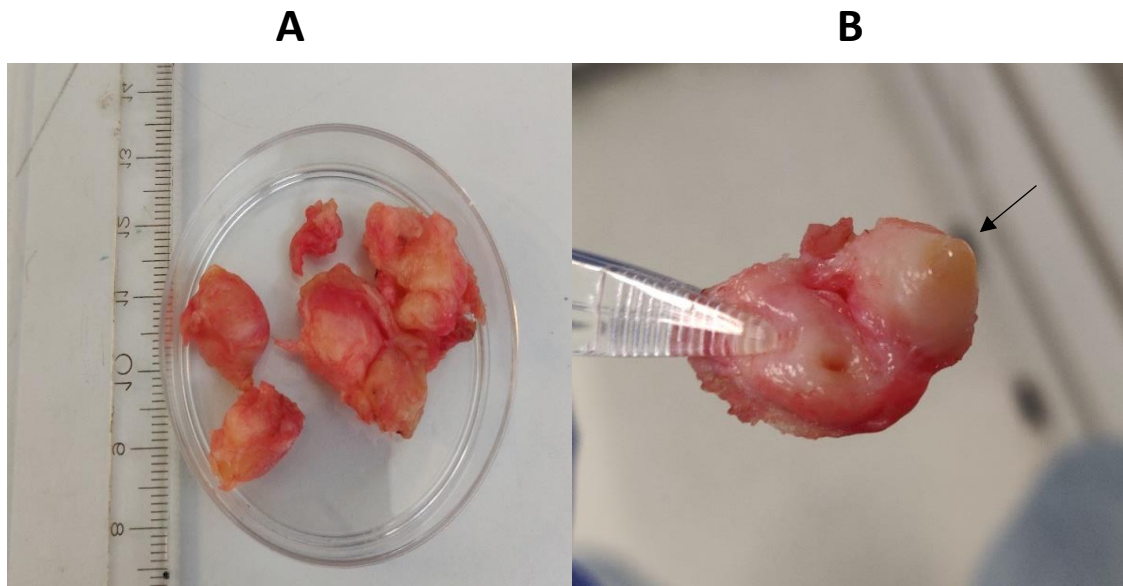


Abbildung 2 Intraoperativ entferntes Uterusrudiment.

A: Ein intraoperativ in mehreren Stücken entferntes Uterus-Rudiment. Die Rudimente wurden zuerst vermessen und anschließend mit einem Skalpell lamelliert.

B: Eröffneter Teil eines Uterusrudiments mit makroskopisch sichtbarem, gelbem Endometrium an der Spitze einer zapfenartigen Struktur (Pfeil)

Tabelle 8 MRKHS-Patientengruppe, bei der die Entnahme von Gewebeproben zur Etablierung von Organoidkulturen erfolgte.

Bei vier Rudimenten konnte makroskopisch, bei insgesamt sechs Rudimenten mikroskopisch Endometrium nachgewiesen werden. Bei allen makroskopischen Nachweisen konnten Organoidkulturen erfolgreich etabliert werden. (J = Ja; N = Nein)

Interne Studiennummer	MRKHS Typ	Zahl der Rudimente	Anzahl an entnomm. Gewebeproben	Makroskop. Endometrium	Mikroskopisch Endometrium	In Kultur gesetzt	Organoide etabliert
14	1	2	3	N	J	J	N
15	1	2	3	N	J	J	N
16	1	2	2	N	N	J	N
17	1	2	2	J	J	J	J
18	1	2	1	J	J	J	J
19	1	2	1	N	N	N	N
20	1	2	1	N	N	J	N
21	1	2	1	J	J	J	J
22	1	2	1	J	J	J	J

Für alle vier Gewebeprobe (MRKHS 17, 18, 21 & 22), die makroskopisch als Endometrium eingeschätzt wurden, erfolgte über eine standardmäßige Aufarbeitung durch die Fachabteilung Gynäkopathologie des Instituts für Pathologie der Universität Tübingen die Bestätigung, dass endometriales Gewebe in den Rudimenten enthalten war. Entsprechend waren nach der Verarbeitung des Gewebes und dem Ansetzen dieser Kulturen unter dem Lichtmikroskop endometriale Drüsenschläuche abgrenzbar (s. Abb. 3).

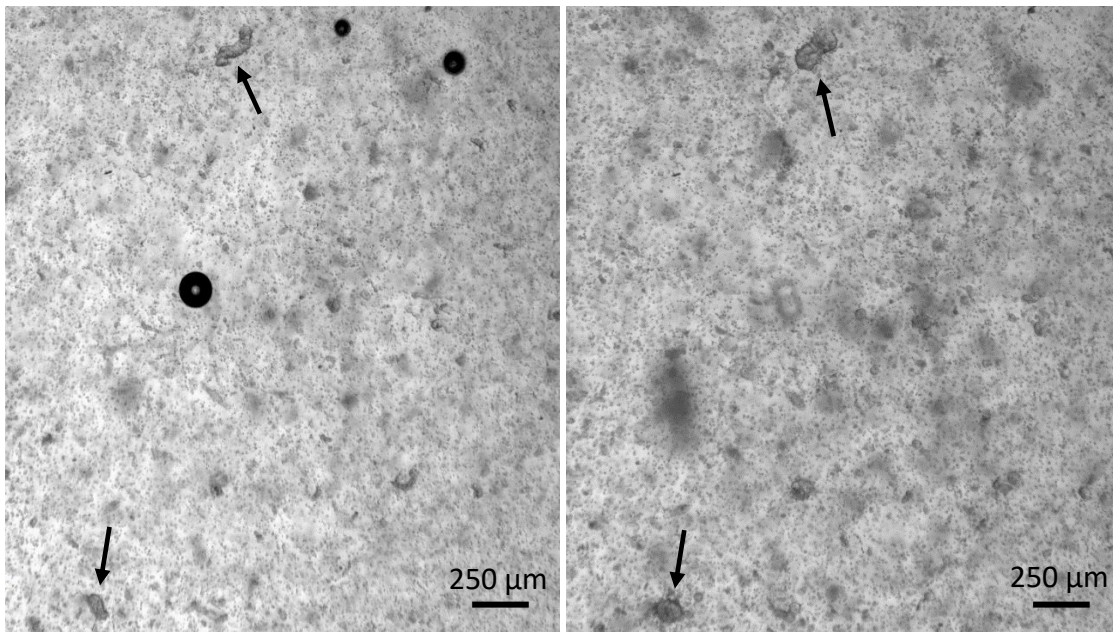


Abbildung 3 Erstansatz einer MRKHS-Organoidkultur.

*Links: Originalverdau einer MRKHS-Gewebeprobe mit makroskopischem Endometrium. Größere erhaltene Drüsenstücke (schwarze Pfeile) sind an Tag 0 deutlich abgrenzbar.
Rechts: Organoidwachstum aus diesen Drüsenstücken nach zwei Tagen*

Aus allen vier Proben ist es gelungen, Organoidkulturen zu etablieren. Die Erfolgsquote zur Etablierung von MRKHS-Organoiden bei makroskopischem Nachweis von Endometrium lag daher bei 100%.

Bei acht weiteren Rudimenten von fünf Patientinnen wurde ebenfalls eine Gewebeprobe entnommen, ohne einen Hinweis auf klar makroskopisch abgrenzbares endometriales Gewebe zu haben. Hierbei wurde meist ein zentrales Gewebestück aus der proximalen Hälfte des Rudiments entnommen, um eventuelle makroskopisch nicht abgrenzbare Gangstrukturen zu treffen.

Bei zwei dieser Patientinnen (MRKHS 14 & 15) erfolgte der mikroskopische Nachweis von fokalem Endometrium in der histopathologischen Aufarbeitung jeweils eines Rudiments. Die von diesen Rudimenten exziierten Gewebeproben wiesen allerdings nach Verdau und Ansetzen in Kultur keine Drüsenstrukturen oder andere Hinweise auf Endometrium unter dem Lichtmikroskop auf. Folglich war in diesen Kulturen auch nach mehreren Tagen keine Organoid-Formierung oder -Wachstum feststellbar (s. Abb. 4).

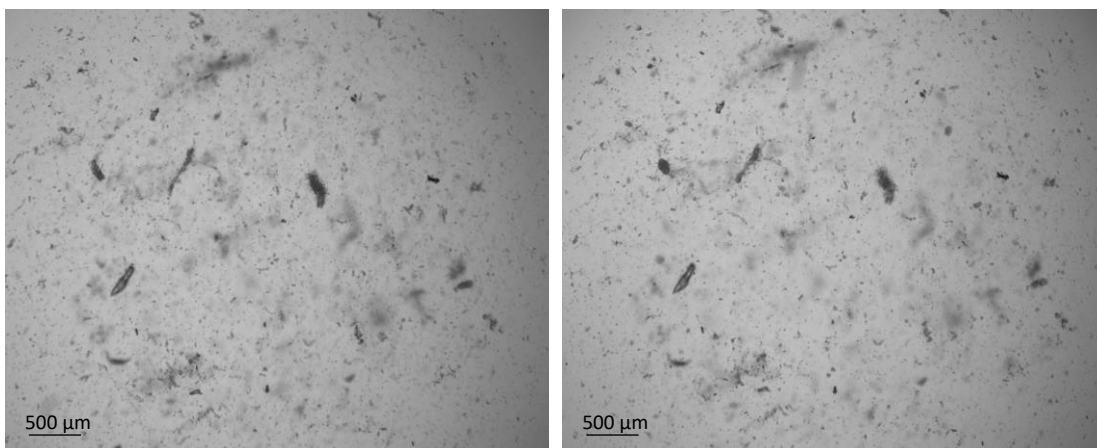


Abbildung 4 Erstansatz aus Gewebe ohne makroskopisches Endometrium.

*Links: Originalverdau von MRKHS 14. Es lassen sich keine Drüsenstücke abgrenzen.
Rechts: Auch nach sechs Tagen sind keine Organoide erkennbar.*

Bei den anderen drei Patientinnen (MRKHS 16, 19 & 20) waren in der Kultur keine Drüsenstrukturen abgrenzbar. Die histopathologische Aufarbeitung der Rudimente konnte bei diesen Patientinnen jedoch auch kein Endometrium nachweisen.

3.1.2 Etablierung von Organoiden aus Kontrollgewebe

Zur Etablierung von Kontrollorganoiden wurde Endometrium von vorwiegend hysterektomierten Kontrollpatientinnen nach makroskopischer Begutachtung durch einen Gynäkopathologen oder eine Gynäkopathologin verwendet (s. Abb. 5). Hierbei wurde Gewebe von insgesamt 21 Patientinnen verarbeitet. Das Gewebe wurde wie unter 2.4.1 beschrieben prozessiert. Hierbei ist es uns gelungen, aus 14 von 21 Gewebeproben (66,6%) erfolgreich eine Organoid-Kultur zu etablieren. Ursächlich für Misserfolge, die während der anfänglichen

Etablierung des Modells auftraten, war dabei meist eine sehr geringe Ausgangsmenge an Endometrium. Diese war abhängig von der Zyklusphase der Patientin und Höhe des Endometriums, sowie der Größe der verfügbaren Gewebeprobe.



Abbildung 5 Kontrollgewebe vor der Verarbeitung

3.2 Optimierung der Kultivierungsmethoden für eine erfolgreiche Etablierung des Endometrium-Organoidmodells

Die methodische Etablierung des Organoidmodells und die Optimierung der Kultivierung wurde vorwiegend anhand von Kontrollgewebe und -organoiden durchgeführt.

3.2.1 Umsetzen von Organoidkulturen

Initial wurden zwei verschiedene Methoden zur Umsetzung der Organoide getestet: Die Zerkleinerung mittels Trypsins und die mechanische Variante mit einer 27 $\frac{3}{4}$ G Nadel (siehe 2.4.3). Bei der Evaluation des Wachstumsverhaltens der folgenden Passage ergaben sich tendenzielle Vorteile für die mechanische Zerkleinerung mit Nadel und Spritze bezüglich der Anzahl der Organoide nach mehreren Tagen Wachstum. Dies ist in Abbildung 6 an einer repräsentativen Linie dargestellt. Die mechanische Zerkleinerung wurde daher in der Folge als Standardmethode zum Umsetzen der Organoidkulturen festgelegt. Die Erprobung unterschiedlicher Methoden zum Umsetzen der Kulturen erfolgte dabei noch unter Verwendung des ersten Kultur Nährmediums.

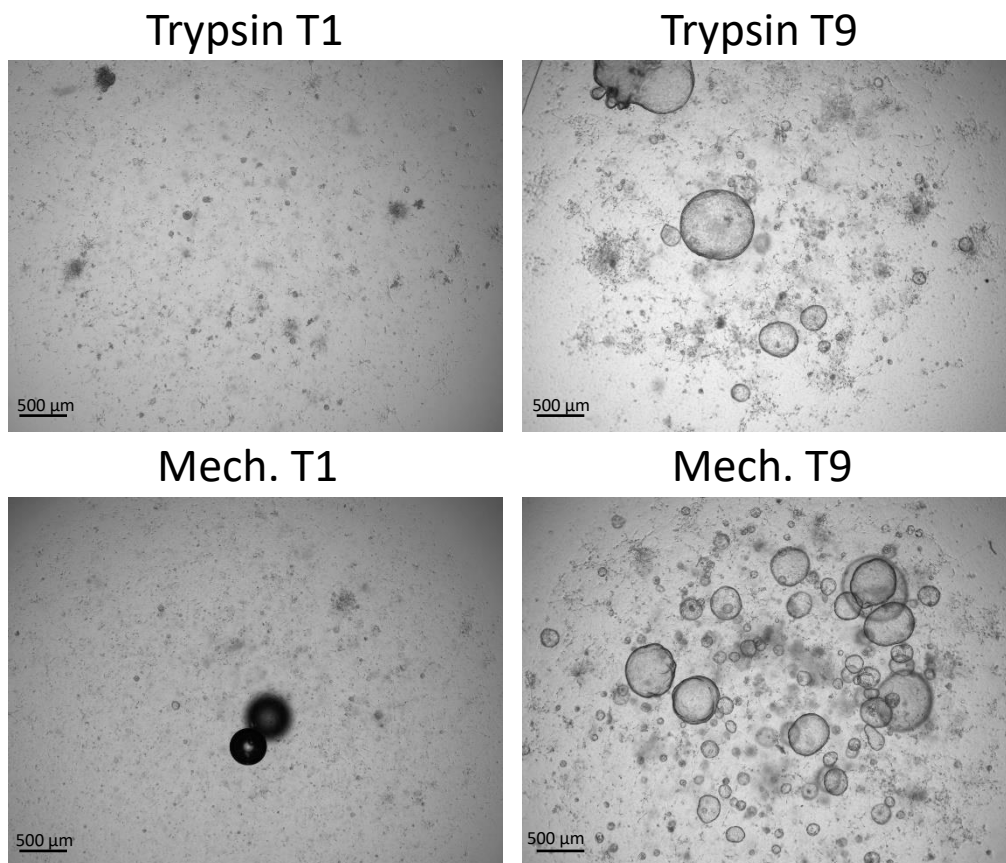


Abbildung 6 Umsetzen einer Organoid-Linie.

Eine Kontroll-Organoidlinie wurde an Tag 0 zur Hälfte mit Trypsin und zur Hälfte mechanisch zerkleinert und neu ausplatiert. Nach neun Tagen waren deutlich mehr Organoide in den Wells vorhanden, die beim Umsetzen mechanisch zerkleinert wurden.

3.2.2 Fibroblasten-ähnliche Zellen im Erstantatz einer Kultur

Im initialen Ansatz einer Kultur konnten Fibroblasten-ähnliche Zellen, die aus der Gewebeprobe übertragen wurden, absinken und am Boden der Zellkulturplatte wachsen. Nach 6-8 Tagen führte dies teilweise zu einer Behinderung der Matrigeltropfen-Architektur. Als hilfreich erwies sich hierbei ein vorsichtiges Ablösen der Tropfen beim Umsetzen, ohne am Boden der Wells zu kratzen, um möglichst wenige dieser Zellen in die nächste Passage zu übertragen. Ebenfalls vorteilhaft war die Selektivität des Wachstumsmediums, sodass Fibroblasten-ähnliche Zellen in der Regel nach zwei Passagen kein Problem mehr darstellten und in höheren Passagen nicht mehr sichtbar waren (s. Abb. 7).

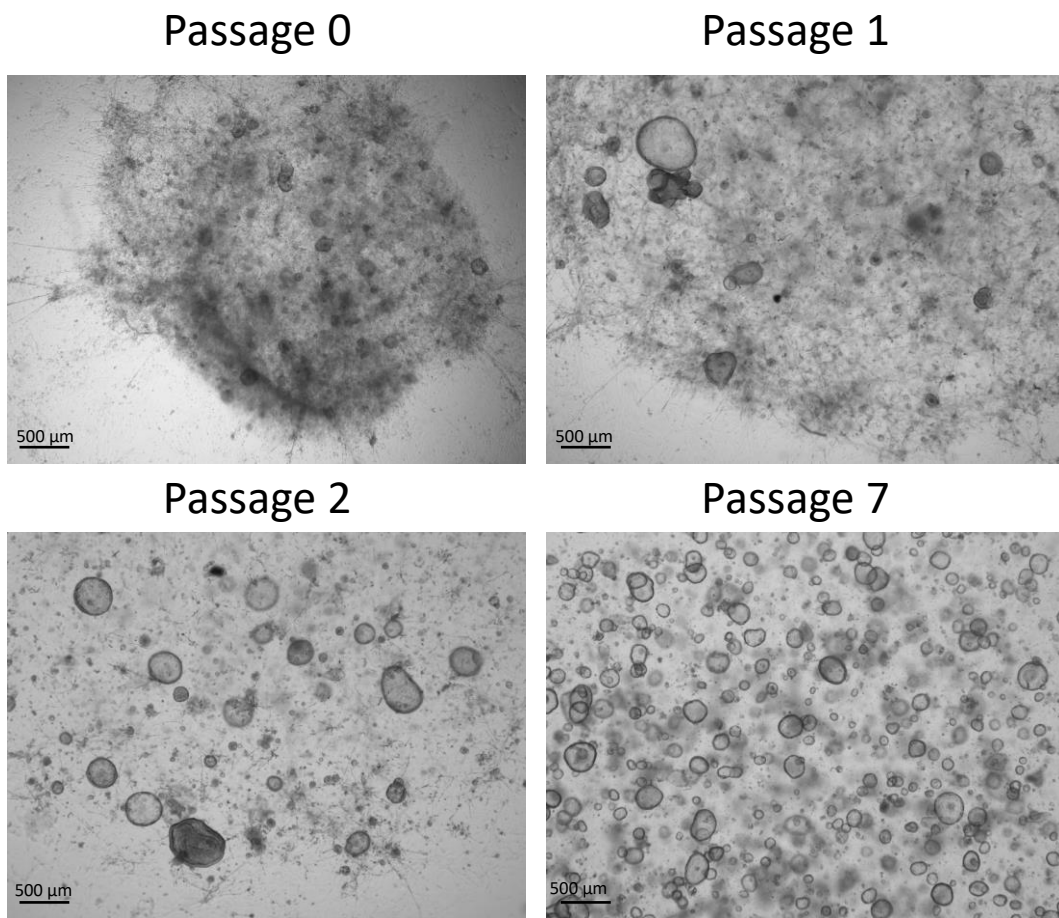


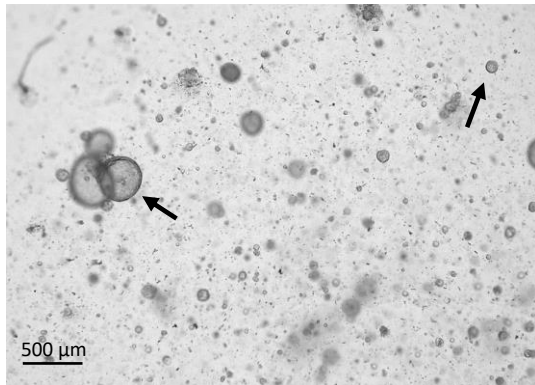
Abbildung 7 Fibroblasten-ähnliche Zellen in den Organoidkulturen.

In den Kulturen enthaltene Fibroblasten-ähnliche Zellen konnten über mehrere Passagen hinweg erfolgreich herausselektiert werden

3.2.3 Kulturnährmedium und Mediumoptimierung

Die Kultivierung der ersten Linien erfolgte mit dem unter 2.4.2.2 beschriebenen Nährmedium. Dieses basierte zu 50% auf einem konditionierten Medium, welches die Faktoren WNT3a, den WNT-Pathway-Aktivator R-Spondin und den BMP-Inhibitor Noggin enthielt. Mit diesem Medium angesetzte Organoidkulturen zeigten initial meist ein moderates bis gutes Wachstum. Vereinzelt kam es bei manchen Linien aber mit fortgeschrittener Dauer einer Passage (6 Tage +) zu einem Auflösen/Zerfall von Organoiden und in der Folge zu einem flächigen Wachstum einzelner Zellverbände (siehe Abbildung 8).

Tag 5



Tag 10

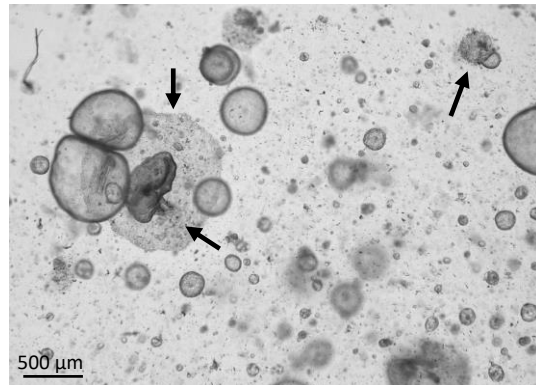


Abbildung 8 Wachstum der Organoide unter Kulturnährmedium Version 1.

Unter dem ersten Kulturnährmedium kommt es vereinzelt zum Zerfall von Organoiden nach einigen Tagen und anschließendem flächigen Wachstum.

Zudem war bei zahlreichen Organoidlinien eine deutliche Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit und Anzahl der Organoide mit steigender Passage-Zahl feststellbar. Besonders wenn beim Umsetzen einer Kultur in einem Verhältnis von 1:3 oder höher Zellen eingefroren wurden, zeigten die wieder in Kultur gesetzten Anteile oftmals ein überproportional schlechteres Wachstum, was die langfristige Etablierung von Linien erschwerte. Dies ist in Abbildung 9 exemplarisch an einer Kontroll-Organoidlinie dargestellt.

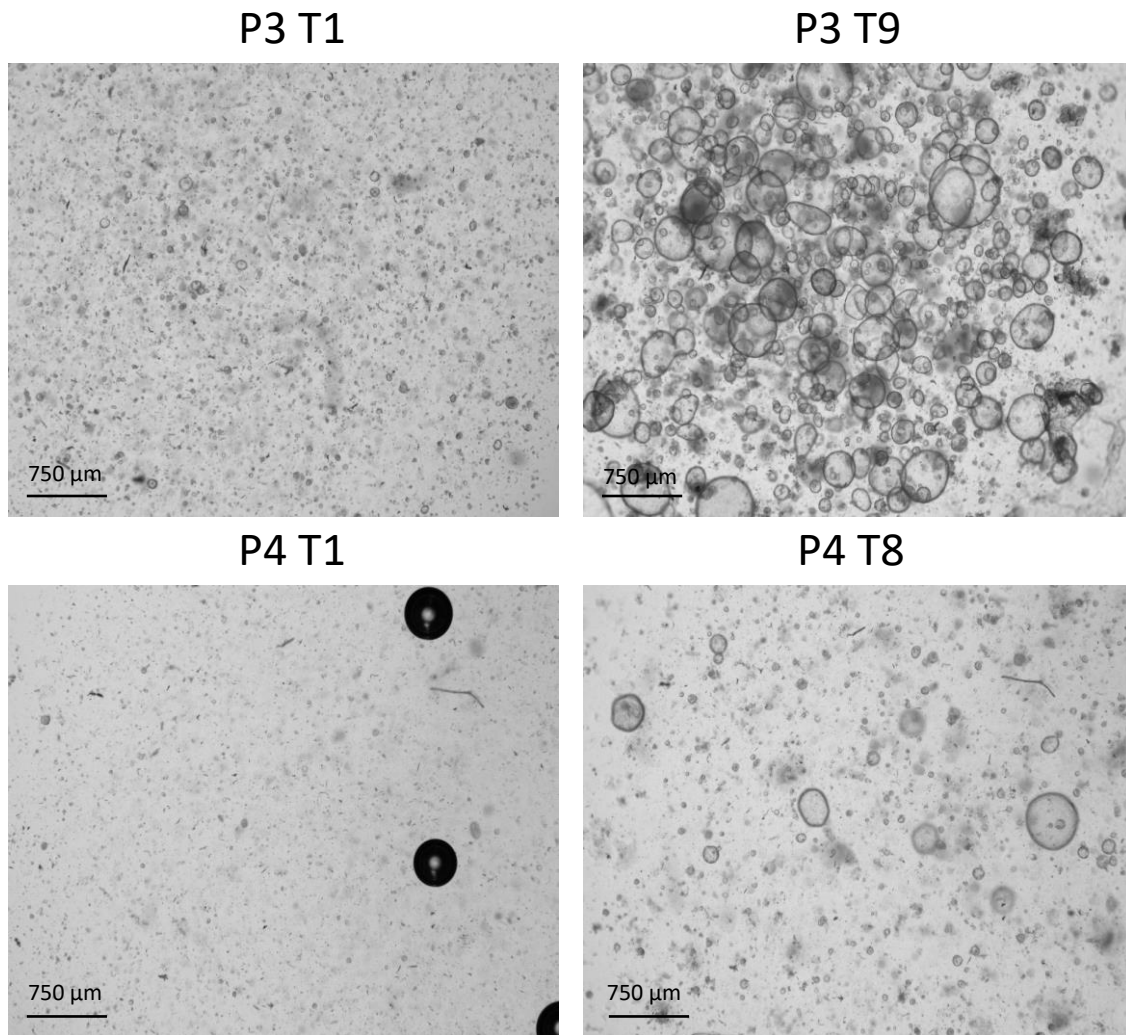


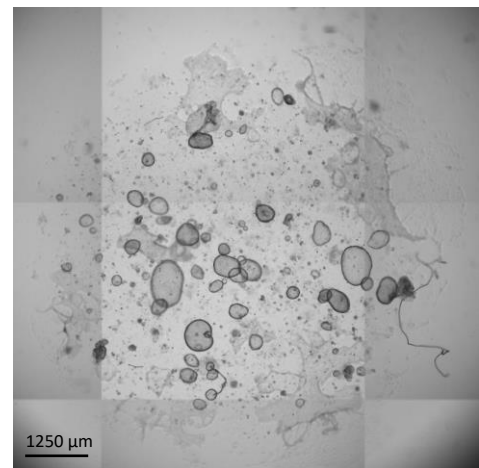
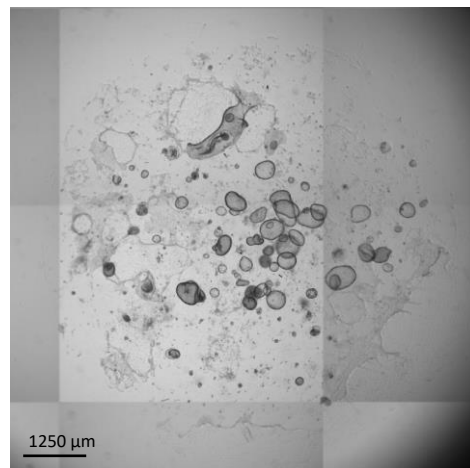
Abbildung 9 Wiederansetzen von Organoiden unter Kulturmedium 1.

Das Umsetzen von Kulturen in einem Verhältnis von 1:3 konnte unter Nährmedium 1 zu einem proportional erheblich schlechteren Organoid-Wachstum in der nächsten Passage führen.

Aus diesen Gründen wurde ein Medium-Versuch mit einem zweiten Nährmedium konzipiert, welches anstatt des L-WRN konditionierten Mediums rekombinantes Noggin, kein WNT3a und 10% R-Spondin konditioniertes Medium enthielt (genaue Zusammensetzung siehe 2.4.2.3). Mehrere Wells einer Linie wurden mit Nährmedium 1 oder mit Nährmedium 2 kultiviert und die Unterschiede bezüglich der Organoid-Anzahl nach 6 Tagen bewertet. Hierbei zeigte sich eine deutliche höhere Anzahl von Organoiden in den Wells, die das Nährmedium 2 ohne WNT3a erhalten hatten (siehe Abbildung 10). In der Folge wurde daher für die Kultivierung der Organoiden auf ein neues und modifiziertes Nährmedium 3 ohne

WNT3a umgestellt. Unter dem neuen Nährmedium konnte in vielen Kulturen nach dem Umsetzen eine höhere Anzahl von Organoiden festgestellt werden. Zudem zeigten die Kulturen keine Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit mehr, was auch aus Abbildung 16 (Kapitel 3.3) ersichtlich wird.

Nähr-
medium
1



Nähr-
medium
2

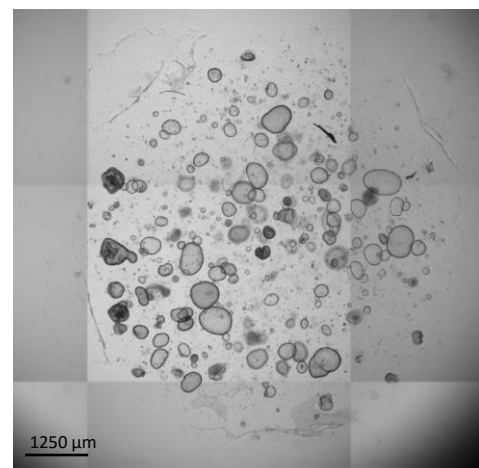
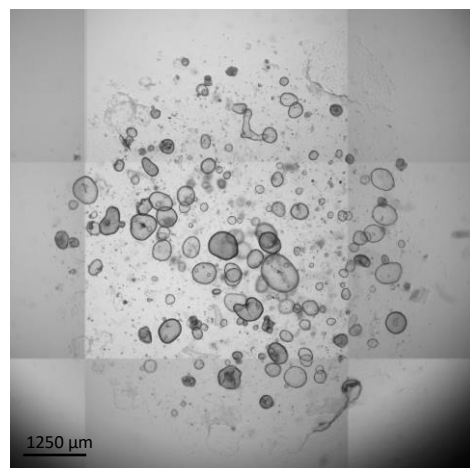


Abbildung 10 Unterschiede in der Organoid-Anzahl an Tag 6 nach Kultivierung mit NM 1 oder NM 2.

Mehrere Wells der Linie MRKHS 3 erhielten die gleiche Menge an Zellsuspension und wurden für 6 Tage entweder mit NM 1 oder NM 2 kultiviert, bevor die erreichte Anzahl an Organoiden evaluiert wurde.

3.3 Wachstum der MRKHS-Organoid

Nach Verarbeitung des Endometriums von MRKHS-Patientinnen gemäß 2.4.1, ausplattieren in Matrigel/BME und Hinzugeben des Wachstumsmediums oder nach dem Umsetzen einer Kultur zeigten enthaltene Drüsenstücke in der Regel eine rasche Selbstorganisation (siehe Abb. 11). Bereits innerhalb von 24 Stunden waren erste formierte Organoid unter dem Lichtmikroskop erkennbar. Organoid aus größeren Drüsenstücken zeigten dabei in den ersten Tagen einer Passage meist ein schnelles Wachstum.

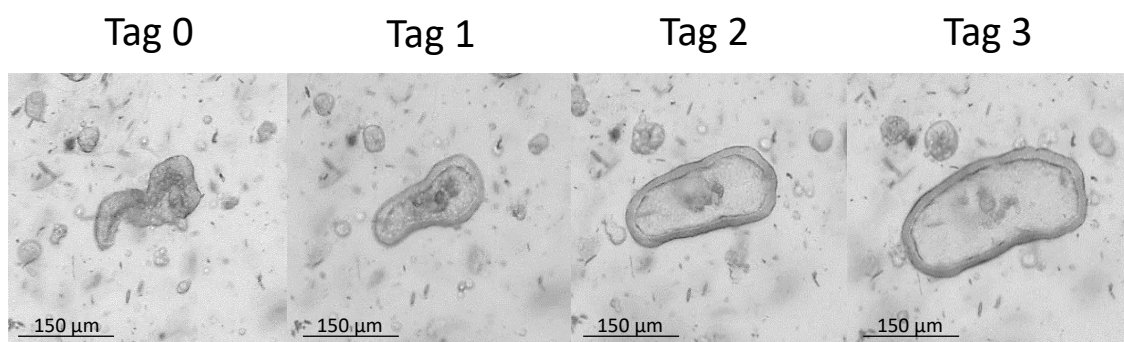
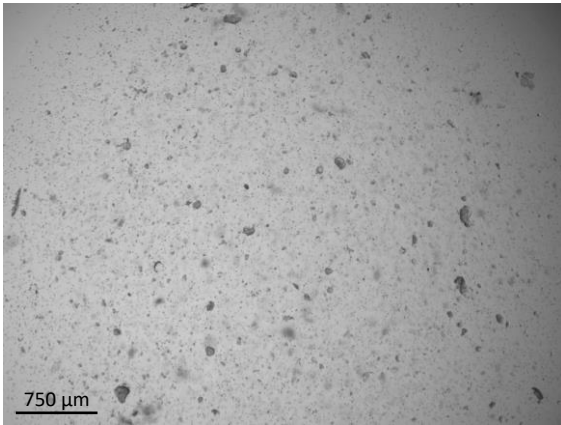


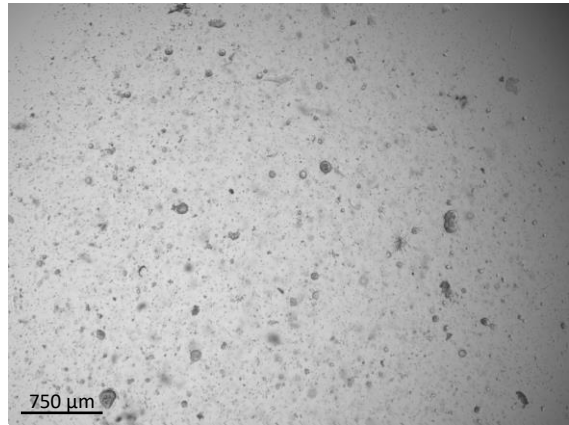
Abbildung 11 Selbstorganisation eines endometrialen Drüsenstücks zu einem Organoid und Wachstum über mehrere Tage.

Auch aus kleineren Zellverbänden und Einzelzellen erfolgte eine Organoidbildung. Diese zeigten in den ersten Tagen häufig ein gemäßigtes Wachstum, bis sie eine mittlere Größe erreicht hatten, wonach die Wachstumsgeschwindigkeit des Organoids im Sinne einer höheren Anzahl an teilungsfähigen Zellen häufig zunahm. Besonders beim Erstanatz einer Kultur dauerte es oftmals länger, bis eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit erreicht wurde. Dies wird auch in Abbildung 12 ersichtlich, beim Vergleich des Wachstums innerhalb der ersten sieben Tage der Kultur zu dem innerhalb der letzten drei. Allgemein zeigten die MRKHS-Organoid ein gleichmäßiges und regelrechtes Wachstumsverhalten, das vergleichbar war mit dem Proliferationsverhalten von Organoiden aus Kontrollgewebe, was im Vergleich von Abbildung 12 und 13 ersichtlich wird.

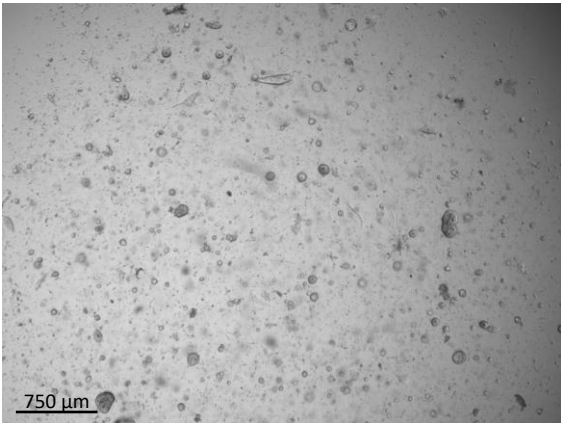
P0 T1



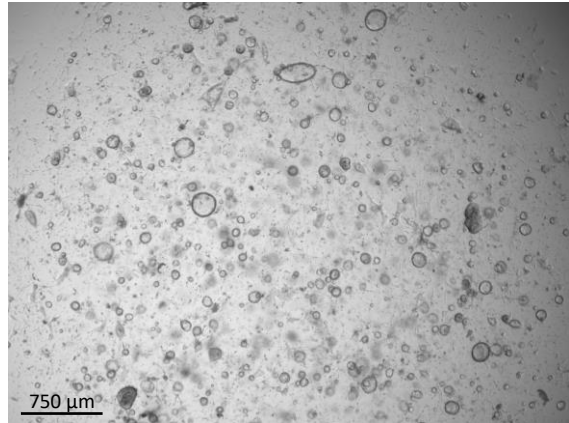
P0 T3



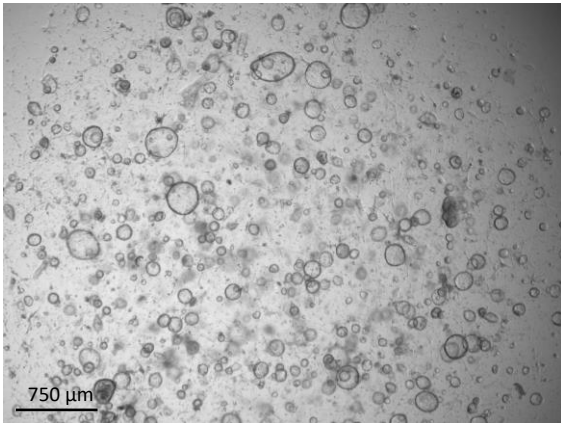
P0 T5



P0 T7



P0 T8



P0 T10

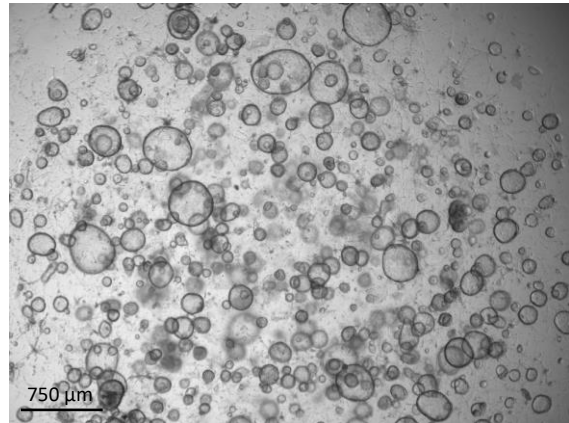


Abbildung 12 Wachstumsverlauf eines Erstantztes einer MRKHS-Organoid-Kultur von Tag 1 bis Tag 10

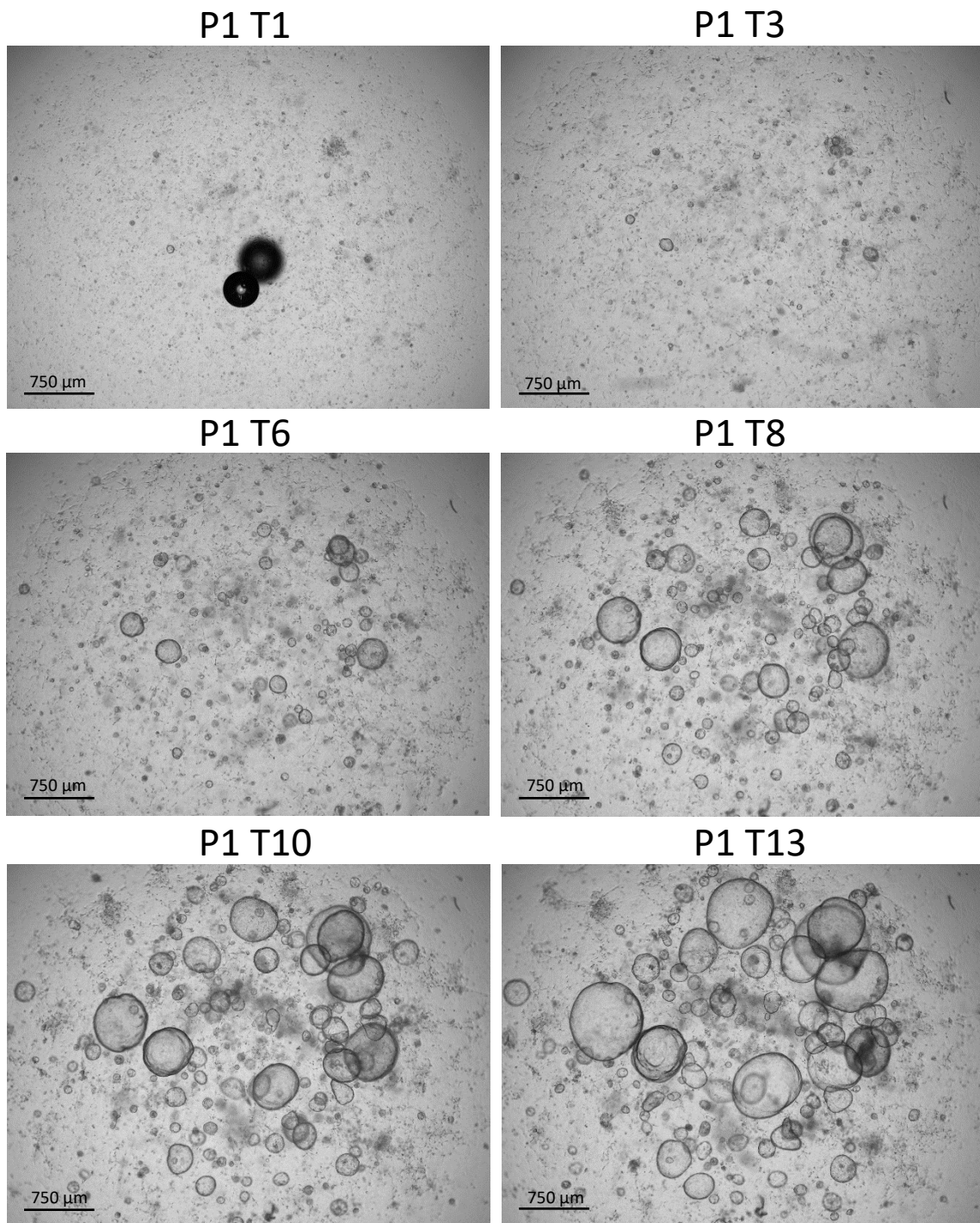


Abbildung 13 Wachstumsverlauf einer Kontroll-Kultur nach einer ersten Passagierung von Tag 1 bis Tag 13.

Große Organoide begannen teilweise nach einer Passagendauer/Kultivierungszeit von 8-10 Tagen unter dem Lichtmikroskop dunkler zu werden und eine Größenabnahme zu zeigen (s. Abb. 14). Manchmal

folgte hierauf auch eine Involution (Einfalten) des Organoids. Die meisten Kulturen wurden daher in regelmäßigen Abständen von 7 bis 10 Tagen umgesetzt, wobei die Organoide mechanisch wieder zu Bruchstücken zerlegt wurden. Nach dem Umsetzen wirkte die erneute Formierung der Zellverbände zu Organoiden und das Wachstum derselben meist beschleunigt im Vergleich zum Erstansatz einer Kultur.

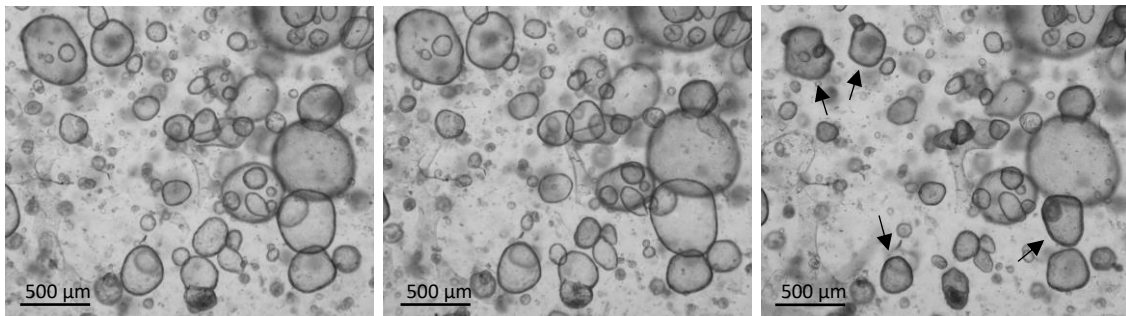
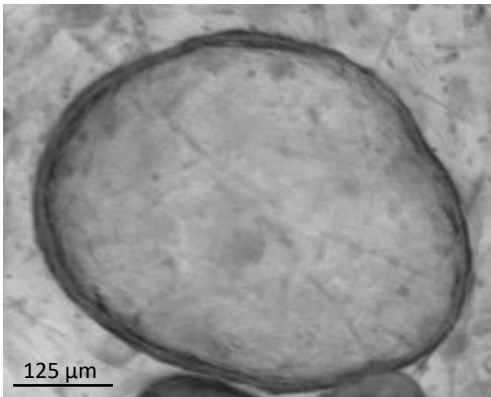


Abbildung 14 Schrumpfen und Verdunkelung größerer Organoide nach ca. 8 Tagen.

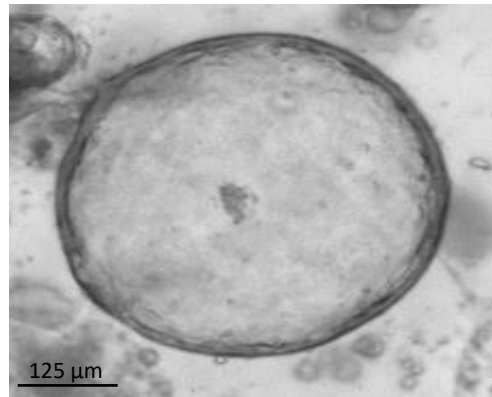
(Linie: MRKHS 3) Von links nach rechts: Tag 6, Tag 7, Tag 8

Auch nach mehreren Monaten Kultivierungsdauer zeigten die MRKHS-Organoide sich morphologisch konstant. Es waren keine lichtmikroskopisch erkennbaren phänotypischen Veränderungen mit steigender Passagezahl festzustellen (siehe Abb. 15). Unter optimierten Bedingungen (siehe Kapitel 3.2.3) war auch die Wachstumsgeschwindigkeit der MRKHS-Organoide über zahlreiche Passagen hinweg unverändert (siehe Abb. 16).

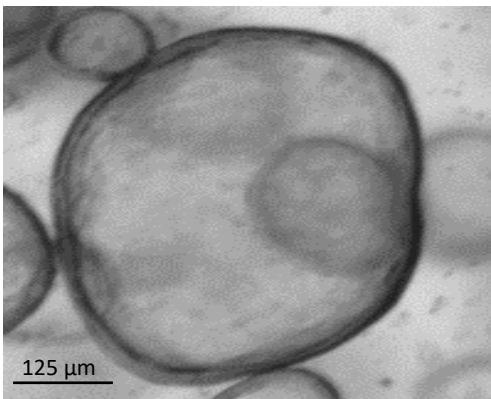
Passage 1



Passage 4



Passage 7



Passage 10

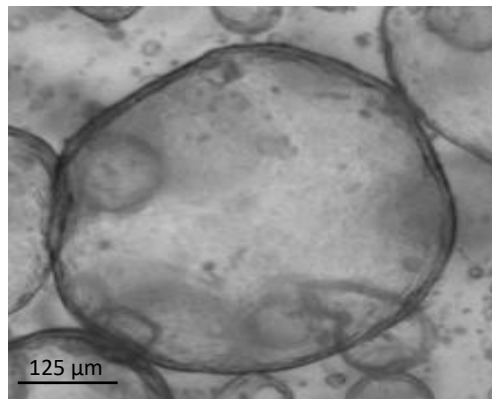
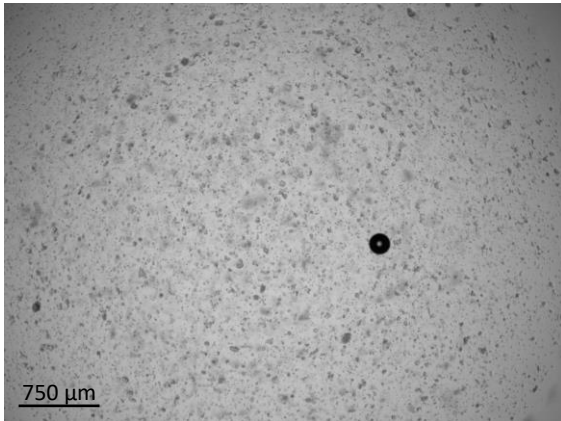


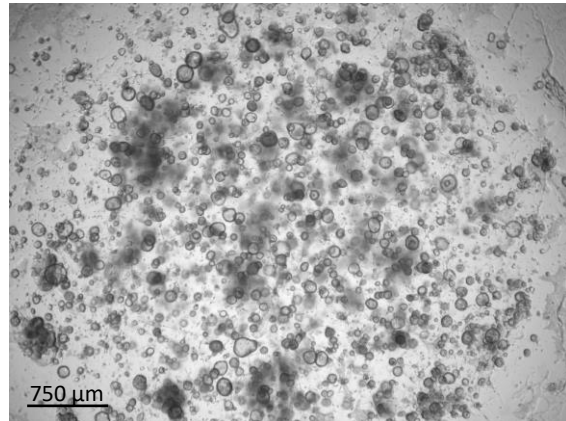
Abbildung 15 Lichtmikroskopische Morphologie von MRKHS-Organoiden.

Die lichtmikroskopische Morphologie der MRKHS-Organoiden veränderte sich nicht mit steigender Passagezahl. (Linie: MRKHS 17)

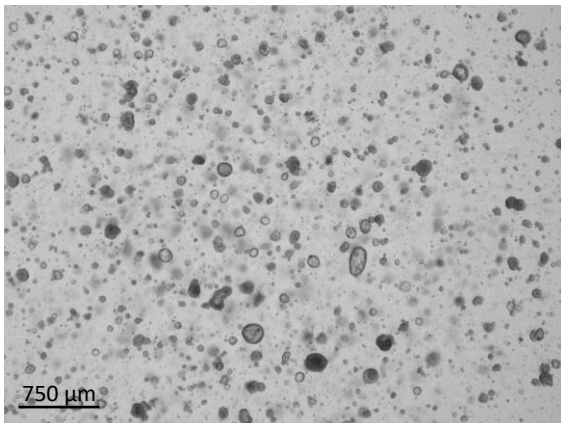
P0 T0



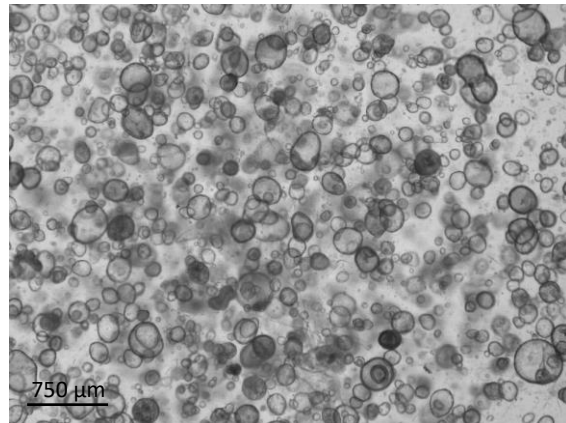
P0 T5



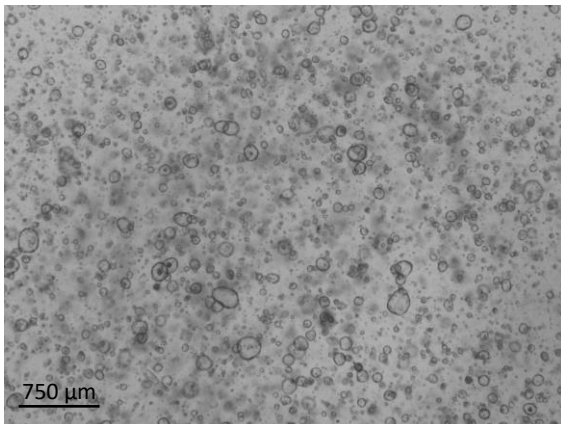
P3 T0



P3 T5



P7 T1



P7 T5

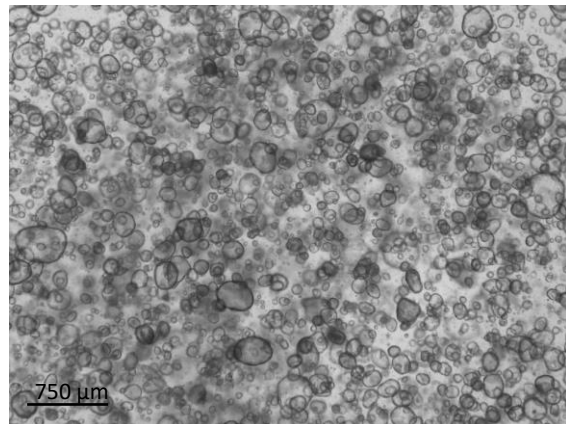


Abbildung 16 Wachstumsgeschwindigkeit von MRKHS-Organoiden.

Die Wachstumsgeschwindigkeit der MRKHS-Organoiden blieb unter optimierten Bedingungen auch bei hoher Passagezahl (P7) erhalten. (P = Passage, T = Tag; Linie: MRKHS 18)

3.4 Dezidualisierung von MRKHS-Organoiden

3.4.1 Aufbau des Experimentes und Kollektiv

Um die Funktionalität der Hormonrezeptoren und ihrer Pathways in den MRKHS-Organoiden zu überprüfen, wurden Dezidualisierungsexperimente durchgeführt. Hierfür wurden MRKHS- und Kontroll-Organoidkulturen mit Östrogen (E2) bzw. mit Östrogen, Progesteron (P4) und cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) stimuliert. Die genauen Konzentrationen und Stimulationsdauern sind unter 2.4.11 beschrieben.

Es ergaben sich daher für jede Organoidlinie folgende drei Gruppen/Konditionen

- Gruppe ExM, die unstimulierte Kontrollprobe
- Gruppe E2, die mit Estradiol stimuliert wurde
- Gruppe P4, die mit Estradiol, Progesteron und cAMP stimuliert wurde

Es wurden insgesamt fünf MRKHS-Organoidlinien von fünf verschiedenen Patientinnen in den Versuch eingeschlossen. Die fünf Patientinnen hatten allesamt ein MRKH-Syndrom Typ 1 ohne weitere assoziierte Fehlbildungen und ein durchschnittliches Alter von 18,2 Jahren zum Zeitpunkt der jeweiligen Operation (s. Tab. 9). Bei keiner der Patientinnen wurden mögliche Endometrioseherde, eine Adenomyosis oder Leiomyome festgestellt. Sämtliche Versuche wurden an etablierten Organoidlinien durchgeführt, die bereits mehrmalig eingefroren wurden und sich in der 5. Passage oder später befanden.

Tabelle 9 Alter und Eigenschaften der verwendeten MRKHS-Kulturen.

MRKHS-ID	MRKHS Typ	Alter bei OP (in Jahren)	Adenomyose	Endometriose	Leiomyom
1	1	17	Nein	Nein	Nein
2	1	18	Nein	Nein	Nein
3	1	19	Nein	Nein	Nein
17	1	20	Nein	Nein	Nein
18	1	17	Nein	Nein	Nein

Als Vergleichsgruppe wurden vier Organoidlinien aus Gewebeproben von Kontrollpatientinnen mit normal entwickelten Uteri verwendet, die zum Zeitpunkt der jeweiligen Gewebeentnahme ein durchschnittliches Alter von 39 Jahren hatten (s. Tab. 10). Bei zwei Patientinnen (Nr. 27 und 28) bestand eine durch mindestens eine Schwangerschaft und Geburt bestätigte Fertilität, bei der vierten Patientin (Nr. 44) handelte es sich um Gewebe aus einer Interruptio mit sozialer Indikation.

Tabelle 10 Alter und Diagnosen der verwendeten Kontrollkulturen.

Kontroll-ID	Alter			Leio-myom	Geburten	Art des Eingriffs
	bei OP (in Jahren)	Adeno-myose	Endo-metriose			
27	44	fokal	Nein	Nein	2	Hysterektomie
28	42	Nein	Nein	Ja	2	Hysterektomie
29	46	Nein	Nein	Ja	0	Hysterektomie
44	24	Nein	Nein	Nein	0	Interruptio

3.4.2 Hormonwerte und Zyklusphasen

Wie unter 2.1.3 beschrieben, erhielten alle MRKHS-Patientinnen einen Tag vor der Operation eine Blutentnahme zur Anfertigung eines Hormonprofils (s. Tab. 11).

Anamnestisch wies MRKHS-Patientin Nr. 17 die Einnahme einer Kombinationspille mit Dienogest und Ethinylestradiol im Langzeitzyklus auf, was eine Bestimmung der Zyklusphase in diesem Fall verhinderte.

Alle anderen für die Dezidualisierungsexperimente verwendeten MRKHS-Kulturen befanden sich zum Zeitpunkt der Entnahme des Endometriums in der Proliferationsphase des Zyklus.

Table 11 Laborchemisch gemessene Hormonkonzentrationen im Blut von MRKHS-Patientinnen am Tag vor der OP.

(Prolif. = Proliferationsphase)

MRKHS-ID	Östradiol in pmol/l	Progesteron in ng/ml	Testosteron in nmol/l	SHBG in nmol/l	DHEAS in µmol/l	FAI	Zyklusphase
1	398	0,5	0,6	35	3	1,71	Prolif.
2	339	1,07	2,1	27	12,2	7,78	Prolif.
3	347	0,44	1,1	76	5,3	1,45	Prolif.
17	78	0,22	0,3	295	1,4	0,1	X
18	151	0,85	0,6	33	4,5	1,82	Prolif.

Eine mögliche Hyperandrogenämie der MRKHS-Patientinnen wurde anhand der unter 2.1.3 beschriebenen Gesichtspunkte evaluiert. Hierbei zeigte sich lediglich bei einer der Patientinnen, MRKHS Nr. 2, ein mit 2,1 nmol/l über die Norm erhöhtes Gesamt-Testosteron sowie mit 7,78 ein erhöhter Freier-Androgenindex und damit eine Hyperandrogenämie. Alle anderen MRKHS-Patientinnen wiesen sowohl für das Gesamt-Testosteron als auch den FAI Normwerte auf.

Für die Kontrollkulturen erfolgte eine Feststellung der Zyklusphase über die histologische Aufarbeitung des Gewebes in der Gynäkopathologie oder anamnestisch über die letzte stattgehabte Menstruation (s. Tab. 12).

Table 12 Histologisch oder anamnestisch festgestellte Zyklusphase der Kontroll-Patientinnen.

(Prolif. = Proliferationsphase; Sekret. = Sekretions-/Lutealphase)

	K 27E	K 28E	K 29E	K 44E
Zyklusphase	Sekret.	Prolif.	Prolif.	Schwangerschaft

3.4.3 Lichtmikroskopischer Verlauf

MRKHS- und Kontroll-Organoidkulturen wurden nach dem unter 2.4.11 beschriebenen Protokoll mit Östrogen oder Östrogen + Progesteron + cyclischem

AMP behandelt. Der lichtmikroskopische Verlauf der Dezidualisierungsexperimente soll im Folgenden beispielhaft an einer MRKHS-Organoidkultur und an einer Kontroll-Organoidkultur aufgezeigt werden (s. Abb. 17 und 18). Für die ersten vier Tage erhielten alle Wells das gleiche Nährmedium und zeigten eine vergleichbare Wachstumsgeschwindigkeit.

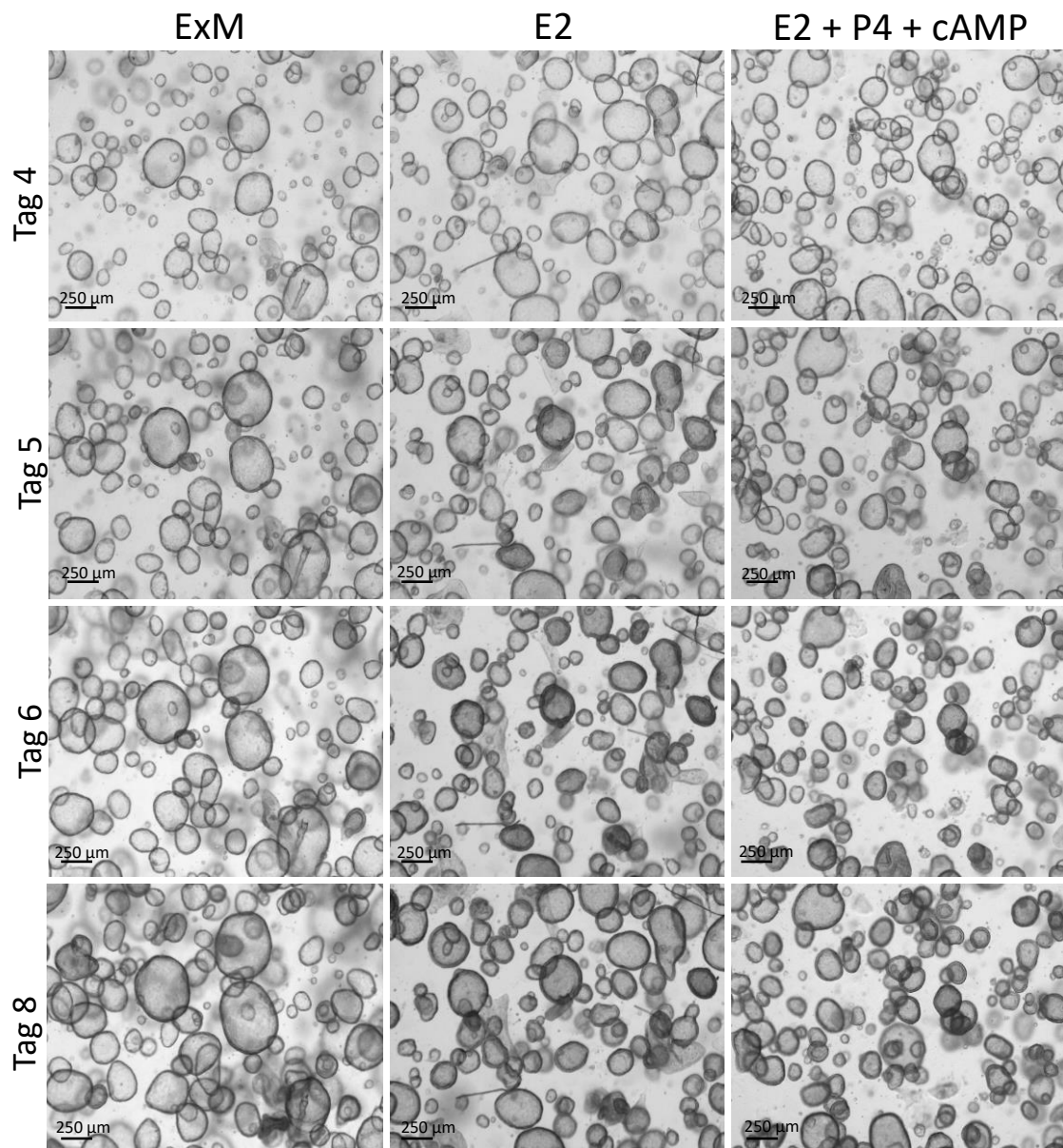


Abbildung 17 Lichtmikroskopischer Verlauf eines Dezidualisierungsexperiments einer MRKHS-Organoidkultur.

Die Wells der E2-Gruppe erhielten von Tag 4 an zusätzlich 10 nM E2 im Nährmedium. Die Wells der E2+P4+cAMP-Gruppe erhielten von Tag 4 bis Tag 6 zusätzlich 10 nM E2, von Tag 6 bis Tag 8 10 nM E2, 1 µM P4 und 1 µM cAMP. Aufnahmen in zweifacher Vergrößerung (Linie: MRKHS 3)

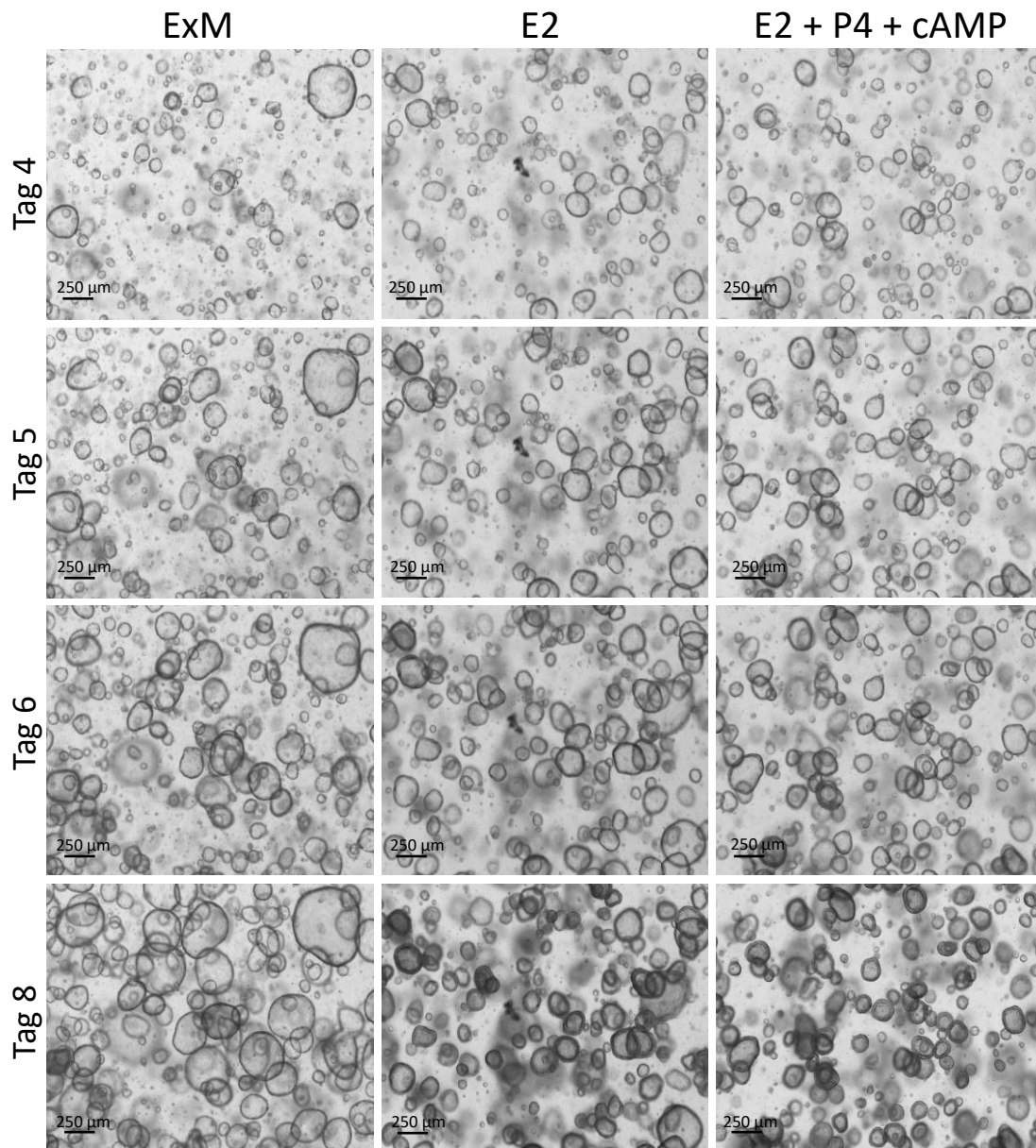


Abbildung 18 Lichtmikroskopischer Verlauf eines Dezidualisierungsexperiments am Beispiel einer Kontroll-Organoidlinie.

Aufnahmen in zweifacher Vergrößerung (Linie: 28E)

Die Stimulation mit 10 nM Östrogen in den Gruppen E2 und P4 von Tag 4 an führte zu einer zwischenzeitlichen Verlangsamung des Wachstums der Organoiden in diesen Wells, sowie zu einer leichten Schrumpfung zahlreicher Organoiden. Als weitere morphologische Veränderung fiel in der lichtmikroskopischen Beobachtung eine deutliche Verdickung der randständigen Zellschicht bei vielen stimulierten Organoiden auf. Dieser Prozess ist in

Abbildung 19 nochmals in höherer Vergrößerung dargestellt. Diese Effekte werden besonders deutlich beim Vergleich der Verläufe dieser Wells bis Tag 6 im Vergleich zu den unstimulierten Kontroll-Wells (s. Abb. 17). Nach dieser initialen Reaktion zeigten die Organoide in den Wells der Gruppe E2 ab Tag 6 wieder eine sichtbare Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit, wobei die zuvor beschriebenen morphologischen Veränderungen erhalten blieben. In den Wells der Gruppe P4, die ab Tag 6 mit 10 nM E2, 1 μ M P4 und 1 μ M cAMP behandelt wurden, kam es ebenfalls wieder zu einem Anstieg der Wachstumsgeschwindigkeit (s. Abb 17 und 18).

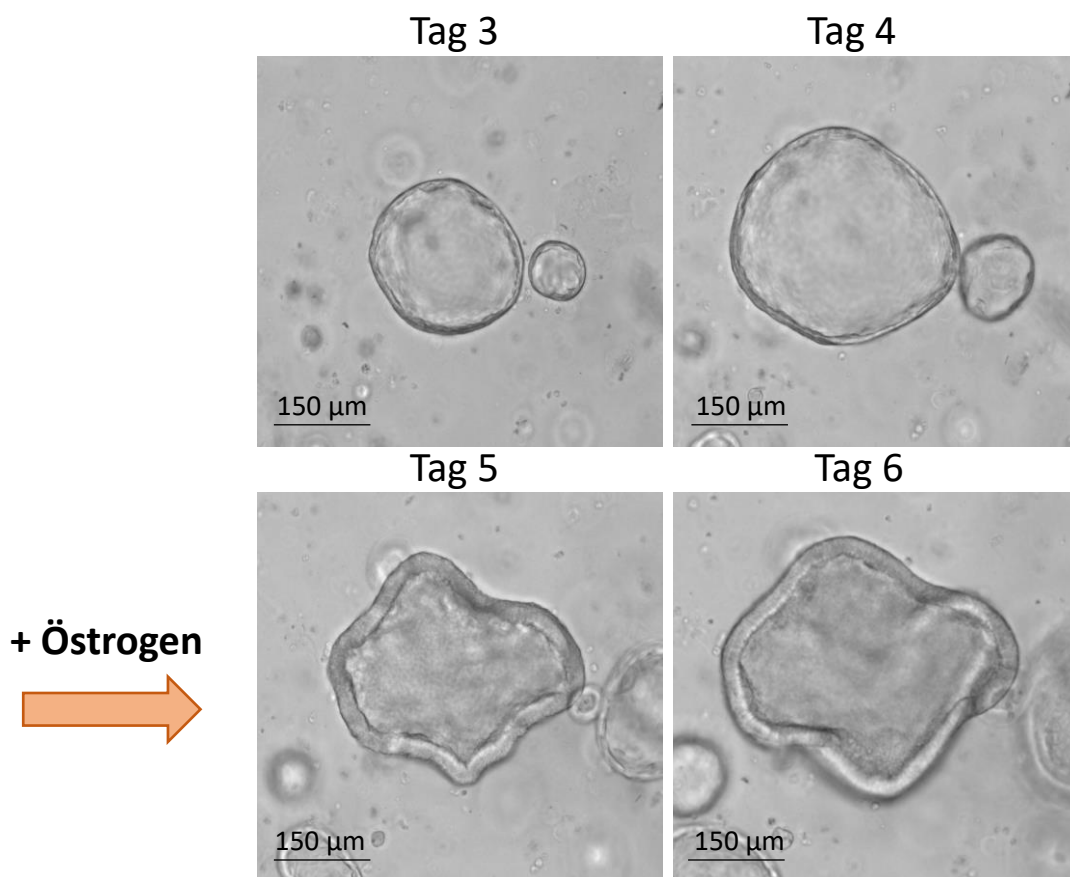


Abbildung 19 Auswirkung der Stimulation auf die Morphologie eines einzelnen Organoids am Beispiel der Kontrollorganoidlinie 44.

Bereits 24 Stunden nach Hinzugabe des Östrogens ist lichtmikroskopisch eine leichte Schrumpfung/Verformung des Organoids sowie eine deutliche Verdickung der Zellschicht feststellbar.

Diese morphologischen Unterschiede und Veränderung wurden anhand der in Abb. 17 und 18 dargestellten Linien exemplarisch quantifiziert. Hierzu wurden die

lichtmikroskopischen Aufnahmen und die Bildsoftware Fiji (Open Source, Version 2.1.0/1.53c) von Schindelin et al. (2012; [157]) verwendet, um die Organoide zu vermessen. Hierbei erreichten die Organoide der unbehandelten ExM-Gruppe der Linie MRKHS 3 an Tag 8 einen durchschnittlichen Organoid-Durchmesser von 206,1 μm (n=95). Die mit Östrogen behandelten Organoide der E2-Gruppe erreichten nur einen durchschnittlichen Durchmesser von 169,2 μm (n=102) und waren damit signifikant kleiner als die unbehandelten Organoide ($p = 0.006$). In der P4-Gruppe ergab sich mit 164,1 μm (n=117) ein noch kleinerer Durchschnittswert als in der E2-Gruppe, der ebenfalls signifikant im Vergleich zur unbehandelten ExM-Gruppe war ($p = 0.0005$; ungepaarter t-Test). Die genaue Größenverteilung der Organoid-Durchmesser ist Abbildung 20 zu entnehmen.

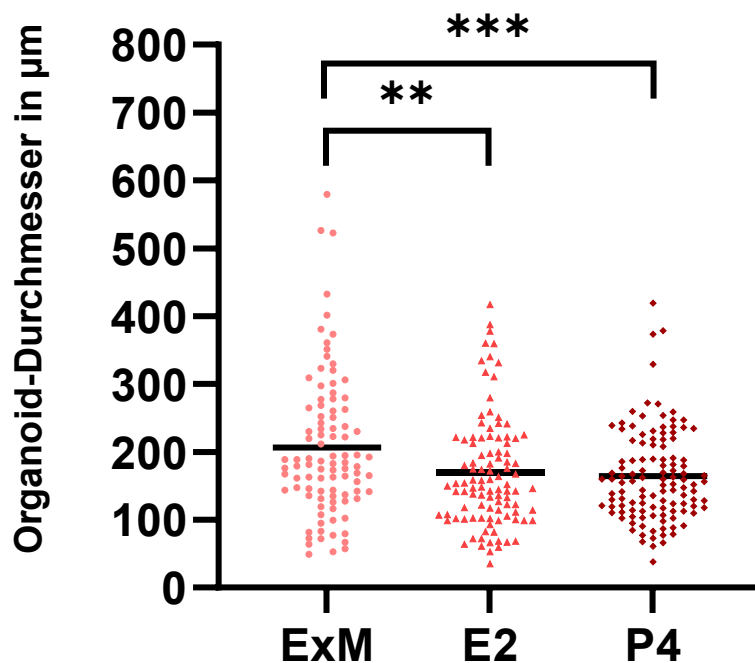


Abbildung 20 Organoiddurchmesser einer MRKHS-Linie am Ende eines Dezidualisierungsexperiments.

Durchmesser sämtlicher Organoide der Linie MRKHS 3, die in Abbildung 17 an Tag 8 abgebildet sind. Durchmesser in μm mit Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Jeder Punkt repräsentiert ein einzelnes Organoid. Ungepaarter t-Test wurde durchgeführt; (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

Die Organoide der ExM-Gruppe der Kontroll-Linie 28E erreichten an Tag 8 einen durchschnittlichen Durchmesser von 188,5 μm (n=128). In der E2-Gruppe lag der durchschnittliche Wert bei 137,4 μm (n=135) und war damit signifikant geringer

($p < 0.0001$) im Vergleich zu den unbehandelten Organoiden. Analog zu MRKHS 3 war auch bei 28E der Durchschnittswert der P4-Gruppe mit $133,8 \mu\text{m}$ ($n=131$) noch kleiner als in der E2-Gruppe und ebenfalls signifikant geringer ($p < 0.0001$) im Vergleich zu ExM. Die gemessenen Organoid-Durchmesser der einzelnen Gruppen sind in Abbildung 21 graphisch dargestellt.

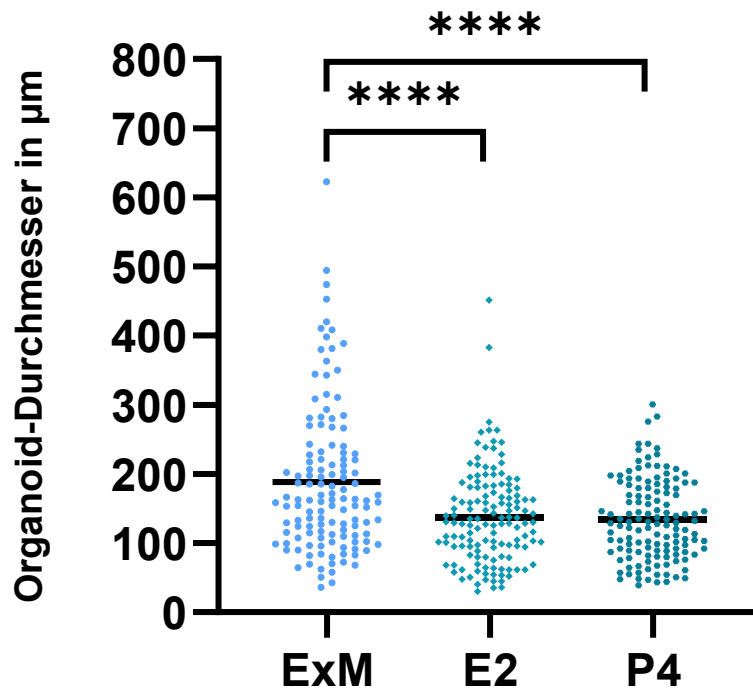


Abbildung 21 Organoiddurchmesser einer Kontroll-Linie am Ende eines Dezidualisierungsexperiments.

Durchmesser sämtlicher Organoide der Linie 28E, die in Abbildung 18 an Tag 8 abgebildet sind. Durchmesser in μm mit Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Jeder Punkt repräsentiert ein einzelnes Organoid. Ungepaarter t-Test wurde durchgeführt; (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$)

Auch die lichtmikroskopisch wahrnehmbare Verdickung der randständigen Zellschicht bei Organoiden, die mit Östrogen bzw. Östrogen, Progesteron und cAMP behandelt wurden, wurde ausgemessen. Hierbei zeigte sich, dass unbehandelte Organoide mit einem Durchmesser von 200 bis 300 μm der Linie MRKHS 3 an Tag 8 eine durchschnittliche Dicke der randständigen Zellschicht von $12,4 (\pm 2,062) \mu\text{m}$ aufwiesen. Bei hormonbehandelten Organoiden derselben Größe in der Gruppe P4 war diese Zellschicht durchschnittlich $20,21 (\pm 2,143) \mu\text{m}$ dick und damit signifikant ($p < 0.0001$; ungepaarter t-Test) dicker als bei unbehandelten Organoiden derselben Linie (siehe Tab. 13).

Bei Kontroll-Linie 28E erreichten unbehandelte Organoide der Größe 200 – 300 µm an Tag 8 eine durchschnittliche Dicke der randständigen Zellschicht von 11,66 (± 1,495) µm. In der P4-Gruppe wiesen Organoide desselben Durchmessers mit einer durchschnittlichen Dicke der Zellschicht von 23,98 (± 2,659) µm einen signifikant ($p < 0.0001$) höheren Wert auf (siehe Tab. 13).

Tabelle 13 Dicke der randständigen Zellschicht in Organoiden nach hormoneller Stimulation.

Dicke der randständigen Zellschicht in einer Stichprobe von jeweils 10 Organoiden der Größe 200 - 300 µm an Tag 8 bei den Linien MRKHS 3 und 28E. Jedes Organoid wurde an fünf verschiedenen Stellen gemessen und die Einzelwerte zu einem hier dargestellten Mittelwert zusammengefasst.

Organoid Nr.	MRKHS 3		28E	
	ExM	P4	ExM	P4
1	11,09 µm	22,39 µm	9,07 µm	18,59 µm
2	11,57 µm	17,89 µm	11,55 µm	26,79 µm
3	10,51 µm	19,10 µm	10,01 µm	22,88 µm
4	12,95 µm	20,77 µm	11,79 µm	22,48 µm
5	16,78 µm	22,08 µm	14,20 µm	21,71 µm
6	9,70 µm	23,37 µm	11,20 µm	26,14 µm
7	13,80 µm	18,10 µm	10,84 µm	25,75 µm
8	12,71 µm	19,72 µm	12,64 µm	24,11 µm
9	11,12 µm	17,12 µm	12,19 µm	24,12 µm
10	13,76 µm	21,60 µm	13,11 µm	27,19 µm
Mittelwert	12,4 µm	20,21 µm	11,66 µm	23,98 µm
SD	2,062	2,143	1,495	2,659

3.4.4 Expressionsveränderungen von Markergenen

Zur Einschätzung des Effekts der hormonalen Stimulation wurden mehrere Markergene, die für die Dezidualisierung in endometrialen Epithelzellen typisch sind, mittels qPCR untersucht und die relative Expression zwischen den einzelnen Gruppen und zwischen MRKHS- und Kontrollorganoiden verglichen. Hierfür wurden zum einen Gene gewählt, die typischerweise durch die Stimulation mit Östrogen und Progesteron eine Hochregulierung erfahren sollten,

wie PAEP, 17HSD, SPP1 und MUC1, sowie mit SOX9 ein Stammzellmarker, bei dem eine Abnahme der Expression zu erwarten wäre.

3.4.4.1 Progesteron assoziiertes endometriales Protein (PAEP)

Die hormonelle Stimulation führte in allen behandelten MRKHS-Organoidkulturen zu einer Hochregulation der Expression von PAEP. Diese fiel insgesamt sowohl für die Behandlung mit Östrogen allein als auch für die Stimulation mit Östrogen, Progesteron und cAMP statistisch signifikant im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollproben aus. Für die E2-Gruppe zeigte sich eine durchschnittliche relative Expressionserhöhung um das 5,42-fache ($p = 0.005$), für die P4-Gruppe um das 6,83-fache ($p = 0.006$) im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe. Der Unterschied zwischen der E2- und der P4-Gruppe war hierbei nicht statistisch signifikant ($p = 0.295$; RM One-way ANOVA mit post-hoc Tukeys multiple comparisons Test) (siehe Abb. 22 und Tabelle 14).

Bei den Kontroll-Organoidkulturen führte die Stimulation sowohl in der E2 als auch in der P4-Gruppe zu einer Hochregulation von PAEP bei zwei von vier Organoidlinien. Hierbei zeigte sich für die Linie 27E eine bereits recht hohe Basisexpression in der unstimulierten Kontrollprobe ($\Delta\text{CT ExM}$ von 2,817) und folglich keine Expressionssteigerung durch die hormonelle Stimulation. Durchschnittlich ergab sich eine Erhöhung der Genexpression auf das 3,07-fache ($p = 0.414$) für die E2-Gruppe und auf das 3,1-fache ($p = 0.395$) für die P4-Gruppe im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (siehe Abb. 22 und Tabelle 15).

Beim Betrachten der relativen Expressionsveränderungen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen MRKHS- und Kontroll-Kulturen. Weder der Vergleich der gemittelten Differenzen von MRKHS ExM vs. MRKHS E2 zu Kontrollen ExM vs. Kontrollen E2 ($p = 0.455$; ungepaarter t-Test auf Basis der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte), noch für MRKHS ExM vs. MRKHS P4 zu Kontrollen ExM vs. Kontrollen P4 ($p = 0.314$; ungepaarter t-Test auf Basis der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte) erbrachte einen statistisch signifikanten Unterschied (siehe Tabellen 14 und 15).

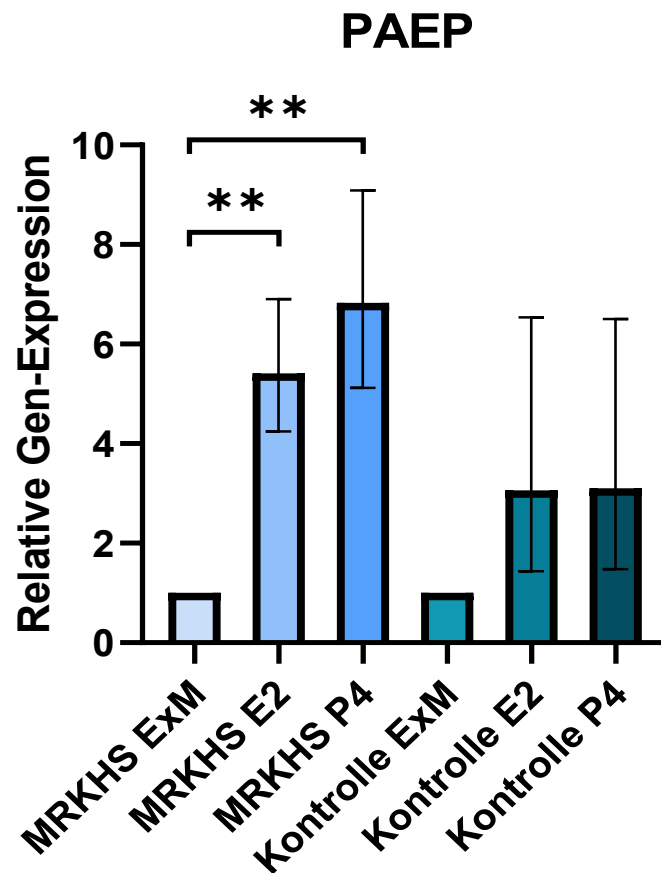


Abbildung 22 Relative Expressionsveränderung für das Gen PAEP in den Organoidkulturen.

Werte bezogen auf eine jeweils unstimulierte Kontrollprobe derselben Linie (ExM = 1). Dargestellt sind die Durchschnittswerte \pm SEM (n MRKHS = 5; n Kontrollen = 4). RM One-way ANOVA mit post-hoc Tukeys multiple comparisons Test wurde auf Basis der Δ Ct-Werte durchgeführt. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$)

Tabelle 14 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT und relative Expressionsveränderungen (EFC) in der MRKHS-Kohorte für PAEP

	Δ CT ExM	Δ CT E2	Δ CT P4	$\Delta\Delta$ CT E2	$\Delta\Delta$ CT P4
MRKHS 1	5,901	3,266	3,498	-2,635	-2,403
MRKHS 2	7,467	6,281	6,087	-1,185	-1,380
MRKHS 3	8,879	6,542	5,607	-2,337	-3,272
MRKHS 17	5,777	2,475	1,985	-3,302	-3,791
MRKHS 18	4,557	1,830	1,547	-2,726	-3,010

	EFC	Range EFC	EFC	Range EFC
	E2	E2	P4	P4
MRKHS 1	6,21	5,83 - 6,61	5,29	5,0 - 5,59
MRKHS 2	2,27	2,20 - 2,35	2,60	2,28 - 2,97
MRKHS 3	5,05	4,36 - 5,85	9,66	8,03 - 11,62
MRKHS 17	9,86	9,02 - 10,78	13,85	12,28 - 15,61
MRKHS 18	6,62	5,77 - 7,59	8,05	7,33 - 8,85
Durchschnitt MRKHS	5,42		6,83	

Table 15 ΔCT , $\Delta\Delta CT$ and relative Expression changes (EFC) in the control cohort for PAEP

	ΔCT	ΔCT	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$\Delta\Delta CT$
	ExM	E2	P4	E2	P4
K 27	2,817	2,538	2,769	-0,279	-0,049
K 28	9,448	5,208	5,363	-4,240	-4,085
K 29	8,686	9,267	9,032	0,581	0,346
K 44	6,234	3,709	3,486	-2,525	-2,748

	EFC	Range EFC	EFC	Range EFC
	E2	E2	P4	P4
K 27	1,21	0,84 - 1,76	1,03	0,68 - 1,57
K 28	18,89	15,9 - 22,44	16,97	15,68 - 18,37
K 29	0,67	0,65 - 0,69	0,79	0,70 - 0,88
K 44	5,76	4,68 - 7,07	6,72	6,39 - 7,06
Durchschnitt Kontrollen	3,07		3,1	

3.4.4.2 17-beta-Hydroxy-Steroiddehydrogenase (17-HSD)

Die hormonelle Stimulation führte in vier von fünf MRKHS-Organoidlinien zu einer Hochregulation der Expression der 17-HSD in der E2 und in der P4-Gruppe. Für die Stimulation mit Östrogen zeigte sich eine durchschnittliche relative Expressionsveränderung um das 7,94-fache und für die P4-Gruppe um das 11,09-fache. Eine statistische Signifikanz gegenüber den unstimulierten

Kontrollproben wurde durch das Nicht-Ansprechen von MRKHS 3 sowohl für die E2-Gruppe ($p = 0.221$) als auch für die P4-Gruppe ($p = 0.139$) knapp verfehlt. MRKHS 3 zeigte dabei die höchste Basisexpression ($\Delta\text{CT ExM } 8,391$) aller MRKHS-Linien, die bereits auf dem gleichen Niveau wie viele stimulierte Proben war. Eine besonders hohe relative Expressionsveränderung zeigte sich bei MRKHS 17 (148-fach für E2 und 226-fach für E2+P4+cAMP), wobei MRKHS 17 auch die niedrigste Basisexpression in der unstimulierten Kontrollprobe aufwies (siehe Abb. 23 und Tabelle 16). Auch beim Vergleich der E2- mit der P4-Gruppe zeigten sich keine statistisch signifikanten Differenzen ($p = 0.086$; RM One-way ANOVA mit post-hoc Tukeys multiple comparisons Test).

Unter den Kontroll-Organoiden kam es bei drei von vier Linien ebenfalls zu einem Expressionsanstieg der 17HSD. Dieser lag in der E2-Gruppe durchschnittlich bei 4,25-fach ($p = 0.194$), in der P4-Gruppe bei 4,43-fach ($p = 0.200$) im Vergleich zur ExM-Gruppe (siehe Abb. 23 und Tabelle 17).

Beim Vergleich der gemittelten Differenzen von MRKHS ExM vs. MRKHS E2 zu Kontrollen ExM vs. Kontrollen E2 ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Effekts in beiden Gruppen ($p = 0.639$; ungepaarter t-Test auf Basis der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Werte). Gleiches gilt für den Vergleich MRKHS ExM vs. MRKHS P4 zu Kontrollen ExM vs. Kontrollen P4 ($p = 0.484$; ungepaarter t-Test auf Basis der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Werte) (siehe Tabellen 16 und 17).

17HSD

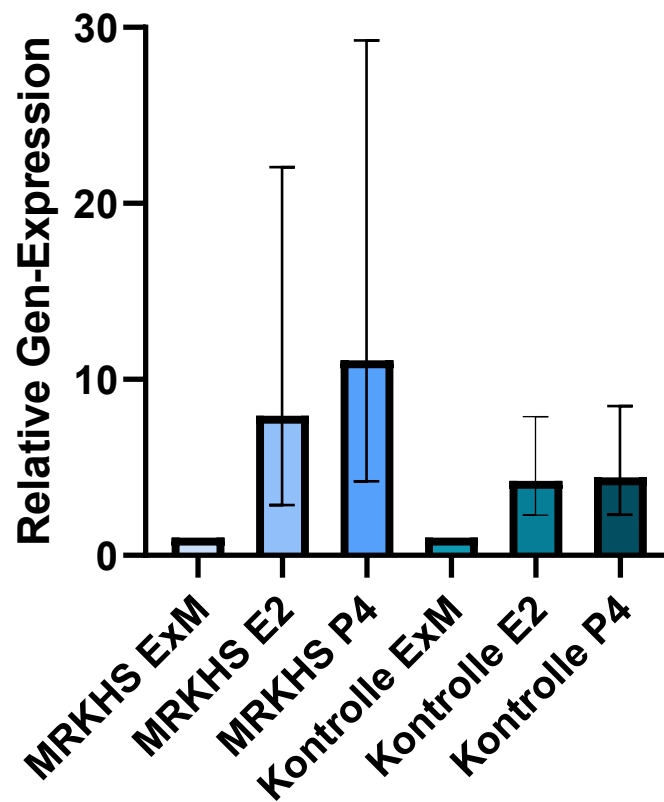


Abbildung 23 Relative Expressionsveränderung für das Gen 17HSD in den Organoidkulturen.

Werte bezogen auf eine jeweils unstimulierte Kontrollprobe derselben Linie (ExM = 1). Dargestellt sind die Durchschnittswerte \pm SEM (n MRKHS = 5; n Kontrollen = 4).

Tabelle 16 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT und relative Expressionsveränderungen (EFC) in der MRKHS-Kohorte für 17HSD

	Δ CT ExM	Δ CT E2	Δ CT P4	$\Delta\Delta$ CT E2	$\Delta\Delta$ CT P4
MRKHS 1	10,433	9,336	8,950	-1,096	-1,483
MRKHS 2	12,888	9,423	9,251	-3,466	-3,637
MRKHS 3	8,391	9,788	8,745	1,396	0,354
MRKHS 17	13,639	6,429	5,818	-7,211	-7,821
MRKHS 18	13,086	8,510	8,320	-4,576	-4,766

	EFC	Range EFC	EFC	Range EFC
	E2	E2	P4	P4
MRKHS 1	2,14	2,04 - 2,25	2,79	2,58 - 3,03
MRKHS 2	11,04	9,51 - 12,86	12,44	11,33 - 13,67
MRKHS 3	0,38	0,34 - 0,43	0,71	0,67 - 0,92
MRKHS 17	148,09	129,67 - 169,16	226,12	218,05 - 234,51
MRKHS 18	23,84	20,81 - 27,32	27,20	25,32 - 29,24
Durchschnitt				
MRKHS	7,94		11,09	

Tabelle 17 ΔCT , $\Delta\Delta CT$ und relative Expressionsveränderungen (EFC) in der Kontroll-Kohorte für 17HSD

	ΔCT	ΔCT	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$\Delta\Delta CT$
	ExM	E2	P4	E2	P4
K 27	13,308	9,440	9,375	-3,868	-3,934
K 28	9,191	9,343	9,517	0,152	0,327
K 29	9,594	8,091	7,802	-1,503	-1,792
K 44	12,142	9,017	8,951	-3,125	-3,192

	EFC	Range EFC	EFC	Range EFC
	E2	E2	P4	P4
K 27	14,60	13,48 - 15,82	15,27	13,39 - 17,44
K 28	0,90	0,76 - 1,07	0,80	0,73 - 0,87
K 29	2,83	2,67 - 3,01	3,46	3,03 - 3,96
K 44	8,72	7,08 - 10,76	9,14	8,57 - 9,74
Durchschnitt				
Kontrollen	4,25		4,43	

3.4.4.3 Osteopontin (SPP1)

Eine von fünf MRKHS-Kulturen (MRKHS 3) zeigte als Reaktion auf die Stimulation mit Östrogen bzw. mit Östrogen, Progesteron und cAMP eine deutliche Erhöhung der relativen Expression von SPP1. Durchschnittlich ergab sich dadurch eine 2,15-fache Erhöhung der Expression für die E2-Gruppe und

1,65-fach für die P4-Gruppe. Der durchschnittliche Unterschied zum unstimulierten Wert war dabei für beide Gruppen nicht statistisch signifikant ($p = 0.573$ für MRKHS E2 vs. ExM; $p = 0.739$ für MRKHS P4 vs. ExM; RM One-way ANOVA mit post-hoc Tukeys multiple comparisons Test) (siehe Abb. 24 und Tab. 18).

Bei den Kontroll-Linien reagierten zwei von vier Organoidkulturen mit einer Erhöhung der Expression von SPP1 in Relation zur ExM-Gruppe auf die hormonelle Stimulation. In der E2-Gruppe stieg die Genexpression durchschnittlich um das 3,42-fache an ($p = 0.245$), in der P4-Gruppe um das 2,95-fache ($p = 0.274$) im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen (siehe Abb. 24 und Tab. 19).

Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede beim Vergleich des Effekts zwischen MRKHS ExM vs. MRKHS E2 zu Kontrolle ExM vs. Kontrolle E2 ($p = 0.645$) oder zwischen MRKHS ExM vs. MRKHS P4 zu Kontrolle ExM vs. Kontrolle P4 ($p = 0.534$; ungepaarter t-Test auf Basis der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Werte) (siehe Tabellen 18 und 19).

SPP1

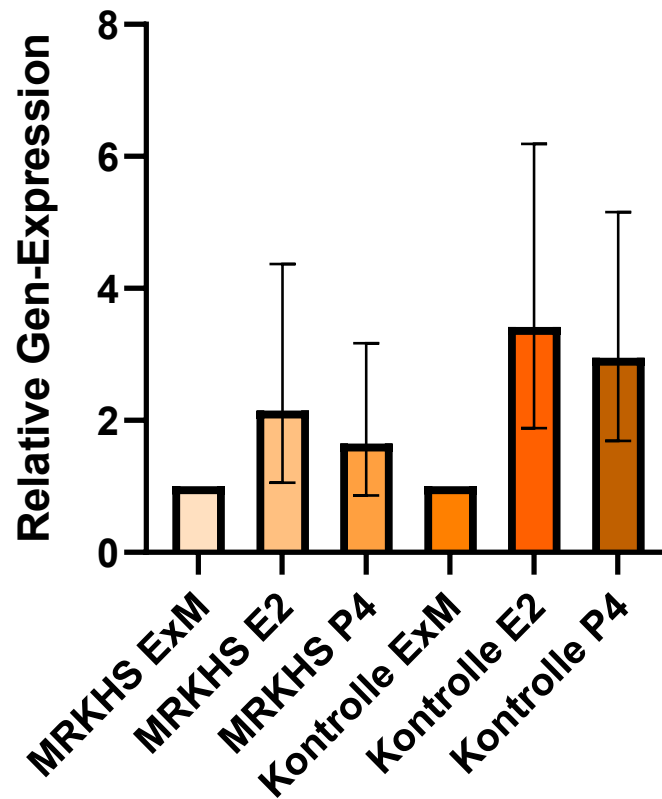


Abbildung 24 Relative Expressionsveränderung für das Gen SPP1 in den Organoidkulturen.

Werte bezogen auf eine jeweils unstimulierte Kontrollprobe derselben Linie (ExM = 1). Dargestellt sind die Durchschnittswerte \pm SEM (n MRKHS = 5; n Kontrollen = 4).

Tabelle 18 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT und relative Expressionsveränderungen (EFC) in der MRKHS-Kohorte für SPP1

	Δ CT ExM	Δ CT E2	Δ CT P4	$\Delta\Delta$ CT E2	$\Delta\Delta$ CT P4
MRKHS 1	4,090	3,357	3,955	-0,733	-0,136
MRKHS 2	1,278	1,983	1,989	0,705	0,711
MRKHS 3	9,902	4,820	5,470	-5,081	-4,431
MRKHS 17	7,924	7,531	8,268	-0,393	0,344
MRKHS 18	4,127	4,105	4,015	-0,022	-0,112

	EFC	Range EFC	EFC	Range EFC
	E2	E2	P4	P4
MRKHS 1	1,66	1,58 - 1,74	1,10	0,98 - 1,24
MRKHS 2	0,61	0,59 - 0,64	0,61	0,56 - 0,67
MRKHS 3	33,86	30,92 - 37,08	21,58	20,26 - 22,99
MRKHS 17	1,31	1,17 - 1,47	0,79	0,72 - 0,86
MRKHS 18	1,02	0,99 - 1,04	1,08	1,04 - 1,12
Durchschnitt MRKHS	2,15		1,65	

Tabelle 19 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT und relative Expressionsveränderungen (EFC) in der Kontroll-Kohorte für SPP1

	ΔCT	ΔCT	ΔCT	$\Delta\Delta$CT	$\Delta\Delta$CT
	ExM	E2	P4	E2	P4
K 27	5,036	4,822	4,903	-0,214	-0,133
K 28	6,706	4,382	4,286	-2,324	-2,420
K 29	7,978	4,029	4,574	-3,948	-3,404
K 44	9,081	8,482	8,793	-0,599	-0,288

	EFC	Range EFC	EFC	Range EFC
	E2	E2	P4	P4
K 27	1,16	1,06 - 1,27	1,10	1,07 - 1,12
K 28	5,01	4,15 - 6,05	5,35	4,53 - 6,33
K 29	15,44	14,38 - 16,58	10,59	9,48 - 11,82
K 44	1,51	1,23 - 1,86	1,22	1,21 - 1,23
Durchschnitt Kontrollen	3,42		2,95	

3.4.4.4 SOX9

In allen fünf MRKHS-Linien zeigte sich als Reaktion auf die Stimulation mit Östrogen bzw. Östrogen und Progesteron eine Expressionsabnahme für den Stammzellmarker SOX9. In der E2-Gruppe sank die relative Expression durchschnittlich auf das 0,647-fache ($p = 0.032$), in der P4-Gruppe auf das 0,468-fache ($p = 0.001$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollproben ab. Die

Differenz zwischen der E2-Gruppe und der P4-Gruppe erreichte dabei keine statistische Signifikanz ($p = 0.210$; RM One-way ANOVA mit post-hoc Tukeys multiple comparisons Test) (siehe Abb. 25 und Tab. 20).

Auch bei den Kontroll-Linien zeigte sich ein Rückgang der Expression von SOX9, wenn auch schwächer ausgeprägt als in der MRKHS-Gruppe. In der E2-Gruppe sank die Expression auf das 0,9-fache ($p = 0.075$) und in der P4-Gruppe auf das 0,82-fache ($p = 0.285$) (s. Abb. 25 und Tab. 21) Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der E2- und der P4-Gruppe ($p = 0.549$).

Beim Vergleich der relativen Expressionsveränderungen zwischen den behandelten MRKHS-Organoidkulturen und den Kontroll-Kulturen ergaben sich statistisch signifikante Differenzen. So war die mittlere Differenz zwischen MRKHS ExM und MRKHS E2 signifikant größer als zwischen Kontrollen ExM und Kontrollen E2 ($p = 0.030$; ungepaarter t-Test auf Basis der $\Delta\Delta\text{CT}$ E2 Werte). Auch die gemittelte Differenz zwischen MRKHS ExM und MRKHS P4 war signifikant größer als zwischen unbehandelten Kontrollen und Kontrollen P4 ($p = 0.003$; ungepaarter t-Test auf Basis der $\Delta\Delta\text{CT}$ P4 Werte) (s. Abb. 25).

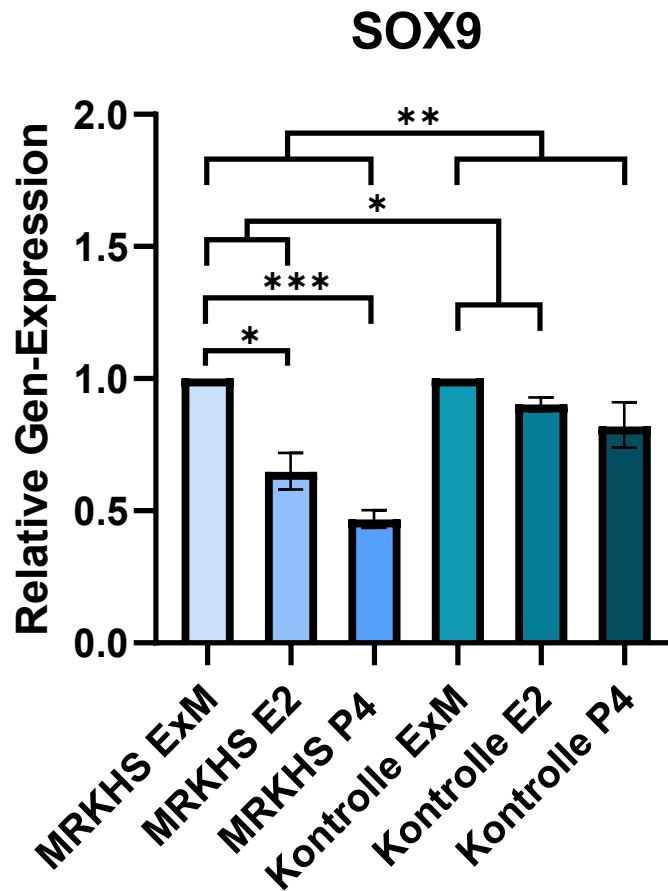


Abbildung 25 Relative Expressionsveränderung für das Gen SOX9 in den Organoidkulturen.

Werte bezogen auf eine jeweils unstimulierte Kontrollprobe derselben Linie (ExM = 1). Dargestellt sind die Durchschnittswerte \pm SEM (n MRKHS = 5; n Kontrollen = 4). RM One-way ANOVA mit post-hoc Tukeys multiple comparisons Test wurde auf Basis der Δ Ct-Werte durchgeführt. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

Tabelle 20 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT und relative Expressionsveränderungen (EFC) in der MRKHS-Kohorte für SOX9

	Δ CT ExM	Δ CT E2	Δ CT P4	$\Delta\Delta$ CT E2	$\Delta\Delta$ CT P4
MRKHS 1	3,626	4,483	4,790	0,857	1,164
MRKHS 2	2,808	3,692	3,810	0,884	1,001
MRKHS 3	3,817	3,856	5,123	0,039	1,306
MRKHS 17	4,422	5,133	5,155	0,711	0,733
MRKHS 18	3,555	4,207	4,822	0,653	1,268

	EFC	Range EFC	EFC	Range EFC
	E2	E2	P4	P4
MRKHS 1	0,55	0,53 - 0,58	0,45	0,42 - 0,47
MRKHS 2	0,54	0,49 - 0,6	0,50	0,46 - 0,54
MRKHS 3	0,97	0,88 - 1,08	0,41	0,38 - 0,44
MRKHS 17	0,61	0,59 - 0,63	0,60	0,52 - 0,69
MRKHS 18	0,64	0,62 - 0,65	0,42	0,38 - 0,46
Durchschnitt MRKHS	0,647		0,468	

Tabelle 21 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT und relative Expressionsveränderungen (EFC) in der Kontroll-Kohorte für SOX9

	ΔCT	ΔCT	ΔCT	$\Delta\Delta$CT	$\Delta\Delta$CT
	ExM	E2	P4	E2	P4
K 27	3,619	3,673	3,654	0,054	0,034
K 28	4,836	5,084	5,339	0,248	0,503
K 29	5,804	5,919	5,821	0,114	0,017
K 44	4,784	4,952	5,368	0,168	0,583

	EFC	Range EFC	EFC	Range EFC
	E2	E2	P4	P4
K 27	0,96	0,83 - 1,12	0,98	0,85 - 1,12
K 28	0,84	0,78 - 0,91	0,71	0,59 - 0,85
K 29	0,92	0,89 - 0,96	0,99	0,91 - 1,08
K 44	0,89	0,72 - 1,1	0,67	0,65 - 0,68
Durchschnitt Kontrollen	0,90		0,82	

3.4.4.5 Mucin (MUC1)

Bei der Untersuchung von Mucin 1 in der qPCR fiel auf, dass die Expression im Großteil der unstimulierten Organoide bereits auf dem Niveau des Haushaltsgens oder darunter lag (siehe Δ Ct ExM Werte Tabelle 22 und 23). Die folgende hormonelle Stimulation führte daher nur zu sehr geringen Expressionsveränderungen.

Unter den MRKHS-Kulturen kam es in der E2-Gruppe zu einem durchschnittlichen Expressionsanstieg auf das 1,1-fache ($p = 0.582$), in der P4-Gruppe auf das 1,23-fache ($p = 0.119$; RM One-way ANOVA mit post-hoc Tukeys multiple comparisons Test) in Relation zum unstimulierten ExM-Niveau, wobei beide Unterschiede keine statistische Signifikanz erreichten (s. Abb. 26 und Tab. 22).

Bei den Kontroll-Kulturen zeigte sich für die E2-Gruppe ein nicht statistisch signifikanter durchschnittlicher Expressionsanstieg von MUC1 um das 1,07-fache ($p = 0.771$) und für die P4-Gruppe um das 1,09-fache ($p = 0.803$) (s. Abb. 26 und Tab. 23).

Zwischen MRKHS- und Kontrollkulturen ergaben sich für den Vergleich des Stimulationseffektes weder in der E2-Gruppe ($p = 0.830$, ungepaarter t-Test), noch beim Vergleich der P4-Gruppen ($p = 0.426$, ungepaarter t-Test) ein statistisch signifikanter Unterschied (siehe Tabellen 22 und 23).

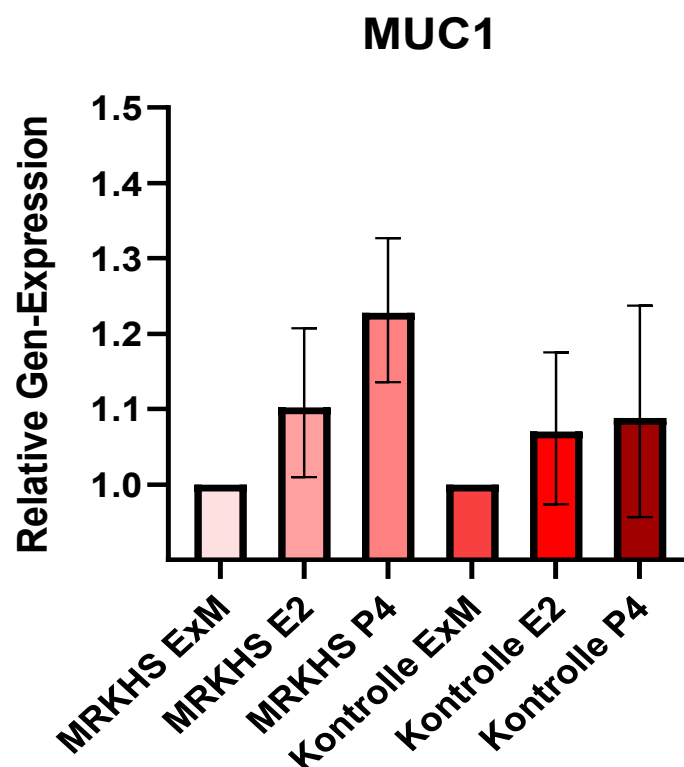


Abbildung 26 Relative Expressionsveränderung für das Gen MUC1 in den Organoidkulturen.

Werte bezogen auf eine jeweils unstimulierte Kontrollprobe derselben Linie (ExM = 1). Dargestellt sind die Durchschnittswerte \pm SEM (n MRKHS = 5; n Kontrollen = 4). Beachte den Start der y-Achse bei 0.9

Tabelle 22 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT und relative Expressionsveränderungen (EFC) in der MRKHS-Kohorte für MUC1

	ΔCT	ΔCT	ΔCT	$\Delta\Delta$CT	$\Delta\Delta$CT
	ExM	E2	P4	E2	P4
MRKHS 1	-0,228	-0,396	-0,580	-0,168	-0,352
MRKHS 2	-1,140	-0,902	-1,007	0,238	0,133
MRKHS 3	-0,171	-0,365	-0,691	-0,194	-0,520
MRKHS 17	-0,408	-0,974	-0,825	-0,566	-0,417
MRKHS 18	-0,141	-0,150	-0,465	-0,009	-0,324

	EFC	Range EFC	EFC	Range EFC
	E2	E2	P4	P4
MRKHS 1	1,12	1,08 - 1,16	1,28	1,18 - 1,38
MRKHS 2	0,85	0,81 - 0,89	0,91	0,84 - 0,99
MRKHS 3	1,14	1,07 - 1,23	1,43	1,33 - 1,55
MRKHS 17	1,48	1,39 - 1,58	1,34	1,31 - 1,36
MRKHS 18	1,01	0,95 - 1,07	1,25	1,21 - 1,29
Durschnitt				
MRKHS	1,10		1,23	

Tabelle 23 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT und relative Expressionsveränderungen (EFC) in der Kontroll-Kohorte für MUC1

	ΔCT	ΔCT	ΔCT	$\Delta\Delta$CT	$\Delta\Delta$CT
	ExM	E2	P4	E2	P4
K 27	-0,555	-0,251	-0,266	0,304	0,289
K 28	0,942	0,654	0,391	-0,287	-0,550
K 29	1,572	1,343	1,288	-0,230	-0,285
K 44	0,265	0,088	0,325	-0,176	0,060

	EFC	Range EFC	EFC	Range EFC
	E2	E2	P4	P4
K 27	0,81	0,74 - 0,88	0,82	0,81 - 0,83
K 28	1,22	1,14 - 1,3	1,47	1,24 - 1,73

K 29	1,17	1,13 - 1,22	1,22	1,1 - 1,35
K 44	1,13	0,92 - 1,39	0,96	0,94 - 0,98
Durchschnitt Kontrollen	1,07		1,09	

3.4.5 Schnitte, immunhistochemische und immunfluoreszierende Färbungen

Zur genaueren Analyse des strukturellen Aufbaus der MRKHS- und Kontrollorganoide wurden Organoidkulturen nach dem in Kapitel 2.4.5 und 2.4.6 beschriebenen Protokoll mit Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. An den daraus angefertigten Schnitten wurden anschließend verschiedene Zielproteine entweder immunhistochemisch oder mittels Immunfluoreszenz gefärbt (siehe Kapitel 2.4.7 - 2.4.10).

3.4.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von MRKHS- und Kontrollorganoiden

Um einen lichtmikroskopischen Vergleich der Morphologie von MRKHS- und Kontrollorganoiden zu erlauben, wurden Schnitte mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt (siehe Abb. 27).

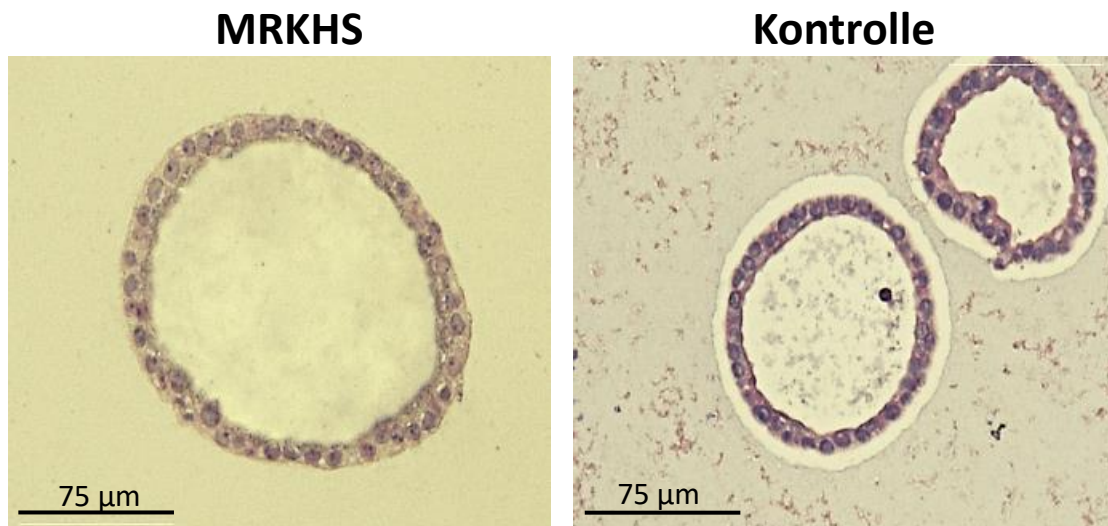


Abbildung 27 Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von Organoiden einer MRKHS- (links) und Kontroll-Linie (rechts).

Unter dem Lichtmikroskop waren dabei keine grundlegenden Unterschiede im morphologischen Aufbau zu erkennen.

Unter dem Lichtmikroskop zeigen im unstimulierten Zustand sowohl die MRKHS- als auch die Kontroll-Organoiden einen meist einschichtigen Aufbau mit rundlichen bis rechteckigen Zellkernen (s. Abb 27). Zahlreiche Kerne lassen einen prominenten Nukleolus erkennen. An der Innenseite des Zellrings ist in hoher Vergrößerung ein apikaler Mikrovilli-Saum abgrenzbar, was für eine erhaltene Polarität der Zellen sowohl in den MRKHS- als auch in den Kontroll-Organoiden spricht. Im Vergleich lassen sich weiter keine morphologischen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen erkennen.

3.4.5.2 Färbung von ERa, PR, MIB1 und PAX8 an MRKHS- und Kontrollorganoiden sowie Gewebeschnitten

Um eine genauere Phänotypisierung sowie einen Vergleich zwischen Organoiden und Gewebe zu ermöglichen, wurden MRKHS- und Kontrollorganoiden sowie Gewebeschnitte immunhistochemisch für Östrogenrezeptor alpha (ERa), Progesteronrezeptor (PR), den Proliferationsindex Ki67 (MIB1), sowie Paired-Box-Protein 8 (PAX8) gefärbt. Die Abbildungen 28 und 29 zeigen daher eine exemplarische MRKHS- bzw. Kontroll-Linie, wobei sämtliche Marker sowohl an Gewebeschnitten und unstimulierten Organoiden, sowie an Östrogen bzw. Östrogen, Progesteron und cAMP behandelten Organoiden gefärbt wurden.

Im unstimulierten Zustand (ExM) zeigten die MRKHS-Organoiden einer Linie eine inhomogene Expression von ERa. Während einzelne Organoiden eine mittel bis starke Anfärbung im Bereich des Nukleus aufwiesen, zeigten andere Organoiden kaum bis keine Expression des Östrogenrezeptors (s. Abb. 28). Ein vergleichbares Bild ergab sich für unstimulierte Kontroll-Organoiden, wo die Expression von ERa sich ebenfalls unter den Organoiden unterschied (vgl. Abb. 29). Im Kontrast dazu stand jeweils das Ursprungsgewebe, welches eine starke Anfärbung für ERa in allen Epithelzellen aufwies, wobei sich sowohl die dargestellte MRKHS- als auch Kontroll-Linie zum Entnahme-Zeitpunkt in der Proliferationsphase des Zyklus befanden (s. Abb. 28 und 29). Bei Stimulation mit Östrogen zeigten sowohl MRKHS- als auch die Kontroll-Organoiden eine

vermehrte Expression von ER α , was sich in einer starken Anfärbung fast aller Organoide einer Linie äußerte (siehe ‚E2‘ in Abb. 28 und 29).

Während das Ausgangsgewebe sowohl für die dargestellte MRKHS- als auch Kontroll-Linie eine starke Anfärbung des Progesteronsrezeptors aufwies, war für die unstimulierten Organoide in beiden Fällen keine signifikante Expression von PR immunhistochemisch nachweisbar (s. Abb. 28 und 29). Erst bei Stimulation mit Östrogen, bzw. Östrogen, Progesteron und cAMP zeigte sich eine vermehrte Expression von PR. Dies betraf jedoch sowohl bei MRKHS- als auch bei den Kontroll-Organoiden nicht alle Organoide einer Linie, sodass sich für stimulierte Organoid-Linien bezüglich PR ein inhomogenes Muster mit zahlreichen stark angefärbten und einigen kaum bis nicht angefärbten Organoiden ergab (s. Abb. 28 und 29).

Beim Vergleich der Ausgangsgewebe zeigten im MRKHS-Endometrium gemessen an der Ki67-Expression deutlich weniger Epithel-Zellen eine proliferative Aktivität als im Kontroll-Endometrium, obwohl beide sich in der Proliferationsphase des Zyklus befanden. Dieser Unterschied ließ sich jedoch nicht auf die unstimulierten Organoide übertragen. Bei diesen zeigte sich eine zwischen MRKHS- und Kontroll-Organoiden vergleichbare Expression von Ki67, wobei in der Regel nicht alle Zellen eines Organoids und auch nicht alle Organoide proliferative Aktivität aufwiesen (vgl. Abb. 28 und 29). Unter hormoneller Stimulation erhöhte sich tendenziell jeweils der Anteil an proliferierenden Zellen in den Organoiden leicht, wobei in beiden Fällen vereinzelte Organoide weiterhin keine Expression von Ki67 zeigten (s. Abb. 28 und 29).

PAX8, ein Transkriptionsfaktor, der typischerweise in endometrialen Epithelzellen exprimiert wird, zeigte in allen Zellen der Organoide wie auch im Epithel des Ausgangsgewebes eine starke Expression (s. Abb. 28 und 29). Dies ist ein weiterer Hinweis auf den epithelialen Ursprung und Charakter der Endometrium-Organoiden.

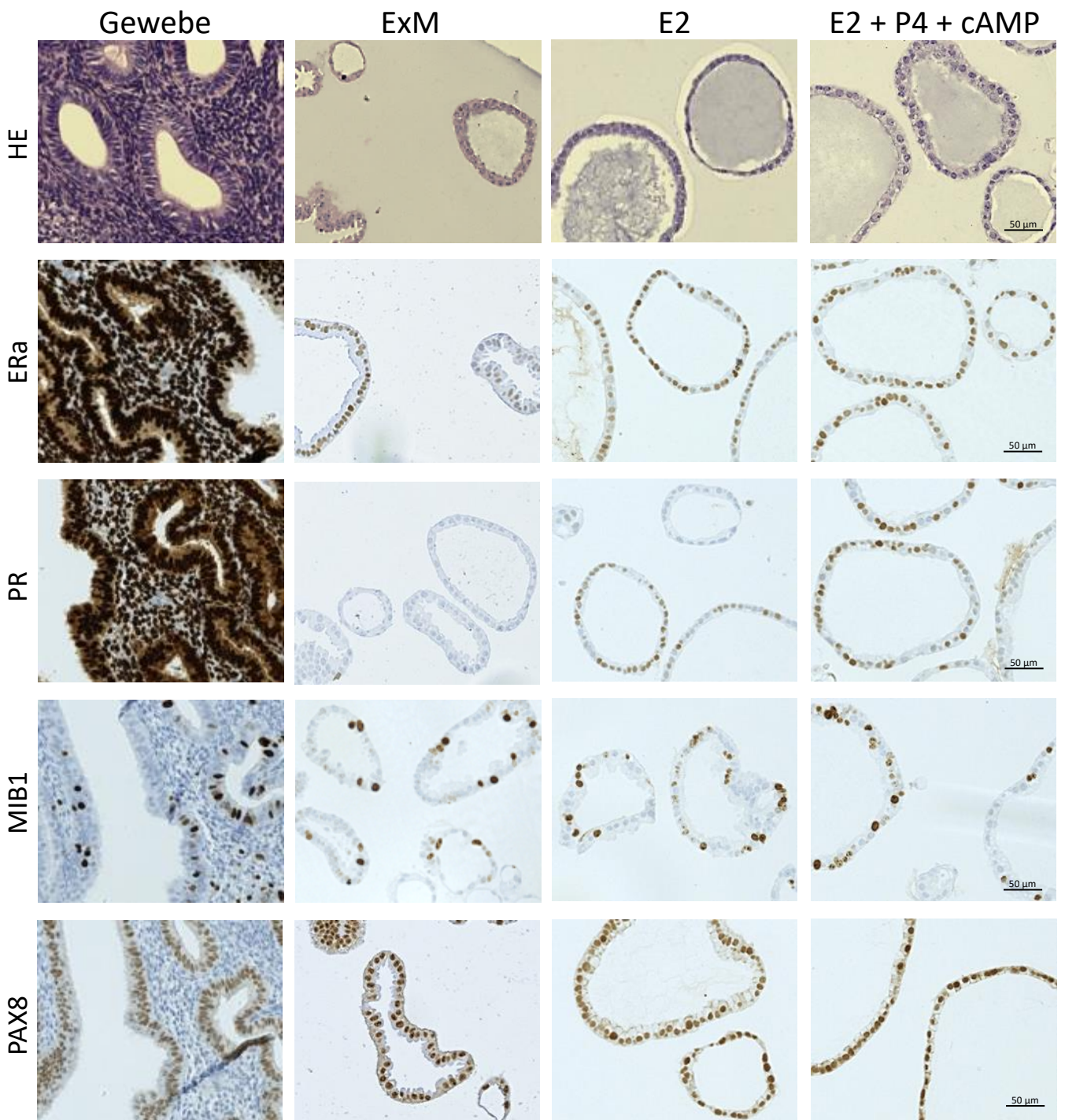


Abbildung 28 Immunhistochemische Färbungen der Marker ERa, PR, MIB1 und PAX8 an Gewebeschnitten, sowie unstimulierten und stimulierten Organoiden einer exemplarischen MRKHS-Linie.

(Linie MRKHS 3)

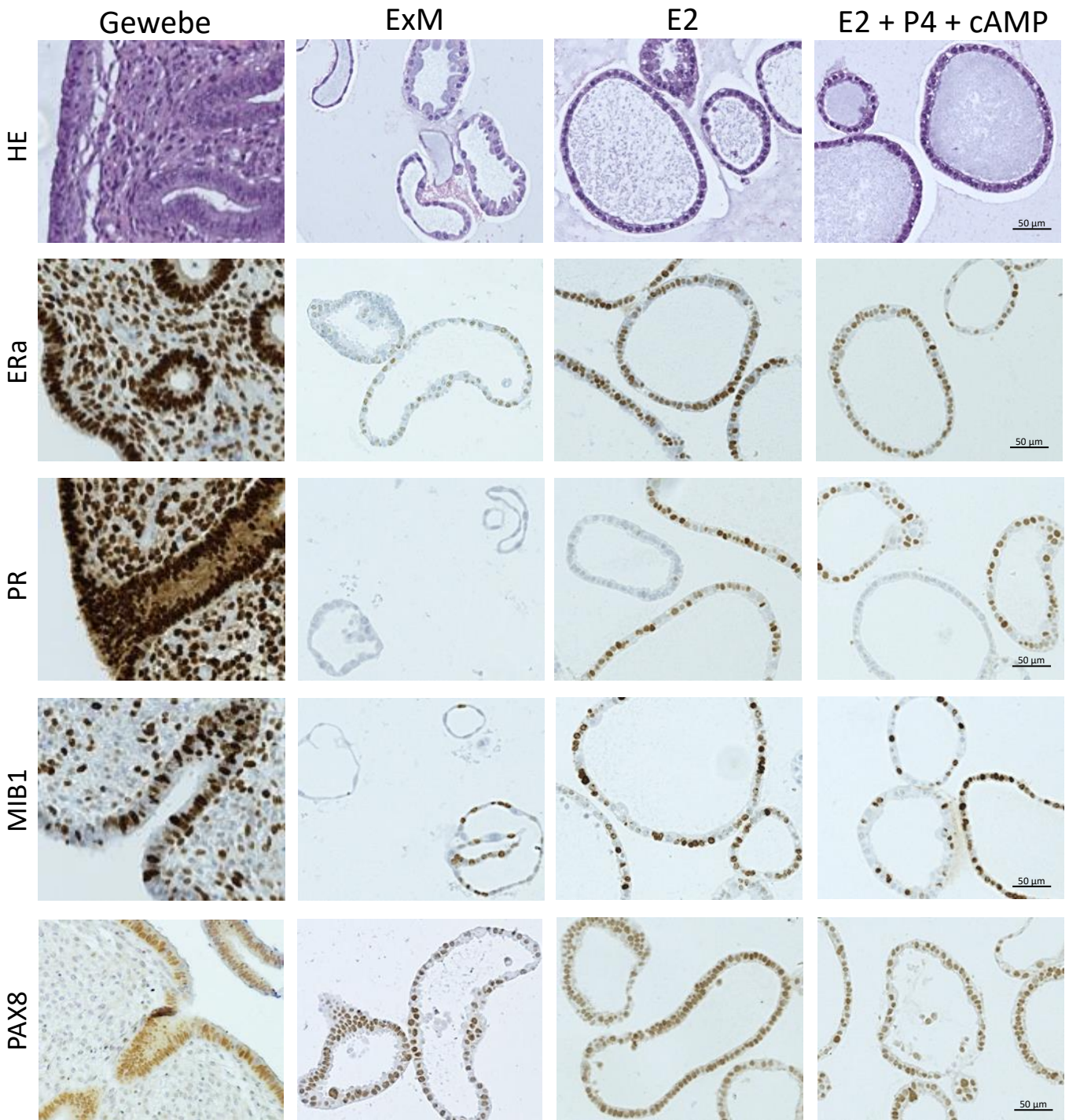


Abbildung 29 Immunhistochemische Färbungen der Marker ERa, PR, MIB1 und PAX8 an Gewebeschnitten, sowie unstimulierten und stimulierten Organoiden einer exemplarischen Kontroll-Linie.

(Linie 28E)

3.4.5.3 Färbung von Panzytokeratin und Perlecan an MRKHS-Organoiden

Zytokeratine bilden als Intermediärfilamente einen sehr wichtigen Teil des Zytoskeletts und werden primär von Epithelzellen produziert. Hierbei gilt die Zytokeratin-Kombination 8/18 als typisch für das endometriale Epithel. Um den epithelialen Charakter der Zellen in den Organoiden zu überprüfen, wurde daher versucht, eine Immunfluoreszenzfärbung der Zytokeratine vorzunehmen (s. Kapitel 2.4.10). Ebenfalls angefärbt werden sollte Perlecan, welches als Proteoglykan in der Basalmembran von epithelialen Geweben zu finden ist.

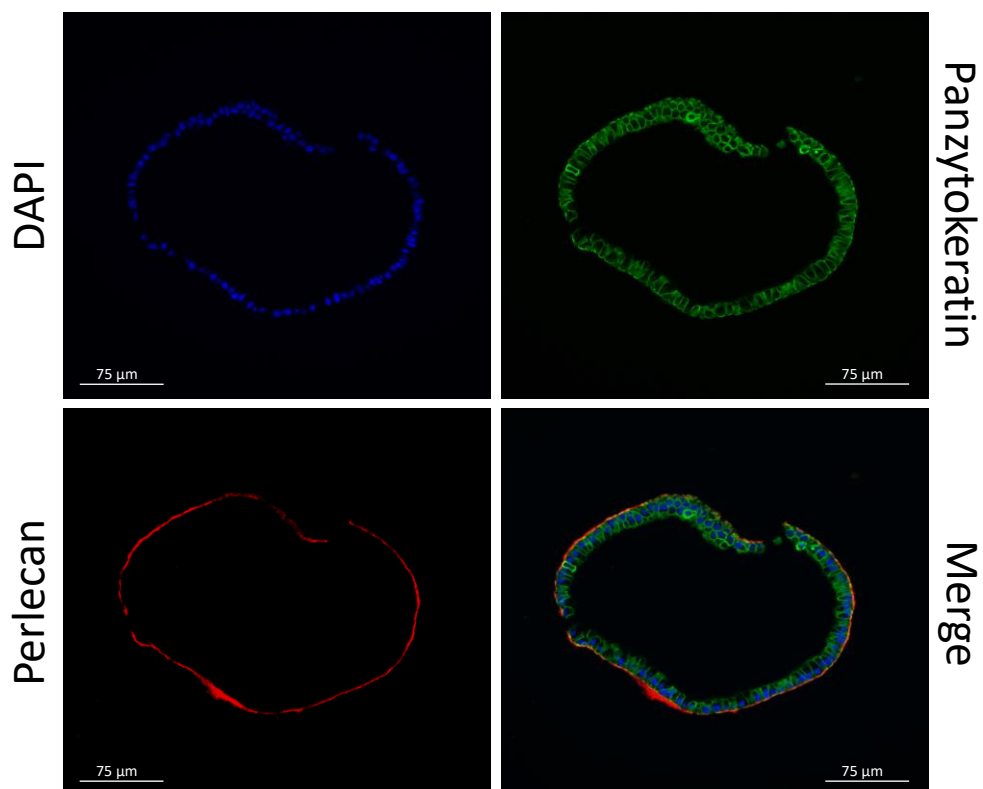


Abbildung 30 Immunfluoreszenzfärbung einer exemplarischen MRKHS-Linie für die Marker Panzytokeratin (grüne Fluoreszenz) und Perlecan (rote Fluoreszenz).

Über 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blaue Fluoreszenz) wurden zudem die Zellkerne angefärbt. Rechts unten sind die übereinander gelegten Signale abgebildet

In der in Abbildung 30 exemplarisch dargestellten MRKHS-Linie zeigte sich eine starke Anfärbung von Zytokeratinen im Zytoplasma der Organoid-Zellen (siehe Abb. 30, grüne Fluoreszenz). Durch die Anfärbung von Perlecan (siehe Abb. 30, rote Fluoreszenz) gelang zudem die Visualisierung der Basalmembran, die das Organoid umgibt und der die Zellen aufsitzen. Beides sind klare Hinweise auf den

epithelialen Charakter der kultivierten Zellen und die erhaltene Polarität derselben.

3.4.6 Überprüfung des verwendeten Progesterons in der 2D-Zellkultur

Um die Wirksamkeit des Progesterons, das in den Dezidualisierungsexperimenten für die Stimulation der Organoide verwendet wurde, zu überprüfen, wurde ein weiteres Dezidualisierungsexperiment mit humanen endometrialen Stromazellen (HESC) durchgeführt. Dabei wurde ein standardisiertes und in unserem Labor fest etabliertes Protokoll verwendet. Der genaue Ablauf sowie die verwendeten Konzentrationen sind Kapitel 2.4.12 zu entnehmen. Als Vergleich wurde auch eine Dezidualisierung von HESC mit Medroxyprogesteronacetat, welches standardmäßig für HESC aufgrund seiner höheren Potenz verwendet wird, durchgeführt, bei ansonsten identischen Konditionen. Die erfolgreiche Dezidualisierung der Stromazellen wurde nach erfolgter RNA-Isolierung und cDNA-Synthese anhand von relativen Expressionsveränderungen der beiden Dezidualisierungsmarker Prolaktin (PRL) und Insulin growth factor binding protein 1 (IGFBP1) in der qPCR beurteilt.

Hierbei zeigte sich, dass mit dem für die Organoid-Experimente verwendeten Progesteron erfolgreich eine Dezidualisierung der endometrialen Stromazellen erzielt werden konnte. Der Effekt auf die Expression der Dezidualisierungsmarker PRL und IGFBP1 fiel dabei bei einer Stimulationsdauer von sechs Tagen deutlich ausgeprägter aus als nach einer Dauer von zwei Tagen.

3.4.6.1 Prolaktin

Die Stimulation mit dem für die Organoid-Experimente verwendeten Progesteron führte in den HESC nach zwei Tagen zu einer Hochregulierung der Prolaktin-Genexpression auf das 86,96-fache im Vergleich zum unstimulierten Kontrollzustand. Bei Ausdehnung der Stimulationsdauer auf sechs Tage stieg diese Expressionssteigerung auf das 1315,44-fache an, was einer Steigerung um das 15,13-fache im Vergleich zum Wert nach zwei Tagen entspricht (siehe Abb. 31 und Tabelle 24).

Wurde anstatt Progesteron das synthetische Medroxyprogesteronacetat verwendet, war nach zwei Tagen Stimulation ein Expressionsanstieg um das

287,82-fache für Prolaktin zu verzeichnen. Nach sechs Tagen war dieser Wert auf das 2501,65-fache gestiegen im Vergleich zum unstimulierten Ausgangswert. Dies entsprach einer Steigerung des Stimulationseffekts um das 8,69-fache beim Vergleich der Dauer von sechs Tagen zur Dauer von zwei Tagen (s. Abb. 31 und Tab. 24).

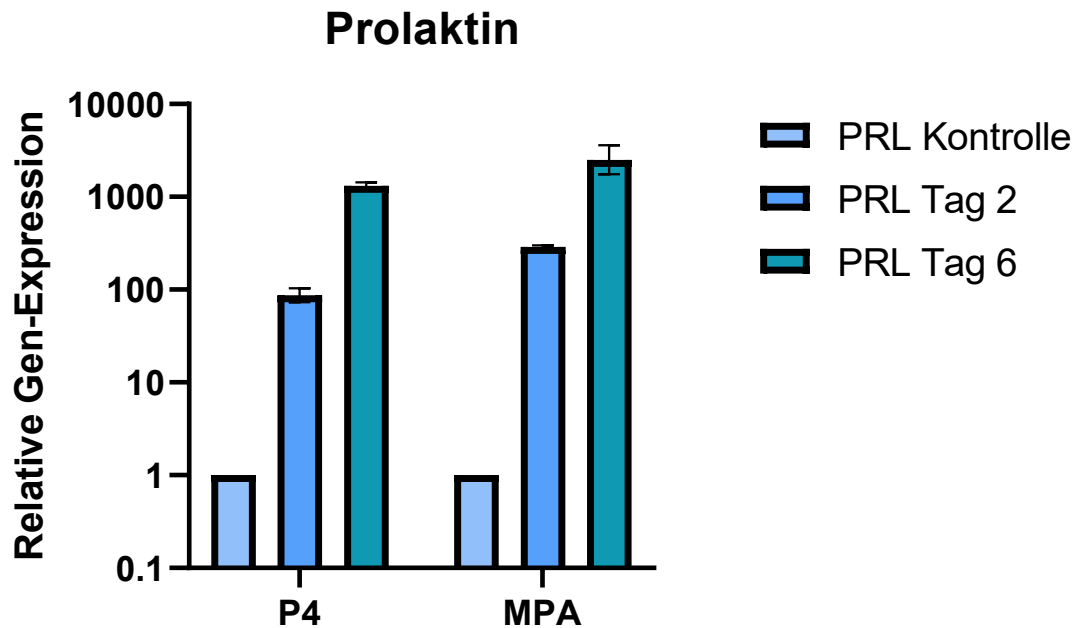


Abbildung 31 Relative Expression von Prolaktin in HESC, die mit Progesteron (P4) oder MPA stimuliert wurden.

Werte bezogen auf eine unstimulierte Kontrollprobe. Dargestellt sind die Durchschnittswerte \pm SEM. Zu beachten gilt die logarithmische Y-Achse.

Tabelle 24 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT und relative Expressionsveränderungen (EFC) der HESC-Kulturen für Prolaktin

	Δ CT Kontrolle	Δ CT D2	Δ CT D6	$\Delta\Delta$ CT D2	$\Delta\Delta$ CT D6
Progesteron	20,072	13,629	9,710	-6,442	-10,361
Medroxy- progesteron	20,072	11,903	8,783	-8,169	-11,289

	EFC D2	Range EFC D2	EFC D6	Range EFC D6
Progesteron	86,963	73,35 - 103,1	1315,443	1205,21 – 1435,76

Medroxy- progesteron	287,815	275,59 – 300,58	2501,654	1745,65 – 3585,07
-------------------------	----------------	-----------------	-----------------	-------------------

3.4.6.2 Insulin growth factor binding protein 1

Die Stimulation mit Progesteron über zwei Tage hinweg führte zu einer Steigerung der Genexpression für IGFBP1 auf das 48,5-fache in Relation zur Expression in unbehandelten Kontrollzellen. Bei Stimulation für sechs Tage erhöhte sich dieser Wert weiter auf das 969,88-fache, was einer Steigerung um Faktor 20 im Vergleich zu Tag 2 entspricht (s. Abb. 32 und Tab. 25).

Bei Stimulation der HESC mit MPA ließ sich nach zwei Tagen ein Anstieg der Expression auf das 266,13-fache messen. Nach sechs Tagen war dieser Wert auf das 1705,13-fache angestiegen und damit 6,4-fach so hoch wie an Tag 2 (s. Abb. 32 und Tab. 25).

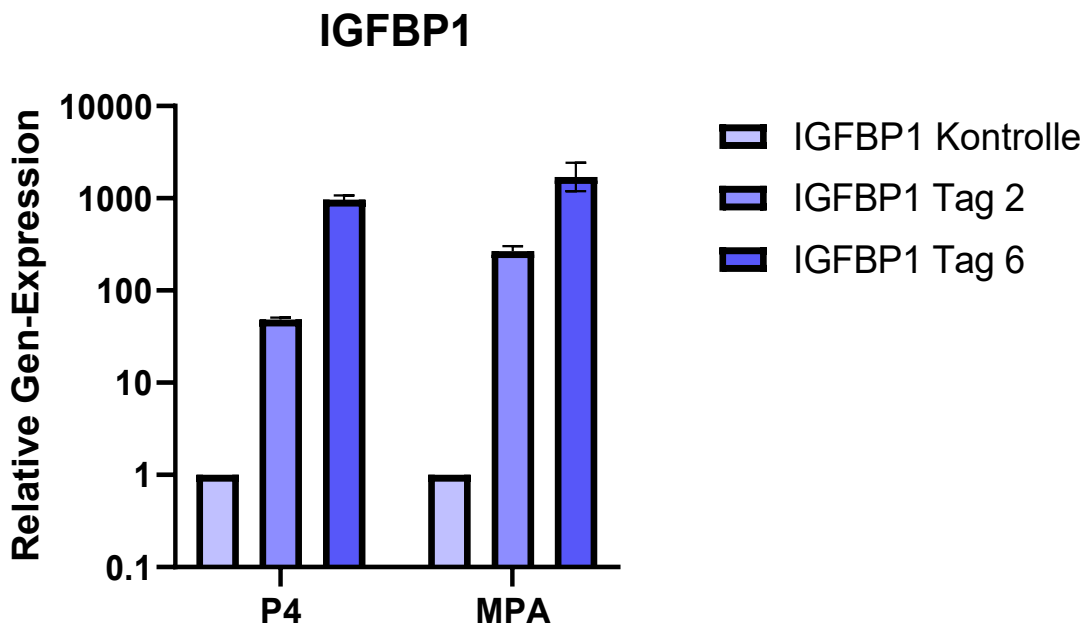


Abbildung 32 Relative Expression von IGFBP1 in HESC, die mit Progesteron (P4) oder MPA stimuliert wurden.

Werte bezogen auf eine unstimulierte Kontrollprobe. Dargestellt sind die Durchschnittswerte \pm SEM. Zu beachten gilt die logarithmische Y-Achse.

Tabelle 25 Δ CT, $\Delta\Delta$ CT und relative Expressionsveränderungen (EFC) der HESC-Kulturen für IGFBP1

	ΔCT	ΔCT	ΔCT	$\Delta\Delta$CT	$\Delta\Delta$CT
	Kontrolle	D2	D6	D2	D6
Progesteron	17,324	11,724	7,402	-5,600	-9,922
Medroxy- progesteron	17,324	9,268	6,588	-8,056	-10,736

	EFC	Range EFC	EFC	Range EFC
	D2	D2	D6	D6
Progesteron	48,503	46,2 – 50,92	969,883	876,93 – 1072,69
Medroxy- progesteron	266,132	234,4 – 302,17	1705,131	1196,56 – 2429,85

3.5 Analyse von Patienteneigenschaften und Uterus-Rudimenten

Die folgenden Absätze sowie Abbildungen und Tabellen dieses Kapitels wurden bereits im „Journal of Clinical Medicine“ veröffentlicht [140]:

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollte an einer großen Kohorte von MRKHS-Patientinnen mögliche Zusammenhänge zwischen MRKHS-Subtyp sowie assoziierten Fehlbildung und dem Vorkommen von Uterus-Rudimenten sowie der Wahrscheinlichkeit von intrauterinem Endometrium untersucht werden. Hierfür wurden, wie unter 2.4.16 beschrieben, die Operations- und Pathologie-Berichte analysiert. Insgesamt wurden 315 MRKHS-Patientinnen untersucht, die im Zeitraum zwischen Januar 2014 und Dezember 2022 an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen operiert wurden. Dabei mussten fünf Patientinnen aufgrund von fehlenden Informationen hinsichtlich ihrer Uterus-Rudimente von der Analyse ausgeschlossen werden.

„Bei 265 (85.5%) der 310 MRKHS-Patientinnen (180 MRKHS Typ I und 85 MRKHS Typ II) konnten intraoperativ Uterus-Rudimente festgestellt werden, wobei 211 Patientinnen (68.1%) bilaterale Rudimente aufwiesen (siehe Tabelle 26 und Abbildung 33).

Patientinnen mit MRKHS Typ II hatten seltener Uterus-Rudimente (73.3%) als Patientinnen mit MRKHS Typ I (92.8%) (chi-square, $p < 0.001$). Zudem zeigten Typ-I-Patientinnen mit 81.4% signifikant häufiger bilaterale Rudimente als Patientinnen mit MRKHS Typ II mit lediglich 45.7% ($p < 0.001$). Noch seltener waren bilaterale Rudimente bei Typ-II-Patientinnen mit renalen Fehlbildungen (34.7%, $n=72$). Typ-II-Patientinnen mit assoziierten Fehlbildungen allerdings ohne renale Malformationen (z.B. nur skelettale Defekte, $n=44$) hingegen wiesen mit 63.6% eine deutlich höhere Rate an bilateralen Rudimenten auf.

Von den 45 Patientinnen mit unilateraler Nierenagenesie wiesen 12 Patientinnen auch eine Agenesie des Uterus auf. 26 Patientinnen hatten ein unilaterales Uterus-Rudiment, wobei dieses in 25 von 26 Fällen (96.2%) gegenseitig zur Nierenagenesie zu finden war. Lediglich 7 dieser 45 Patientinnen wiesen bilaterale Uterus-Rudimente auf. Insgesamt hatten nur 8 (17.8%) der 45 Patientinnen mit unilateraler Nierenagenesie ein Uterusrudiment auf der

betroffenen Seite, wobei 32 Patientinnen (71.1%) ein Uterus-Rudiment auf der Gegenseite aufwiesen.

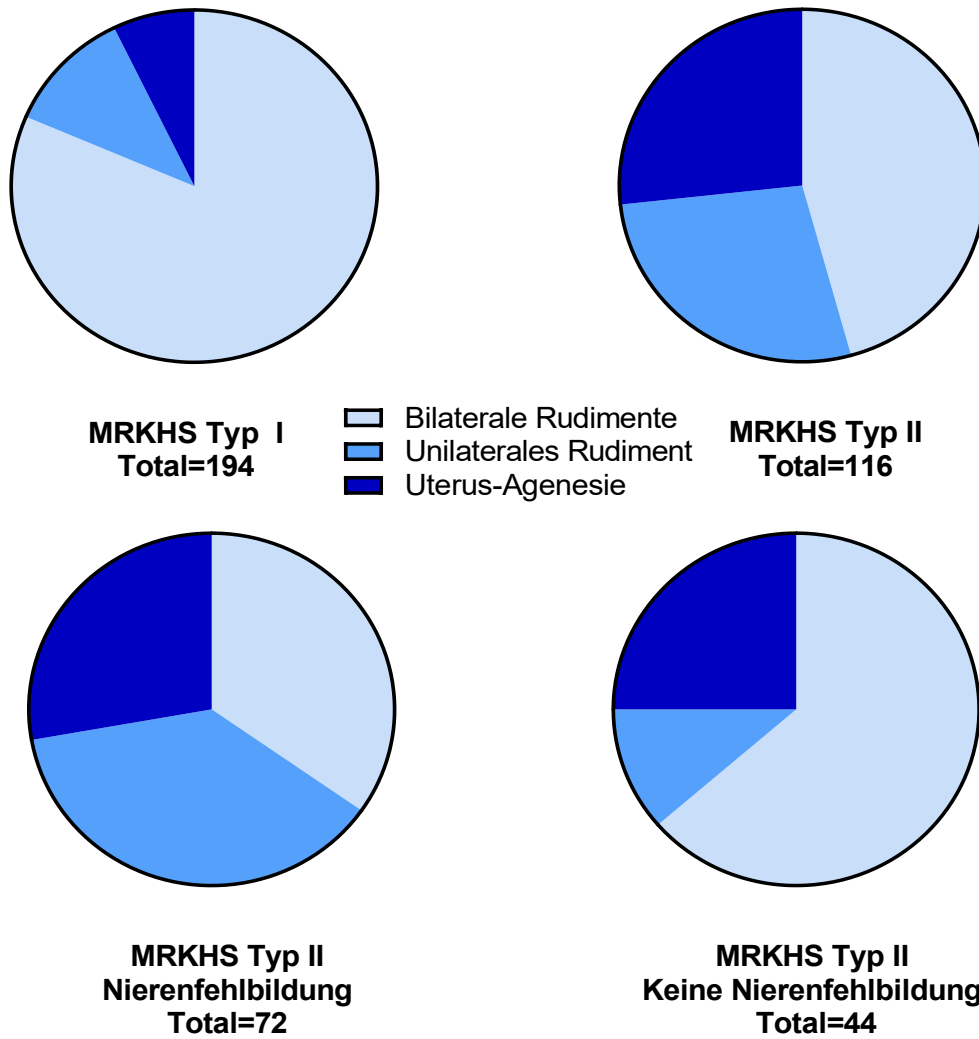


Abbildung 33 Verteilung von Uterus-Rudimenten in verschiedenen MRKHS-Subgruppen.

Die genauen Prozentangaben sind in Tabelle 26 zu sehen [140].

Tabelle 26 Patienteneigenschaften und jeweilige Häufigkeit von Uterus-Rudimenten [140]

	Typ I	Typ II	Typ II	
			Nieren- fehlbildung	Keine Nieren- fehlbildung
Anzahl Pat.	194	116	72	44
Bilaterale Rudimente	158 (81.4%)	53 (45.7%)	25 (34.7%)	28 (63.6%)
Unilaterale Rudimente	22 (11.3%)	32 (27.6%)	27 (37.5%)	5 (11.4%)
Uterus- Agenesie	14 (7.2%)	31 (26.7%)	20 (27.8%)	11 (25.0%)

Insgesamt wurden im Untersuchungszeitraum 298 Uterus-Rudimente von 149 Patientinnen mit MRKHS Typ I (76.0%) und 47 Patientinnen mit MRKHS Typ II (24.0%) operativ entfernt. 19 Rudimente von 11 Patientinnen mussten aus der nachfolgenden Analyse aufgrund von inkompletten Angaben hinsichtlich der Rudiment-Größe ausgeschlossen werden.

Die Größe der Uterus-Rudimente bewegte sich zwischen 0.3 cm³ und 184.3 cm³ mit einem Durchschnitt von 7.9 cm³ (n=279). Beim Vergleich der Rudimentgrößen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen MRKHS Typ I und II (p = 0.126). Patientinnen mit MRKHS Typ II wiesen einen leicht höheren Median auf (n=61, Median = 4.9 cm³, Durchschnitt = 6.1 cm³, Bereich: 0.4 – 45.0 cm³, SD = 6.6 cm³), Patientinnen mit MRKHS Typ I hingegen zeigten eine höhere Durchschnittsgröße (n=218, Median = 4.6 cm³, Durchschnitt = 8.4 cm³, Bereich = 0.3 - 184.3 cm³, SD = 18.9 cm³) aufgrund einiger sehr großer Rudimente (siehe Tabelle 27).

Die histopathologische Aufarbeitung konnte Endometrium in 96 Rudimenten von 80 Patientinnen (40.8% aller Patientinnen mit Rudiment-Entfernung) nachweisen. Hierbei wiesen Patientinnen mit MRKHS Typ I signifikant häufiger (45.6%) Endometrium in ihren Rudimenten auf als Patientinnen mit MRKHS Typ II (25.5%) (p = 0.014). Noch seltener konnte Endometrium bei Patientinnen mit

assoziierten Nierenfehlbildungen (n=27) gefunden werden (22.2%). Uterus-Rudimente mit Endometrium waren zudem signifikant größer (Durchschnitt = 13.3 cm³, SD = 27.0 cm³) als Rudimente ohne endometriales Gewebe (Durchschnitt = 5.4 cm³, SD = 8.1 cm³) (siehe Abb. 34, p = 0.008).

Patientinnen mit bilateralen Rudimenten (n=157) wiesen zudem häufiger Endometrium auf (43.3%) als Patientinnen mit nur unilateralen Rudimenten (30.8%, n=39). Von 102 Patientinnen mit beidseitiger Uterus-Rudimententfernung hatten 16 Patientinnen Endometrium in beiden Rudimenten (15.7%).

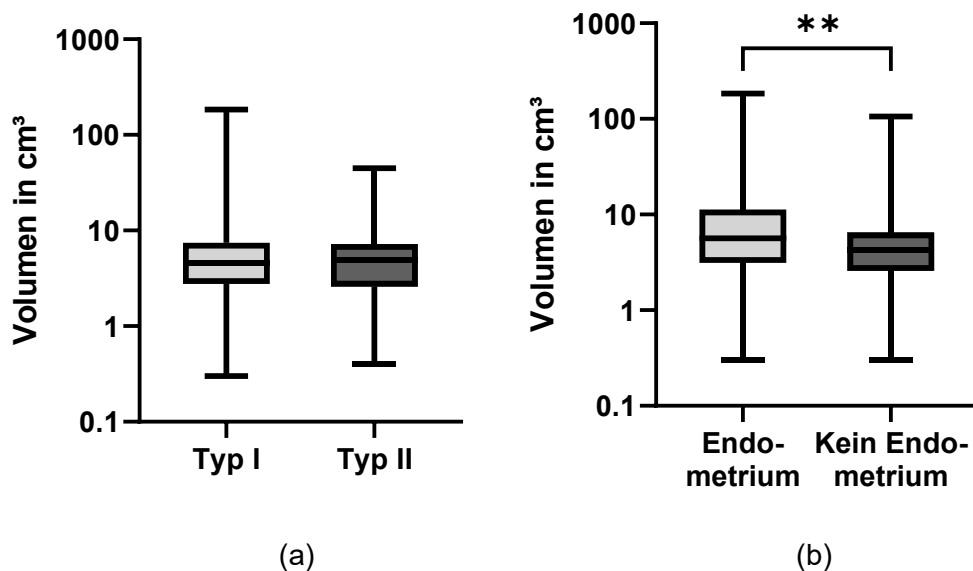


Abbildung 34. Volumen der Uterus-Rudimente.

(a) Volumen von Uterus-Rudimenten von Pat. mit MRKHS Typ I (n=218, Durchschnitt = 8.4 cm³, Median = 4.6 cm³) und Typ II (n=61, Durchschnitt 6.1 cm³, Median = 4.9 cm³). Die Whisker markieren das Minimum und Maximum;

(b) Volumen von Uterus-Rudimenten mit (n=89, Durchschnitt = 13.3 cm³, Median = 5.6 cm³) und ohne (n=190, Durchschnitt = 5.4 cm³, Median = 4.3 cm³) Endometrium. Die Whisker markieren das Minimum und Maximum (** p < 0.010) [140].

Tabelle 27 Eigenschaften aller Patientinnen mit Rudiment-Entfernung, jeweiliges durchschnittliches Rudiment-Volumen und Häufigkeit von Endometrium in den jeweiligen Patientinnen.

19 Rudimente von 11 Patientinnen mussten von der Größenanalyse ausgeschlossen werden aufgrund unvollständiger Angaben [140].

	Typ I	Typ II	Typ II	Typ II
			Nieren- fehlbildung	Keine Nieren- fehlbildung
Anzahl Pat. (Rudimente eingeschlossen/insg.)	149 (218/235)	47 (61/63)	27 (33/34)	20 (28/29)
Durchschn. Größe in cm ³ (Bereich)	8.4 (0.3 – 184.3)	6.1 (0.4 – 45.0)	7.3 (0.5 – 45.0)	4.7 (0.4 – 11.9)
Endometrium	45.6%	25.5%	22.2%	30.0%

Insgesamt wiesen 89 Patientinnen, deren Rudimente entfernt wurden, eine positive Anamnese für Mittelschmerzen auf. 10 weitere Patientinnen gaben regelmäßige Zyklus-Beschwerden an, allerdings keinen Mittelschmerz (z.B. Stimmungsschwankungen, Kopfschmerzen). Allerdings ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit von Endometrium bei Patientinnen mit Mittelschmerzen (37.1%) im Vergleich zu Patientinnen ohne jegliche zyklusabhängigen Beschwerden (44.0%, n=84, p = 0.351).“

4 Diskussion

4.1 Etablierung von Endometrium-Organoidkulturen aus MRKHS- und Kontrollgewebe

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Modelle zur Erforschung des Endometriums und der Interaktionen seiner Zelltypen geschaffen. Endometriale epitheliale Primär-Zellen aus Gewebeproben proliferieren erfolgreich auch *in vitro* und zeigen zu Beginn eine hormonelle Stimulationsfähigkeit, wodurch sie die Untersuchung patientenspezifischer Eigenschaften erlauben würden [110, 180]. Die ursprünglichen Eigenschaften derartiger Primärzellkulturen bleiben jedoch nur für die ersten drei bis vier Passagen erhalten, bevor es zu Veränderungen und Dedifferenzierung der Zellen kommt, weshalb eine langfristige Kultivierung nicht möglich ist [58, 110]. Zudem ist eine deutliche Einflussnahme der Entnahme-Situation (Zyklusphase, Schwangerschaft etc.) auf den anschließenden Phänotyp der Primärzellkultur zu erwarten [180]. Ansätze, die eine Immortalisierung von Primärzellkulturen bewirken, erlauben zwar eine langfristige Kultivierung der Zelllinien mit zeitweise erhaltener Stimulationsfähigkeit, besitzen aber aufgrund der Natur der genetischen Modifizierung eine eingeschränkte Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation [86].

Der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz der Kultivierung primärer endometrialer Epithelzellen in einer dreidimensionalen Wachstumsmatrix überwindet unter anderem durch die Beibehaltung adulter Stammzellen in der Kultur viele Probleme, die frühere Modelle innehatten. Die Epithelzellen zeigen in unserem Organoidmodell eine erhaltene Polarisierung mit einem apikalen Mikrovillisaum und sitzen einer Basalmembran auf, die mittels Perlecan-Färbung nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 30). Auch der epitheliale Charakter der Zellen konnte mittels Panzytokeratin-Färbung bewiesen werden. Die Endometrium-Organoiden sind über mehrere Monate hinweg kultivierbar und zeigen dabei unter optimalisierten Bedingungen keinen Verlust an Wachstumsgeschwindigkeit, was für den Erhalt adulter Stammzellen in der Kultur spricht. Die Organoiden zeigen zudem auch in höheren Passagezahlen eine erhaltene hormonelle Stimulationsfähigkeit durch Östrogen und Progesteron, was anhand von

Expressionsveränderungen verschiedener Markergene in der qPCR gezeigt werden konnte. Dadurch stellt das Organoidmodell eine noch bessere Annäherung an die *in vivo* Verhältnisse dar als frühere Modelle.

Wie in Kapitel 1.4.3 beschrieben, weisen mehrere Faktoren auf eine Störung der Hormonrezeptorfunktion als möglicher Teil der Pathophysiologie des MRKHS-Syndroms hin. Da andere hormonabhängige Gewebe wie Brust und Schambehaarung eine normale Entwicklung zeigen [19], müsste ein möglicher Defekt auf den Genitaltrakt beschränkt sein. Umso wichtiger erscheint es daher, das rudimentäre Gewebe selbst zu analysieren. Das bisherige Fehlen eines etablierten funktionellen Modells beschränkte jedoch die Möglichkeiten, die Eigenschaften und Fähigkeiten der betroffenen Zelltypen zu untersuchen. Durch die beschriebenen Präparations-, Verarbeitungs- und Kultivierungsschritte ist es in dieser Arbeit gelungen, Endometrium-Organoide aus dem Gewebe von MRKHS-Patientinnen zu etablieren. Dies eröffnet zahlreiche neue Möglichkeiten, um ein besseres Verständnis für die Pathophysiologie des Syndroms zu erlangen.

In dieser Arbeit konnte dabei eine hundertprozentige Erfolgsquote für die Etablierung von Organoidkulturen aus makroskopisch in den Rudimenten erkennbarem Endometrium erreicht werden. Bei zwei Patientinnen mit mikroskopischem Nachweis von fokalen Endometrium lässt der fehlende Nachweis von Drüsenstücken im Originalverdau (s. Abb. 4) darauf schließen, dass bei der zufällig erfolgten Probenentnahme aus dem Rudiment die beschriebenen Bereiche mit Endometrium nicht erfasst wurden.

4.2 Optimierung der Kultivierung von Endometrium-Organoiden

Mithilfe der erläuterten Optimierungsschritte beim Umsetzen und Kultivieren der Organoidkulturen ist es gelungen, ein verlässliches und effektives Protokoll zur Herstellung von Organoidkulturen aus Patientengewebe zu etablieren, die über mehrere Monate hinweg proliferierend und expandierbar waren. Ein wichtiger Schritt war dabei die in Kapitel 3.2.3 beschriebene Umstellung des Kulturnährmediums.

Das erste Wachstumsmedium enthielt neben Noggin und R-Spondin auch den Faktor WNT3a. Die Familie der WNT-Glykoproteine spielt während der Embryogenese eine große Rolle in der korrekten Entwicklung des weiblichen Urogenitaltrakts und anderer Gewebe [27, 135, 174]. Auch im späteren Verlauf besitzt der WNT-Pathway eine gewichtige Relevanz für die Proliferation und Differenzierung von Zellen [168], speziell im Endometrium scheint er an Wachstum und Entwicklung beteiligt zu sein [172]. WNT3a, das unter anderem an der Stabilisierung von β -Catenin beteiligt ist [136], wird auch bei der Kultivierung von Darm-Organoiden zur Wahrung des Stammzell-Charakters der Lgr5-positiven Zellen benötigt [35, 156].

Im Rahmen der Optimierung des Kulturnährmediums für die Endometrium-Organoiden zeigte sich jedoch ein deutlich besseres Wachstum, sobald auf eine exogene Zufuhr von WNT3a über konditioniertes Medium und eine Stabilisierung desselben durch in FBS enthaltenes Afamin [116] verzichtet wurde. Diese Beobachtung geht mit Erkenntnissen von Boretto et al. (2017) einher, die in einem Experiment feststellen konnten, dass, solange R-Spondin vorhanden ist, die Zugabe von WNT3a in das Nährmedium die Zahl der Endometrium-Organoiden pro Well sowie die mögliche Passagezahl gar verminderte [9]. Der Verzicht auf ein Serum-haltiges Nährmedium verhinderte zudem die Einflussnahme von Hormonen und anderen Molekülen, welche in unbekannter Menge in FBS vorliegen können, auf die Dezidualisierungsexperimente.

4.3 Wachstum der MRKHS-Organoide

Rall et al. (2013) konnten in einer Studie zeigen, dass das Endometrium in den Rudimenten von MRKHS-Patientinnen oftmals Basalis-artig imponiert [147]. Besonders die endometrialen Epithelzellen wiesen dabei auch in der Proliferationsphase des Zyklus eine signifikant verringerte Proliferationskapazität auf im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe [147]. Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war daher, ob die endometrialen Epithelzellen auch *in vitro* eine eingeschränkte Proliferation aufweisen würden.

In der Kultur zeigten die Epithelzellen der MRKHS-Patientinnen jedoch eine rasche Selbstorganisation zu Organoiden und eine adäquate Proliferation. Die Wachstumsgeschwindigkeit der MRKHS-Kulturen war nicht unterschiedlich zu der von Kontroll-Kulturen (vgl. Abb. 12 & 13) und auch bei hoher Passagezahl unverändert (s. Abb. 16). Im unstimulierten Zustand ergaben sich auch keine offensichtlichen Unterschiede bezüglich der Ki67-Expression zwischen MRKHS- und Kontroll-Organoiden (vgl. Abb. 28 & 29).

Die Epithelzellen waren dabei im Organoidmodell durch das Kulturmedium einer Reihe von Wachstumsfaktoren wie Epidermal Growth Factor (EGF) oder Fibroblast Growth Factor 10 (FGF10) ausgesetzt. Diese spielen *in vivo* eine wichtige Rolle bei der Proliferation des Endometriums und wurden auch in bereits beschriebenen Endometrium-Organoidmodellen ebenfalls als Bestandteil des Kulturmediums verwendet [173].

EGF wird in gesundem Endometrium exprimiert und fördert das Wachstum von Epithelzellen *in vitro* [71, 123]. Im Mausmodell konnte zudem nachgewiesen werden, dass EGF ein wichtiger Mediator der proliferationsfördernden Wirkung von Östrogen im Uterus darstellt [71, 122]. Auch FGF10, welches im Nährmedium enthalten war, wird im Mausmodell Östrogen-abhängig von endometrialen Stromazellen sezerniert und scheint so als parakriner Faktor ebenfalls essenziell für den Östrogen-induzierten Anstieg der Proliferationsaktivität im endometrialen Epithel zu sein [33]. Mithilfe u.a. dieser Wachstumsfaktoren war eine regelrechte Proliferation der Epithelzellen im Organoidmodell möglich.

Die artifizielle Situation mit exogener Zufuhr dieser Faktoren lässt jedoch nur eingeschränkte Rückschlüsse auf die *in vivo* Situation mit Interaktionen zwischen Epithel- und Stromazellen zu. So liegen unter anderem keine Erkenntnisse über das Vorhandensein der Wachstumsfaktoren im Endometrium von MRKHS-Patientinnen vor. In Anbetracht der von Brucker et al. (2017) beschriebenen möglichen gestörten Hormonrezeptorfunktion bei Stromazellen von MRKHS-Patientinnen, ist es nicht auszuschließen, dass auch eine verminderte Sekretion von Wachstumsfaktoren wie FGF10 über die wegfallende parakrine Wirkung mitverantwortlich sein könnte für die stark verminderte Proliferationskapazität der Epithelzellen in der Proliferationsphase des Zyklus [22, 24, 147]. Die intakte Proliferation der Epithelzellen *in vitro* macht zumindest einen intrinsischen Defekt der Proliferations-Pathways als Ursache unwahrscheinlich.

4.4 MRKHS-Organoid zeigen keine Hinweise auf eine gestörte Hormonrezeptorfunktion

Die Ergebnisse mehrerer Studien weisen auf eine lokoregionale Störung der Hormonrezeptorfunktion in den Uterus-Rudimenten von MRKHS-Patientinnen hin: Rall et al. (2011) konnten durch einen Transkriptom-Methylom-Ansatz zeigen, dass sowohl der Östrogen- als auch der Progesteronrezeptor in den Rudimenten von MRKHS-Patientinnen überexprimiert werden [146]. Dies wurde als möglicher positiver Feedback-Mechanismus aufgrund einer lokalen Störung der Hormonrezeptorfunktion gedeutet [146]. Diese quantitativen Expressionsunterschiede der Rezeptoren konnten Rall et al. (2013) in einer Folgestudie an Gewebeschnitten zwar nicht bestätigen, fanden aber heraus, dass das Endometrium von MRKHS-Patientinnen meist einen Basalis-artigen Phänotyp und eine stark verminderte Proliferationskapazität aufweist [147]. Der fehlende Anstieg der Proliferationskapazität in der Proliferationsphase des Zyklus kann dabei als weiteres Indiz für eine gestörte Funktionsweise der Hormonrezeptoren gedeutet werden [147]. Schließlich konnten Brucker et al. (2017) in ihrer Studie an endometrialen Stromazellen nachweisen, dass ESC von MRKHS-Patientinnen eine inadäquate Reaktion auf eine *in vitro* Stimulation mit Östrogen und Progesteron demonstrieren [22]. Die wichtige Rolle des Östrogenrezeptors für die regelrechte Entwicklung des weiblichen Genitaltraktes wurde auch bereits im Mausmodell bestätigt, wobei ein Knock-out von ER α zu einem dem MRKH-Syndrom ähnlichen Phänotyp mit hypoplastischem Uterus und Scheide führt [40, 112].

ER α scheint dabei während der Entwicklung entscheidend für das segmentale Expressionsmuster der HOX-Gene zu sein [45]. So führt die Exposition weiblicher Embryos *in utero* mit Diethylstilbestrol (DES), einem synthetischen nichtsteroidalen Estrogen, zu verschiedenen uterinen Malformationen wie einem T-förmigen hypoplastischen Uterus [45, 72]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass DES zu einer Verschiebung des Expressionsmusters der HOX-Gene im weiblichen Genitaltrakt nach posterior führt [45]. So wird HOXA9 nicht länger in der Tube sondern im Uterus exprimiert, die Expression von HOXA10 im kranialen Teil der Gebärmutter ist stark vermindert und nur im kaudalen Anteil

normal vorhanden [45]. Hingegen wurde bei Mäusen mit einem selektiven Knockout von ER α und DES-Exposition keine Verschiebung des HOX-Expressionsmuster festgestellt [41], was den Einfluss des Rezeptors auf die Regulation dieser für die Entwicklung des weiblichen Reproduktionstraktes wichtigen Gene unterstreicht.

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war neben der Etablierung des Organoidmodells daher die Überprüfung der Hormonrezeptorfunktion in den endometrialen Epithelzellen von MRKHS-Patientinnen. Hierzu wurden die Organoidkulturen einem von Turco et al. (2017) adaptierten Stimulationsprotokoll über eine Passagedauer von acht Tagen unterzogen [173]. Dabei wurden ausschließlich Organoidkulturen verwendet, die bereits für mindestens fünf Passagen kultiviert wurden, um eine Beeinflussung durch unterschiedliche Hormonlevel und Zyklusphasen bei Entnahme des Gewebes zu vermeiden. Das Ansprechen der Organoid sollte mittels qPCR über das Expressionsverhalten von Markergenen wie PAEP oder SOX9 evaluiert und mit Kontrollkulturen verglichen werden.

4.4.1 Vergleich der Expressionsveränderung von Markergenen für MRKHS- und Kontroll-Kulturen

Für die Evaluation der Funktionalität der Hormonrezeptoren für Östrogen und Progesteron wurde die Expression mehrerer Markergene (bspw. PAEP, 17HSD, MUC1) mittels qPCR untersucht, die in normalem Endometrium ein zyklusabhängiges Expressionsverhalten aufweisen [160, 166, 173]. Für Mucin 1 konnte hierbei sowohl in MRKHS- als auch in Kontroll-Organoiden keine signifikante Expressionsveränderung durch Stimulation mit Östrogen und Progesteron erreicht werden. Dabei zeigten alle Kulturen bereits im unstimulierten Zustand eine hohe Basis-Expression von Mucin 1. Auch Turco et al. (2017) konnten an unstimulierten Endometrium-Organoiden eine starke Expression von Mucin 1 immunhistochemisch nachweisen [173].

PAEP und 17HSD, zwei Marker der frühen sekretorischen Zyklusphase [160, 166], zeigten in nahezu allen MRKHS-Kulturen (5/5 und 4/5) eine Steigerung des Expressionslevels nach hormoneller Stimulation (s. Abb. 22 & 23). Für

Osteopontin (SPP1), dessen Expression ebenfalls in diese Zyklusphase fällt [166], war dies nur bei einer von fünf Kulturen der Fall (s. Abb. 24).

Auffällig hierbei war ein starker Expressionsanstieg von 17HSD auf das 226-fache für die Linie MRKHS 17, der deutlich über den Werten der anderen MRKHS- und Kontrollkulturen lag. MRKHS 17 zeigte dabei im unstimulierten Zustand eine sehr niedrige relative Expression von 17HSD im Vergleich zum HKG (s. Tab. 16). MRKHS 17 ist die einzige Linie, welche vor der Entnahme der Rudimente eine Hormoneinnahme seitens der Patientin aufzeigte. Zwar erfolgte das Dezidualisierungsexperiment erst in Passage 8 der Kultur, was eine Beeinflussung durch Hormonlevel bei Entnahme des Gewebes unwahrscheinlich macht, dennoch kann eine selbige nicht ausgeschlossen werden. Die Expressionsveränderungen der anderen untersuchten Gene zeigten jedoch Werte, die mit den anderen MRKHS-Kulturen vergleichbar waren.

SOX9 gilt als ein Marker für adulte Vorläuferzellen und markiert in der Leber eine Zellpopulation, die für die Regeneration nach hepatischen Schäden verantwortlich ist [66]. Valentijn et al. (2013) konnten auch im endometrialen Epithel der Basalis eine SOX9+-Zellpopulation ausfindig machen, wobei eine Subpopulation auch β -Catenin nukleär exprimierte als Zeichen eines eventuell aktiven WNT-Signalweges [175]. In allen MRKHS-Organoidkulturen führte die hormonelle Stimulation zu einem Rückgang der Expression von SOX9 (s. Abb. 25), was für eine fortschreitende Differenzierung der Zellen unter hormonellem Einfluss spricht.

Die Hochregulation von PAEP und 17HSD, sowie die Herunterregulation von SOX9 in den MRKHS-Kulturen, welche vergleichbar und teilweise sogar stärker ausgeprägt als bei Kontroll-Kulturen stattfand, ist als deutliches Indiz für eine intakte Funktion der Hormonrezeptoren in den MRKHS-Organoiden zu werten. Des Weiteren ergab sich bei Stimulation mit Östrogen die gleiche breite Hochregulation des Progesteronrezeptors in den MRKHS-Organoiden wie bei Kontroll-Organoiden, was immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 28 & 29).

Sowohl für MRKHS- als auch für Kontroll-Kulturen sind bei Analyse der Expressionsveränderungen mehrerer Gene durch die hormonelle Stimulation teils nur geringe Unterschiede für die P4-Gruppe im Vergleich zur Stimulation mit Östrogen allein aufgefallen. Als mögliche Ursachen hierfür wurde entweder eine unzureichende Wirkung des Progesterons ausgemacht, das für die Experimente verwendet wurde, oder eine zu kurze Stimulationsdauer der Organoiden mit Progesteron. Um ersteres auszuschließen, wurde die Wirksamkeit des verwendeten Progesterons an HESC mit einem standardisierten Protokoll überprüft und mit der von Medroxyprogesteronacetat verglichen (s. Kapitel 3.4.6). Hierbei konnte die Wirksamkeit des eingesetzten Progesterons erfolgreich bestätigt werden, was die Stimulationsdauer mit Progesteron von nur 48 Stunden als wahrscheinlichste Ursache für die teilweise geringen Unterschiede zur E2-Gruppe erscheinen lässt. Dies wurde bei späteren Experimenten der Arbeitsgruppe, die nicht Inhalt dieser Arbeit sind, berücksichtigt und die Stimulationsdauer mit Progesteron entsprechend auf sechs Tage ausgedehnt.

4.4.2 Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit früheren Erkenntnissen zu MRKHS-Stromazellen

Unter physiologischen Umständen binden die Sexualhormone Progesteron und Östrogen beide nach Diffusion in die Zelle an ihre im Zytoplasma vorliegenden Rezeptoren PR-A und PR-B, bzw. ER α und ER β . Bei erfolgreicher Bindung der Hormone kommt es zur Rezeptordimerisierung und -translokation des Komplexes in den Nukleus [77]. Durch Bindung an spezifische Stellen im Genom mithilfe weiterer Cofaktoren können sie so die Transkription ihrer Zielgene verändern.

Zusammen mit einem Anstieg der cAMP-Konzentration führt Progesteron in der Mitte der sekretorischen Zyklusphase zu einer Umwandlung der mesenchymalen, endometrialen Stromazellen in größere Deziduazellen [68]. Auch das uterine Epithel durchläuft diverse Veränderungen, um es auf den Kontakt mit einem möglichen Embryo vorzubereiten [77, 190]. Mehrere Publikationen weisen auf mögliche Veränderungen oder Beeinträchtigungen dieser physiologischen Abläufe bei MRKHS-Patientinnen hin [22, 146, 147].

Zuletzt konnten Brucker et al. (2017) in einer Studie eine beeinträchtigte Deidualisierung bei endometrialen Stromazellen von MRKHS-Patientinnen nachweisen [22]. Dabei erfolgte wie auch in dieser Arbeit eine indirekte Bewertung der Hormonrezeptorfunktion anhand der veränderten Expression von Markergenen auf RNA- bzw. Protein-Ebene. Aufgrund der indirekten Überprüfung der Rezeptorfunktion konnten Brucker et al. (2017) jedoch auch nachgeschaltete Prozesse als Ursache für die beobachteten Störungen in Stromazellen nicht sicher ausschließen [22].

In dieser Arbeit ergeben sich hingegen aus den in der qPCR untersuchten Markergenen, den immunhistochemischen Färbungen und den beobachteten vergleichbaren morphologischen Veränderungen der Organoide zusammenfassend keine konkreten Hinweise auf eine gestörte Funktion der Hormonrezeptoren in den endometrialen Epithelzellen von MRKHS-Patientinnen.

Aus embryologischer Sicht entstammt das Endometrium wie der restliche weibliche Genitaltrakt dem intermediären Mesoderm [78, 98, 120]. Ein Teil der diesem zugehörigen mesenchymalen Zellen vollzieht früh in der Entwicklung eine Wandlung zu einem epithelialen Zellcharakter [98]. Diese Zellen bilden in der Folge die Gangsysteme, aus denen sich der männliche und weibliche Urogenitaltrakt entwickelt [98]. Das spätere endometriale Epithel scheint dabei dem fetalen Epithel der Müllerschen Gänge zu entspringen, wohingegen das endometriale Stroma primär dem Mesenchym entstammt, das die Müllerschen Gänge umgibt [44, 98, 102, 117]. Die schon früh in der Entwicklung stattfindende Auftrennung dieser beiden Zellpopulation lässt daher nicht sicher ausschließen, dass die von Brucker et al. (2017) beschriebene gestörte Hormonrezeptorfunktion ein speziell die Stromazellen betreffender Defekt ist, von dem zumindest die endometrialen Epithelzellen nicht direkt betroffen zu sein scheinen.

Allerdings zeigen endometriale Epithel- und Stromazellen *in vivo* eine mittlerweile immer besser verstandene Kommunikation, die unerlässlich für zahlreiche Funktionen des Endometriums ist, wie beispielsweise die erfolgreiche

Implantation eines Fötus [77]. Stromazellen scheinen über parakrine Mechanismen für viele Effekte der Steroidhormone Östrogen und Progesteron auf die Epithelzellen des Endometriums verantwortlich zu sein. So vermitteln sie unter anderem auch die proliferationssteigernde Wirkung von Östrogen auf die Epithelzellen, wie Cooke et al. (1997) an einem Knockout-Mausmodell zeigen konnten [39, 77, 101]. Hierbei führte das selektive Ausschalten des Östrogen-Rezeptors in den Epithelzellen des Endometriums zu einer erhaltenen Proliferationssteigerung derselben bei Stimulation mit Östrogen. Hingegen führte ein Knockout des Östrogen-Rezeptors in den umliegenden Stroma-Zellen zu einem Verlust der proliferationssteigernden Wirkung von Östrogen am Epithel [39]. Angesichts dieser maßgeblichen gegenseitigen Beeinflussung erlaubt eine isolierte *in vitro* Betrachtung der einzelnen Zelltypen nur beschränkte Rückschlüsse auf die *in vivo* Situation, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss.

Um diese Problematik zu umgehen, könnten Ko-Kultur-Experimente mit Integration beider Zelltypen in Zukunft eine erstrebenswerte Lösung für diese beschränkten Rückschlüsse darstellen. Die in dieser Arbeit etablierten MRKHS-Organoidkulturen beherbergen das große Potential, einem solchen Experiment als funktionelles Modell zu dienen. Über Zellkultureinsätze mit feinen Poren, welche im selben Well wie die Organoide platziert werden, wäre es möglich, MRKHS-Organoide zusammen mit Stromazellen zu kultivieren. Das gemeinsame Medium würde durch parakrin wirkende Faktoren eine erhaltene Kommunikation zwischen beiden Zelltypen ermöglichen. Hierbei könnten sowohl MRKHS-ESCs als auch ESCs gesunder Kontrollen verwendet werden, um die Einflüsse der einzelnen Zelltypen genau zu definieren. Ein derartiger Ansatz könnte in Zukunft weitere neue Erkenntnisse über die funktionellen Eigenschaften des Endometriums bei Patientinnen mit Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-Syndrom erlauben.

4.5 Uterus-Rudimente und mögliche Unterschiede zwischen MRKHS-Subtypen

Als einer der ersten und größten Analysen auf diesem Gebiet wurden im Rahmen dieser Arbeit über 300 MRKHS-Patientinnen hinsichtlich der Frequenz von Uterus-Rudimenten sowie möglicher Zusammenhänge mit assoziierten Fehlbildungen untersucht. Die folgenden Absätze dieses Kapitels wurden bereits im „Journal of Clinical Medicine“ [140] veröffentlicht:

„68.1% der Patientinnen, deren Operationsberichte in Kapitel 3.5 analysiert wurden, wiesen bilaterale Uterus-Rudimente in situ auf. 17.4% der Patientinnen hatten ein unilaterales Rudiment und 14.5% zeigten eine komplette Agenesie des Uterus. Ähnliche Zahlen wurden in einer Studie von Oppelt et al. (2006) berichtet, wobei dort 23% der MRKHS-Patientinnen eine Uterus-Agenesie aufwiesen, 4% ein einseitiges Uterus-Rudiment und 74% bilaterale Uterus-Rudimente [126]. Pompili et al. (2009) konnten eine Uterus-Aplasie in 4.9%, ein unilaterales Rudiment in 19.5% sowie beidseitige Uterus-Rudimente bei 75.6% ihrer MRKHS-Patientinnen laparoskopisch nachweisen [142]. Eine weitere Studie von Wang et al. (2017), welche MRT-Bilder von MRKHS-Patientinnen analysierte, fand eine Uterus-Aplasie bei 22%, ein unilaterales Rudiment bei 10% sowie bilaterale Uterus-Rudimente bei 68% der untersuchten Fälle [182].

Pan et al. (2016) untersuchten eine große chinesische MRKHS-Patientenkohorte, wobei die VCUAM Klassifikation genutzt wurde, um den genauen genitalen Fehlbildungstyp der jeweiligen Patientin zu beschreiben. Hierbei wurden 585 von 594 untersuchten Patientinnen hinsichtlich des Uterus als Gruppe 4b klassifiziert, was einem bilateral nur rudimentär vorhandenen oder aplastischen Uterus entspricht [133]. Gleichzeitig zeigte die Kohorte von Pan et al. (2016) eine deutlich niedrigere Rate an MRKHS-Patientinnen mit assoziierten Fehlbildungen als dies bisher in europäischen Patienten-Kohorten der Fall war (43.5 – 53.0%) [82, 126, 128, 149]. Lediglich 43 von 594 Patientinnen (7.2%) wiesen assoziierte Malformationen auf, wobei renale Fehlbildungen am häufigsten waren [133]. Leider erlaubt die VCUAM Klassifikation keine Differenzierung zwischen bilateralen Uterus-Rudimenten oder einem aplastischen Uterus, weshalb der genaue Prozentsatz an Patientinnen mit

bilateralen Rudimenten in dieser chinesischen Kohorte unklar bleibt. Daher lassen sich ebenfalls keine Rückschlüsse ziehen, ob die deutlich niedrigere Rate an Patientinnen mit assoziierten Fehlbildungen in dieser Kohorte von einer ebenfalls unterschiedlichen Rate an Uterus-Rudimenten begleitet wurde.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Uterus-Rudimente wiesen eine durchschnittliche Größe von 7.9 cm³ im Rahmen der pathologischen Beurteilung auf. Insgesamt gibt es bisher nur wenig publizierte Angaben hinsichtlich der Größe von Uterus-Rudimenten bei MRKHS-Patientinnen, vorwiegend im Rahmen von MRT-Studien. Hall-Craggs et al. (2013) analysierten 115 Uterus-Rudimente im Rahmen von MRT-Bildgebungen, wobei sich ein durchschnittliches Volumen von 6.4 cm³ zeigte [76].

Assoziierte Nierenfehlbildungen, insbesondere eine unilaterale Nierenagenesie, hatten einen deutlichen Effekt auf die Häufigkeit von Uterus-Rudimenten in unseren Patientinnen. 57.8% der Patientinnen mit Nierenagenesie hatten lediglich ein unilaterales Uterus-Rudiment, wobei sich dieses in 96.2% auf der kontralateralen Seite zur fehlenden Niere zeigte. Eine vergleichbare Quote fanden Preibsch et al. (2014) im Rahmen einer MRT-Analyse von 110 MRKHS-Patientinnen, die sich zwischen 2002 und 2012 am Department für Frauengesundheit Tübingen vorgestellt hatten. Hierbei wiesen 57% der Patientinnen mit unilateraler Nierenagenesie ein einseitiges Uterus-Rudiment auf, welches sich in 83% der Fälle auf der Seite der intakten Niere zeigte [144]. Patientinnen mit assoziierten Nierenfehlbildungen wiesen zudem die niedrigste Häufigkeit an Endometrium der in Kapitel 3.5 analysierten Kohorte auf (22.2%).

Der Wolff-Gang (Ductus mesonephricus) ist für eine regelrechte Entwicklung der Nieren notwendig, indem er die Ureter-Knospen formiert, welche in der Folge in Kontakt mit dem umliegenden Mesenchym des Metanephros treten [115]. Gleichzeitig spielt er auch eine wichtige Rolle in der kaudalen Elongation der Müller-Gänge, unter anderem durch die Wirkung von WNT9b (siehe hierzu Kapitel 1.1) [27, 98]. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass der für die Nierenagenesie ursächliche Mechanismus in unseren Patientinnen auch die kaudale Elongation des Müller-Ganges mit beeinträchtigte. Dies könnte zu einem

noch früheren Entwicklungsstopp als üblich beim MRKH-Syndrom geführt haben, ohne Formierung eines Uterus-Rudimentes auf der betroffenen Seite.

Insgesamt zeigten 40.8% aller MKRHS-Patientinnen, deren Rudimente analysiert wurden, endometriales Gewebe in ihren Uterus-Rudimenten während der histopathologischen Begutachtung. Eine frühere Analyse von Rall et al. (2013) zeigte eine vergleichbare Rate, wobei Endometrium in 45.2% der untersuchten MRKHS-Patientinnen gefunden wurde [147]. Größere Rudimente wiesen eine höhere Wahrscheinlichkeit für enthaltenes endometriales Gewebe in dieser Arbeit auf, womöglich aufgrund einer weiter fortgeschrittenen uterinen Entwicklung bei diesen Patientinnen. Jedoch scheint das Vorhandensein von Endometrium nicht der einzige ursächliche Faktor für die zyklusabhängigen Unterbauchschmerzen zu sein, von denen viele Patientinnen berichten. Da kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit von Endometrium bei asymptomatischen Patientinnen (44.0%) im Vergleich zu Patientinnen mit regelmäßigen zyklischen Unterbauchschmerzen (37.1%) zu finden war, müssen andere Faktoren wie Endometriose oder Mittelschmerzen dringend ebenfalls bedacht werden.“

4.6 Konklusion, Limitationen und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Endometrium-Organoiden aus dem Gewebe von MRKHS-Patientinnen etabliert werden, die als funktionelles Modell neue Möglichkeiten für die Erforschung des MRKH-Syndroms eröffnen. Dabei zeigten die in den Organoiden vorhandenen Epithelzellen isoliert betrachtet keine Hinweise auf eine Störung der Hormonrezeptoren bzw. ihrer nachgeschalteten Pathways. Um eine noch genauere Annäherung an die *in vivo* Verhältnisse zu schaffen und das Zusammenspiel von Epithel- und Stromazellen bei MRKHS genauer zu beleuchten, könnten Ko-Kultur-Experimente beider Zelltypen in Zukunft einen weiteren Forschungsansatz bieten.

Die geringe Inzidenz des MRKH-Syndroms, die Invasivität der Probengewinnung sowie die begrenzte Häufigkeit von makroskopischem Endometrium in den Uterus-Rudimenten (4 von 18 Patientinnen bzw. 36 untersuchten Rudimenten) bedingten eine kleine Studienpopulation in dieser Arbeit, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss. Die Etablierung weiterer Organoid-Modelle und Überprüfung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wäre daher in Zukunft sinnvoll.

Im Rahmen der Dezidualisierungsexperimente muss auch bedacht werden, dass nur die Expressionsveränderungen selektiv ausgewählter Marker-Gene in der qPCR untersucht wurden. Es lässt sich daher nicht mit Sicherheit ausschließen, dass sich für andere Gene ein unterschiedliches Expressionsverhalten zwischen MRKHS- und Kontroll-Organoiden nach hormoneller Stimulation zeigen könnte. Um diesem Ansatz nachzugehen und einen breiteren Überblick über die hormonell-bedingten genetischen Veränderungen zu erlangen, wurde als nächster Schritt in unserer Arbeitsgruppe bereits eine RNA-Sequenzierungsanalyse an MRKHS-Organoiden im Vergleich zu Kontroll-Organoiden vorgenommen.

Die Analyse einer großen MRKHS-Patientenkohorte hinsichtlich der Frequenz von Uterus-Rudimenten und deren Charakteristika konnte eine klare Heterogenität zwischen MRKHS Typ I und II aufzeigen. Einige Variablen wie der MRKHS-Subtyp oder bestimmte assoziierte Fehlbildungen scheinen einen Einfluss auf die Häufigkeit von Uterus-Rudimenten, deren Größe sowie die

Frequenz von endometrialen Gewebe zu haben. Dies unterstreicht die Notwendigkeit zukünftiger Forschung hinsichtlich der zugrunde liegenden molekularen Signalwege sowie potenzieller Unterschiede zwischen MRKHS-Subtypen. Hierbei muss bedacht werden, dass es sich um Daten aus einem einzelnen Zentrum mit Patientinnen aus vorwiegend Zentraleuropa handelt, was gerade angesichts möglicher geographischer Unterschiede zwischen Patientenkohorten bei der Interpretation bedacht werden muss. Zudem könnte der Prozentsatz an endometrialen Gewebe in dieser Arbeit die wirkliche Häufigkeit des Endometriums unterschätzen aufgrund von zufälligen Probenentnahmen während der histopathologischen Aufarbeitung oder aufgrund von vorausgehenden Probenentnahmen aus den Rudimenten für Forschungszwecke wie der Etablierung von Organoidkulturen.

Mit der in Kapitel 1.3.2 beschriebenen Möglichkeit der Uterus-Transplantation steht Patientinnen mit MRKH-Syndrom erstmalig eine Form der kurativen Therapie zur Verfügung. Während der klinische Einfluss der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse für die Behandlung von MRKHS-Patientinnen zunächst nebensächlich erscheint, ist es unklar, was die Zukunft mit sich bringen wird. Erste Versuche von Boretto et al. (2017) konnten bereits zeigen, dass Organoide aus Maus-Endometrium auch bei Re-Implantation in das Maus-Modell überlebensfähig sind und bei Behandlung mit Östrogen und Progesteron proliferieren [9]. Es erscheint daher nicht unmöglich, dass sich auch aus Organoiden eines Tages eine Therapie-Option für Patientinnen mit MRKH-Syndrom ergeben könnte.

5 Zusammenfassung

Das Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-Syndrom bezeichnet die ab der frühen Embryonalphase bestehende Aplasie von Uterus und Vagina durch eine ausbleibende Verschmelzung der Müllerschen Gänge. Trotz ausgiebiger Forschung konnte bisher für den Großteil der Patientinnen keine Ursache identifiziert werden. Verschiedene Studien weisen jedoch auf eine gestörte Funktion der Hormonrezeptoren im betroffenen Gewebe hin. So zeigt das Endometrium in Gewebeschnitten eine deutlich eingeschränkte Proliferationskapazität und endometriale Stromazellen in Zellkulturexperimenten eine inadäquate Reaktion auf hormonelle Stimulation. Unklar ist jedoch, inwiefern dies auch auf das endometriale Epithel zutrifft. Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung von Zellkultur-Modellen, um die Eigenschaften und das Verhalten des endometrialen Epithels bei MRKHS-Patientinnen zu untersuchen.

Hierfür wurden drei-dimensionale Organoid-Modelle aus dem Endometrium von MRKHS-Patientinnen und Kontroll-Patientinnen etabliert, die das endometriale Epithel der jeweiligen Patientin repräsentieren. Protokolle zur Verarbeitung und Erhaltung der Organoid-Kulturen wurden entwickelt und etabliert. Im Rahmen von Dezidualisierungsexperimenten wurden die Organoid-Kulturen mit Östrogen und Progesteron stimuliert und anschließend das Ansprechen über Expressionsveränderungen von Markergenen wie PAEP mittels qPCR evaluiert. Über Färbungen verschiedener Marker erfolgte zudem eine Charakterisierung der MRKHS-Organoide im Vergleich zu Organoiden von Kontroll-Patientinnen.

In der Kultur zeigten die MRKHS-Organoide eine regelrechte Proliferation und lichtmikroskopisch keine Unterschiede zu den Kontroll-Organoide. Die hormonelle Stimulation führte zu vergleichbaren morphologischen Veränderungen, adäquaten Expressionsveränderungen von Marker-Genen sowie Hochregulation von ERa und PR in den immunhistochemischen Färbungen. Zusammenfassend ergaben sich daher im Organoid-Modell keine Hinweise auf eine gestörte Hormonrezeptorfunktion der endometrialen Epithelzellen bei MRKHS-Patientinnen.

Dies könnte auf einen alleinigen Defekt der endometrialen Stromazellen hindeuten oder aber der isolierten Kultivierung beider Zelltypen geschuldet sein, die normalerweise *in vivo* eine enge Kommunikation hegen. Zukünftig wird unser Organoid-Modell auch durch mögliche Ko-Kultur-Experimente neue Möglichkeiten für die MRKHS-Forschung eröffnen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war der Gewinn neuer Erkenntnisse über die Eigenschaften und Zusammensetzung der Uterus-Rudimente von MRKHS-Patientinnen, unter anderem hinsichtlich möglicher Zusammenhänge mit assoziierten Fehlbildungen. Hierfür erfolgte die Auswertung von OP- und Pathologie-Berichten einer großen Kohorte von MRKHS-Patientinnen, die an unserer Klinik operiert wurden.

Hierbei zeigte sich eine klare Heterogenität zwischen MRKHS Typ I und II auf. Variablen wie der MRKHS-Subtyp oder assoziierte Malformationen waren sowohl mit einer unterschiedlichen Häufigkeit von Uterus-Rudimenten als auch mit einer unterschiedlichen Rudiment-Größe sowie Frequenz von Endometrium assoziiert. Dies unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Forschung hinsichtlich der zugrunde liegenden molekularen Pathways sowie möglicher Unterschiede zwischen MRKHS-Subtypen.

6 Literaturverzeichnis

1. Aittomaki, K., H. Eroila, and P. Kajanoja, *A population-based study of the incidence of mullerian aplasia in Finland*. *Fertility and Sterility*, 2001. **76**(3): p. 624-625.
2. Arora, K.S. and V. Blake, *Uterus transplantation: ethical and regulatory challenges*. *Journal of Medical Ethics*, 2014. **40**(6): p. 396-400.
3. Barker, N., et al., *Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5*. *Nature*, 2007. **449**(7165): p. 1003-7.
4. Barker, N., et al., *Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro*. *Cell Stem Cell*, 2010. **6**(1): p. 25-36.
5. Bartfeld, S., et al., *In Vitro Expansion of Human Gastric Epithelial Stem Cells and Their Responses to Bacterial Infection*. *Gastroenterology*, 2015. **148**(1): p. 126-U554.
6. Behera, M., et al., *Mullerian agenesis and thrombocytopenia absent radius syndrome: a case report and review of syndromes associated with Mullerian agenesis*. *Obstet Gynecol Surv*, 2005. **60**(7): p. 453-61.
7. Bernardini, L., et al., *Recurrent microdeletion at 17q12 as a cause of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome: two case reports*. *Orphanet J Rare Dis*, 2009. **4**: p. 25.
8. Biason-Lauber, A., et al., *A WNT4 mutation associated with Mullerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(8): p. 792-8.
9. Boretto, M., et al., *Development of organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability*. *Development*, 2017. **144**(10): p. 1775-1786.
10. Boretto, M., et al., *Patient-derived organoids from endometrial disease capture clinical heterogeneity and are amenable to drug screening*. *Nature Cell Biology*, 2019. **21**(8): p. 1041-+.
11. Brännström, M., et al., *Uterus transplantation: animal research and human possibilities*. *Fertility and Sterility*, 2012. **97**(6): p. 1269-1276.
12. Brännström, M., et al., *First clinical uterus transplantation trial: a six-month report*. *Fertility and Sterility*, 2014. **101**(5): p. 1228-1236.
13. Brännström, M., et al., *Livebirth after uterus transplantation*. *The Lancet*, 2015. **385**(9968): p. 607-616.
14. Brännström, M., et al., *One uterus bridging three generations: first live birth after mother-to-daughter uterus transplantation*. *Fertility and Sterility*, 2016. **106**(2): p. 261-266.
15. Brännström, M., *Uterus transplantation and beyond*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2017. **28**(5).
16. Brännström, M., et al., *Registry of the International Society of Uterus Transplantation: First Report*. *Transplantation*, 2022. **107**(1): p. 10-17.
17. Brännström, M., et al., *Uterus transplantation: from research, through human trials and into the future*. *Human Reproduction Update*, 2023. **29**(5): p. 521-544.
18. Brindeau, A., *Création d'un vagin artificiel à l'aide des membranes ovulaires d'un oeuf à terme*. *Gynecol Obstet*, 1934. **29**: p. 385.

19. Brucker, S., J. Bungartz, and K. Rall, *Allgemeine Gynäkologie. Die 3 A (Asymptomatisch, Amenorrhö, Aplasie) der Vaginalaplasie – kein differenzialdiagnostisches Chamäleon*. Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 2009. **69**(06): p. 568-575.
20. Brucker, S.Y., et al., *Neovagina creation in vaginal agenesis: development of a new laparoscopic Vecchietti-based procedure and optimized instruments in a prospective comparative interventional study in 101 patients*. Fertility and Sterility, 2008. **90**(5): p. 1940-1952.
21. Brucker, S.Y., et al., *Selecting living donors for uterus transplantation: lessons learned from two transplantations resulting in menstrual functionality and another attempt, aborted after organ retrieval*. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2017. **297**(3): p. 675-684.
22. Brucker, S.Y., et al., *Decidualization is Impaired in Endometrial Stromal Cells from Uterine Rudiments in Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser Syndrome*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017. **41**(3): p. 1083-1097.
23. Brucker, S.Y., et al., *Sequence variants in ESR1 and OXTR are associated with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome*. Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica, 2017. **96**(11): p. 1338-1346.
24. Brucker, S.Y., et al., *Endometrial organoids derived from Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome patients provide insights into disease-causing pathways*. Dis Model Mech, 2022. **15**(5).
25. Burel, A., et al., *Role of HOXA7 to HOXA13 and PBX1 genes in various forms of MRKH syndrome (congenital absence of uterus and vagina)*. J Negat Results Biomed, 2006. **5**: p. 4.
26. Callens, N., et al., *An update on surgical and non-surgical treatments for vaginal hypoplasia*. Human Reproduction Update, 2014. **20**(5): p. 775-801.
27. Carroll, T.J., et al., *Wnt9b Plays a Central Role in the Regulation of Mesenchymal to Epithelial Transitions Underlying Organogenesis of the Mammalian Urogenital System*. Developmental Cell, 2005. **9**(2): p. 283-292.
28. Carson, S.A., et al., *Heritable aspects of uterine anomalies. II. Genetic analysis of Mullerian aplasia*. Fertil Steril, 1983. **40**(1): p. 86-90.
29. Chan, Y.Y., et al., *The prevalence of congenital uterine anomalies in unselected and high-risk populations: a systematic review*. Hum Reprod Update, 2011. **17**(6): p. 761-71.
30. Cheikhelard, A., et al., *Surgery is not superior to dilation for the management of vaginal agenesis in Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: a multicenter comparative observational study in 131 patients*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2018. **219**(3): p. 281.e1-281.e9.
31. Chen, Y.T., D.R. Mattison, and L. Feigenbaum, *Reduction in Oocyte Number Following Prenatal Exposure to a Diet High in Galactose*. Science, 1981. **214**(4525): p. 1145-1147.
32. Chmel, R., et al., *The Interest of Women with Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser Syndrome and Laparoscopic Vecchietti Neovagina in*

- Uterus Transplantation*. Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology, 2018. **31**(5): p. 480-484.
33. Chung, D., et al., *Estrogen mediated epithelial proliferation in the uterus is directed by stromal Fgf10 and Bmp8a*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2015. **400**: p. 48-60.
 34. Clement-Ziza, M., et al., *Exclusion of WNT4 as a major gene in Rokitansky-Kuster-Hauser anomaly*. American Journal of Medical Genetics Part A, 2005. **137a**(1): p. 98-99.
 35. Clevers, H. and R. Nusse, *Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease*. Cell, 2012. **149**(6): p. 1192-1205.
 36. Clevers, H., K.M. Loh, and R. Nusse, *Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control*. Science, 2014. **346**(6205): p. 1248012.
 37. Clevers, H., *Modeling Development and Disease with Organoids*. Cell, 2016. **165**(7): p. 1586-1597.
 38. Comm, A., *Mullerian Agenesis: Diagnosis, Management, and Treatment (vol 121, pg 1134, 2013)*. Obstetrics and Gynecology, 2018. **131**(1): p. 185-185.
 39. Cooke, P.S., et al., *Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(12): p. 6535-6540.
 40. Couse, J.F. and K.S. Korach, *Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?* Endocr Rev, 1999. **20**(3): p. 358-417.
 41. Couse, J.F., et al., *Estrogen Receptor- α Knockout Mice Exhibit Resistance to the Developmental Effects of Neonatal Diethylstilbestrol Exposure on the Female Reproductive Tract*. Developmental Biology, 2001. **238**(2): p. 224-238.
 42. Cramer, D.W., et al., *Vaginal agenesis (Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome) associated with the N314D mutation of galactose-1-phosphate uridylyl transferase (GALT)*. Mol Hum Reprod, 1996. **2**(3): p. 145-8.
 43. Cremers, C.W., E.H. Strubbe, and W.N. Willemsen, *Stapedial ankylosis in the Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1995. **121**(7): p. 800-3.
 44. Cunha, G.R., et al., *Development of the human female reproductive tract*. Differentiation, 2018. **103**: p. 46-65.
 45. Daftary, G.S. and H.S. Taylor, *Endocrine Regulation of HOX Genes*. Endocrine Reviews, 2006. **27**(4): p. 331-355.
 46. Dahm-Kähler, P., et al., *Transplantation of the uterus in sheep: Methodology and early reperfusion events*. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 2008. **34**(5): p. 784-793.
 47. Drost, J., et al., *Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue*. Nature Protocols, 2016. **11**(2): p. 347-358.
 48. Drummond, J.B., et al., *Molecular analysis of the WNT4 gene in 6 patients with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome*. Fertility and Sterility, 2008. **90**(3): p. 857-859.

49. Du, H.L. and H.S. Taylor, *Molecular regulation of Mullerian development by Hox genes*. Uterus and Human Reproduction, 2004. **1034**: p. 152-165.
50. Duncan, P.A., et al., *The MURCS association: Mullerian duct aplasia, renal aplasia, and cervicothoracic somite dysplasia*. J Pediatr, 1979. **95**(3): p. 399-402.
51. Duru, U.A. and M.R. Laufer, *Discordance in Mayer-von Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome noted between monozygotic twins*. Fertility and Sterility, 2006. **86**: p. S309-S309.
52. Ejzenberg, D., et al., *Livebirth after uterus transplantation from a deceased donor in a recipient with uterine infertility*. Lancet, 2019. **392**(10165): p. 2697-2704.
53. Ekici, A.B., et al., *HOXA10 and HOXA13 sequence variations in human female genital malformations including congenital absence of the uterus and vagina*. Gene, 2013. **518**(2): p. 267-272.
54. El-Akouri, R.R., et al., *Heterotopic uterine transplantation by vascular anastomosis in the mouse*. Journal of Endocrinology, 2002. **174**(2).
55. Emiroglu, M., et al., *Vaginal Reconstruction with Free Jejunal Flap*. Annals of Plastic Surgery, 1996. **36**(3): p. 316-320.
56. Enskog, A., et al., *Uterus transplantation in the baboon: methodology and long-term function after auto-transplantation*. Human Reproduction, 2010. **25**(8): p. 1980-1987.
57. Erman Akar, M., et al., *Clinical pregnancy after uterus transplantation*. Fertility and Sterility, 2013. **100**(5): p. 1358-1363.
58. Evron, A., S. Goldman, and E. Shalev, *Effect of primary human endometrial stromal cells on epithelial cell receptivity and protein expression is dependent on menstrual cycle stage*. Human Reproduction, 2010. **26**(1): p. 176-190.
59. Fageeh, W., et al., *Transplantation of the human uterus*. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2002. **76**(3): p. 245-251.
60. Fakhri, M.H., et al., *Concurrence of the Holt-Oram syndrome and the Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. A case report*. J Reprod Med, 1987. **32**(7): p. 549-50.
61. Fedele, F., et al., *Neovagina creation methods in Müllerian anomalies and risk of malignancy: insights from a systematic review*. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2023. **309**(3): p. 801-812.
62. Fitzgerald, H.C., et al., *Self-renewing endometrial epithelial organoids of the human uterus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019. **116**(46): p. 23132-23142.
63. Folch, M., I. Pigem, and J.C. Konje, *Mullerian agenesis: etiology, diagnosis, and management*. Obstet Gynecol Surv, 2000. **55**(10): p. 644-9.
64. Fontana, L., et al., *Genetics of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome*. Clin Genet, 2017. **91**(2): p. 233-246.
65. Franz, R.C., *Sigmoid colon vaginoplasty: a modified method*. Br J Obstet Gynaecol, 1996. **103**(11): p. 1148-55.

66. Furuyama, K., et al., *Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine*. Nature Genetics, 2010. **43**(1): p. 34-41.
67. Gao, D., et al., *Organoid Cultures Derived from Patients with Advanced Prostate Cancer*. Cell, 2014. **159**(1): p. 176-187.
68. Gellersen, B., I.A. Brosens, and J.J. Brosens, *Decidualization of the human endometrium: Mechanisms, functions, and clinical perspectives*. Seminars in Reproductive Medicine, 2007. **25**(6): p. 445-453.
69. Gendron, R.L., et al., *Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in Hoxa-11 null mice*. Biol Reprod, 1997. **56**(5): p. 1097-105.
70. Gilbert, S., *Paraxial and intermediate mesoderm. Chapter 12*. Developmental biology. Tenthth ed. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc, 2014: p. 415-48.
71. Giudice, L.C., *Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine**. Fertility and Sterility, 1994. **61**(1): p. 1-17.
72. Goldberg, J.M. and T. Falcone, *Effect of diethylstilbestrol on reproductive function*. Fertility and Sterility, 1999. **72**(1): p. 1-7.
73. Griffin, J.E., et al., *Congenital absence of the vagina. The Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome*. Ann Intern Med, 1976. **85**(2): p. 224-36.
74. Guerrier, D., et al., *The Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome (congenital absence of uterus and vagina)--phenotypic manifestations and genetic approaches*. J Negat Results Biomed, 2006. **5**: p. 1.
75. Guhr, A., et al., *Current state of human embryonic stem cell research: an overview of cell lines and their use in experimental work*. Stem Cells, 2006. **24**(10): p. 2187-91.
76. Hall-Craggs, M.A., et al., *Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser Syndrome: Diagnosis with MR Imaging*. Radiology, 2013. **269**(3): p. 787-792.
77. Hantak, A.M., I.C. Bagchi, and M.K. Bagchi, *Role of uterine stromal-epithelial crosstalk in embryo implantation*. The International Journal of Developmental Biology, 2014. **58**(2-3-4): p. 139-146.
78. Healey, A., *Embryology of the Female Reproductive Tract*, in *Imaging of Gynecological Disorders in Infants and Children*. 2010. p. 21-30.
79. Henes, M., et al., *Hyperandrogenemia and ovarian reserve in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome type 1 and 2: potential influences on ovarian stimulation*. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2017. **297**(2): p. 513-520.
80. Hentrich, T., et al., *The Endometrial Transcription Landscape of MRKH Syndrome*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 572281.
81. Herlin, M., A.T. Hojland, and M.B. Petersen, *Familial occurrence of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a case report and review of the literature*. Am J Med Genet A, 2014. **164A**(9): p. 2276-86.
82. Herlin, M., et al., *Prevalence and patient characteristics of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: a nationwide registry-based study*. Human Reproduction, 2016. **31**(10): p. 2384-2390.

83. Hibaoui, Y. and A. Feki, *Organoid Models of Human Endometrial Development and Disease*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020. **8**.
84. Hickey, M. and A. Balen, *Menstrual disorders in adolescence: investigation and management*. Hum Reprod Update, 2003. **9**(5): p. 493-504.
85. Hoffmann, W., G. Grospietsch, and W. Kuhn, *Thalidomide and female genital malformations*. Lancet, 1976. **2**(7989): p. 794.
86. Hombach-Klonisch, S., et al., *Regulation of functional steroid receptors and ligand-induced responses in telomerase-immortalized human endometrial epithelial cells*. Journal of Molecular Endocrinology, 2005. **34**(2): p. 517-534.
87. Hombria, J.C.G. and B. Lovegrove, *Beyond homeosis - HOX function in morphogenesis and organogenesis*. Differentiation, 2003. **71**(8): p. 461-476.
88. Huang, C.C., et al., *Lhx1 is required in Mullerian duct epithelium for uterine development*. Dev Biol, 2014. **389**(2): p. 124-36.
89. Huch, M., et al., *In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration*. Nature, 2013. **494**(7436): p. 247-50.
90. Huch, M., et al., *Long-Term Culture of Genome-Stable Bipotent Stem Cells from Adult Human Liver*. Cell, 2015. **160**(1-2): p. 299-312.
91. Hughes, C.S., L.M. Postovit, and G.A. Lajoie, *Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture*. Proteomics, 2010. **10**(9): p. 1886-90.
92. Johannesson, L., et al., *The First 5 Years of Uterus Transplant in the US*. JAMA Surgery, 2022. **157**(9).
93. Josso, N., et al., *Testicular anti-Mullerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications*. Pediatr Endocrinol Rev, 2006. **3**(4): p. 347-58.
94. Karateke, A., et al., *Intestinal vaginoplasty: is it optimal treatment of vaginal agenesis? A pilot study*. International Urogynecology Journal, 2006. **17**(1): p. 40-45.
95. Kin, T., et al., *Pluripotent Adult Stem Cells: A Potential Revolution in Regenerative Medicine and Tissue Engineering*, in *Pluripotent Stem Cells*. 2013.
96. Kleinman, H.K. and G.R. Martin, *Matrigel: basement membrane matrix with biological activity*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(5): p. 378-86.
97. Klipstein, S., et al., *The N314D polymorphism of the GALT gene is not associated with congenital absence of the uterus and vagina*. Mol Hum Reprod, 2003. **9**(3): p. 171-4.
98. Kobayashi, A. and R.R. Behringer, *Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals*. Nature Reviews Genetics, 2003. **4**(12): p. 969-980.
99. Kobayashi, A., et al., *Requirement of Lim1 for female reproductive tract development*. Development, 2004. **131**(3): p. 539-49.
100. Kula, S., et al., *Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome associated with pulmonary stenosis*. Acta Paediatr, 2004. **93**(4): p. 570-2.

101. Kurita, T., et al., *Stromal Progesterone Receptors Mediate the Inhibitory Effects of Progesterone on Estrogen-Induced Uterine Epithelial Cell Deoxyribonucleic Acid Synthesis*. *Endocrinology*, 1998. **139**(11): p. 4708-4713.
102. Kurita, T., P.S. Cooke, and G.R. Cunha, *Epithelial–Stromal Tissue Interaction in Paramesonephric (Müllerian) Epithelial Differentiation*. *Developmental Biology*, 2001. **240**(1): p. 194-211.
103. Kurmann, Anita A., et al., *Regeneration of Thyroid Function by Transplantation of Differentiated Pluripotent Stem Cells*. *Cell Stem Cell*, 2015. **17**(5): p. 527-542.
104. Lalwani, S., et al., *HOXA10 mutations in congenital absence of uterus and vagina*. *Fertil Steril*, 2008. **89**(2): p. 325-30.
105. Lancaster, M.A. and J.A. Knoblich, *Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies*. *Science*, 2014. **345**(6194): p. 1247125.
106. Ledig, S., et al., *Recurrent aberrations identified by array-CGH in patients with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome*. *Fertil Steril*, 2011. **95**(5): p. 1589-94.
107. Ledig, S., et al., *Frame shift mutation of LHX1 is associated with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome*. *Hum Reprod*, 2012. **27**(9): p. 2872-5.
108. Lin, W.C., *Use of autologous buccal mucosa for vaginoplasty: a study of eight cases*. *Human Reproduction*, 2003. **18**(3): p. 604-607.
109. M, L.G. and L.P. Shulman, *Tetralogy of Fallot, imperforate anus, and Mullerian, renal, and cervical spine (MURCS) anomalies in a 15-year-old girl*. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, 2002. **15**(4): p. 231-3.
110. Mannelli, C., et al., *Biological Tools to Study the Effects of Environmental Contaminants at the Feto–Maternal Interface*. *Dose-Response*, 2015. **13**(4).
111. Massafra, C., et al., *Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome with ectrodactyly*. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1988. **67**(6): p. 557-60.
112. Masse, J., et al., *The developing female genital tract: from genetics to epigenetics*. *International Journal of Developmental Biology*, 2009. **53**(2-3): p. 411-424.
113. Mauch, T.J., et al., *Signals from trunk paraxial mesoderm induce pronephros formation in chick intermediate mesoderm*. *Dev Biol*, 2000. **220**(1): p. 62-75.
114. McIndoe, A.H. and J.B. Banister, *An Operation for the Cure of Congenital Absence of the Vagina*. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 1938. **45**(3): p. 490-494.
115. Michos, O., *Kidney development: from ureteric bud formation to branching morphogenesis*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2009. **19**(5): p. 484-490.
116. Mihara, E., et al., *Active and water-soluble form of lipidated Wnt protein is maintained by a serum glycoprotein afamin/α-albumin*. *eLife*, 2016. **5**.
117. Milstone, D.S., et al., *Stromal-to-Epithelial Transition during Postpartum Endometrial Regeneration*. *PLoS ONE*, 2012. **7**(8).

118. Minto, C.L. and S.M. Creighton, *Vaginoplasty*. The Obstetrician & Gynaecologist, 2003. **5**(2): p. 84-89.
119. Miyoshi, H. and T.S. Stappenbeck, *In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells in spheroid culture*. Nature Protocols, 2013. **8**(12): p. 2471-2482.
120. Moncada-Madrado, M. and C. Rodriguez Valero, *Embryology, Uterus*, in *StatPearls*. 2020: Treasure Island (FL).
121. Morcel, K., et al., *Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome*. Orphanet J Rare Dis, 2007. **2**: p. 13.
122. Nelson, K.G., et al., *Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(1): p. 21-25.
123. Niikura, H., et al., *Expression of epidermal growth factor family proteins and epidermal growth factor receptor in human endometrium*. Human Pathology, 1996. **27**(3): p. 282-289.
124. Nik-Zainal, S., et al., *High incidence of recurrent copy number variants in patients with isolated and syndromic Mullerian aplasia*. J Med Genet, 2011. **48**(3): p. 197-204.
125. Oppelt, P., et al., *DNA sequence variations of the entire anti-Mullerian hormone (AMH) gene promoter and AMH protein expression in patients with the Mayer-Rokitanski-Kuster-Hauser syndrome*. Hum Reprod, 2005. **20**(1): p. 149-57.
126. Oppelt, P., et al., *Clinical aspects of Mayer-Rokitansky-Kuester-Hauser syndrome: recommendations for clinical diagnosis and staging*. Hum Reprod, 2006. **21**(3): p. 792-7.
127. Oppelt, P.B., S; Ludwig, KS; Wallwiener, D; Beckmann, MW., *Vaginale und uterine Fehlbildungen - Teil 1*. Geb Fra., 2005(65 (10)): p. R201-220.
128. Oppelt, P.G., et al., *Malformations in a cohort of 284 women with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome (MRKH)*. Reprod Biol Endocrinol, 2012. **10**: p. 57.
129. Oppelt, P.G. and H.-G. Dörr, *Kinder- und Jugendgynäkologie*. 2015.
130. Oppelt, P.G., et al., *Hyperandrogenemia and high prolactin in congenital utero–vaginal aplasia patients*. Reproduction, 2017. **153**(5): p. 555-563.
131. Orvis, G.D. and R.R. Behringer, *Cellular mechanisms of Müllerian duct formation in the mouse*. Developmental Biology, 2007. **306**(2): p. 493-504.
132. Otomo, N., et al., *Bi-allelic loss of function variants of TBX6 causes a spectrum of malformation of spine and rib including congenital scoliosis and spondylocostal dysostosis*. J Med Genet, 2019. **56**(9): p. 622-628.
133. Pan, H.-x. and G.-n. Luo, *Phenotypic and clinical aspects of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome in a Chinese population: an analysis of 594 patients*. Fertility and Sterility, 2016. **106**(5): p. 1190-1194.
134. Pavanello Rde, C., A. Eigier, and P.A. Otto, *Relationship between Mayer-Rokitansky-Kuster (MRK) anomaly and hereditary renal adysplasia (HRA)*. Am J Med Genet, 1988. **29**(4): p. 845-9.

135. Peifer, M. and P. Polakis, *Cancer - Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis - a look outside the nucleus*. Science, 2000. **287**(5458): p. 1606-1609.
136. Pepling, M.E. and J.J.N. Burton, *Fetal/Gonadogenesis*, in *Encyclopedia of Reproduction*. 2018. p. 47-51.
137. Philibert, P., et al., *Identification and functional analysis of a new WNT4 gene mutation among 28 adolescent girls with primary amenorrhea and mullerian duct abnormalities: a French collaborative study*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(3): p. 895-900.
138. Philibert, P., et al., *Molecular analysis of WNT4 gene in four adolescent girls with mullerian duct abnormality and hyperandrogenism (atypical Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome)*. Fertil Steril, 2011. **95**(8): p. 2683-6.
139. Pietzsch, M., et al., *Establishment and characterization of endometrial organoids derived from MRKHS patients*, in *Kongressabstracts zur Tagung 2020 der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG)*. 2020.
140. Pietzsch, M., et al., *A Cohort of 469 Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser Syndrome Patients—Associated Malformations, Syndromes, and Heterogeneity of the Phenotype*. Journal of Clinical Medicine, 2024. **13**(2).
141. Pittock, S.T., D. Babovic-Vuksanovic, and A. Lteif, *Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser anomaly and its associated malformations*. Am J Med Genet A, 2005. **135**(3): p. 314-6.
142. Pompili, G., et al., *Magnetic resonance imaging in the preoperative assessment of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome*. La radiologia medica, 2009. **114**(5): p. 811-826.
143. Pontecorvi, P., et al., *Protein–protein interaction network analysis applied to DNA copy number profiling suggests new perspectives on the aetiology of Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome*. Scientific Reports, 2021. **11**(1).
144. Preibsch, H., et al., *Clinical value of magnetic resonance imaging in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome: diagnosis of associated malformations, uterine rudiments and intrauterine endometrium*. European Radiology, 2014. **24**(7): p. 1621-1627.
145. Raines, A.M., et al., *Recombineering-based dissection of flanking and paralogous Hox gene functions in mouse reproductive tracts*. Development, 2013. **140**(14): p. 2942-52.
146. Rall, K., et al., *A combination of transcriptome and methylation analyses reveals embryologically-relevant candidate genes in MRKH patients*. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2011. **6**.
147. Rall, K., et al., *Uterine rudiments in patients with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome consist of typical uterine tissue types with predominantly basalis-like endometrium*. Fertil Steril, 2013. **99**(5): p. 1392-9.
148. Rall, K., et al., *Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome discordance in monozygotic twins: matrix metalloproteinase 14, low-density*

- lipoprotein receptor-related protein 10, extracellular matrix, and neoangiogenesis genes identified as candidate genes in a tissue-specific mosaicism.* Fertility and Sterility, 2015. **103**(2): p. 494-502.
149. Rall, K., et al., *Typical and Atypical Associated Findings in a Group of 346 Patients with Mayer-Rokitansky-Kuester-Hauser Syndrome.* J Pediatr Adolesc Gynecol, 2015. **28**(5): p. 362-8.
 150. Ravel, C., et al., *Mutational analysis of the WNT gene family in women with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome.* Fertil Steril, 2009. **91**(4 Suppl): p. 1604-7.
 151. Resendes, B.L., et al., *Role for anti-Mullerian hormone in congenital absence of the uterus and vagina.* Am J Med Genet, 2001. **98**(2): p. 129-36.
 152. Robbins, J.B., et al., *Müllerian duct anomalies: Embryological development, classification, and MRI assessment.* Journal of Magnetic Resonance Imaging, 2015. **41**(1): p. 1-12.
 153. Sandbacka, M., et al., *TBX6, LHX1 and copy number variations in the complex genetics of Müllerian aplasia.* Orphanet Journal of Rare Diseases, 2013. **8**(1).
 154. Saravelos, S.H., K.A. Cocksedge, and T.C. Li, *Prevalence and diagnosis of congenital uterine anomalies in women with reproductive failure: a critical appraisal.* Hum Reprod Update, 2008. **14**(5): p. 415-29.
 155. Sato, T., et al., *Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche.* Nature, 2009. **459**(7244): p. 262-5.
 156. Sato, T., et al., *Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts.* Nature, 2010. **469**(7330): p. 415-418.
 157. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.* Nature Methods, 2012. **9**(7): p. 676-682.
 158. Schober, J.M., *Cancer of the neovagina.* Journal of Pediatric Urology, 2007. **3**(3): p. 167-170.
 159. Seishima, R., et al., *Neonatal Wnt-dependent Lgr5 positive stem cells are essential for uterine gland development.* Nature Communications, 2019. **10**(1).
 160. Seppälä, M., et al., *Glycodelin: A Major Lipocalin Protein of the Reproductive Axis with Diverse Actions in Cell Recognition and Differentiation.* Endocrine Reviews, 2002. **23**(4): p. 401-430.
 161. Shawlot, W. and R.R. Behringer, *Requirement for Lim1 in head-organizer function.* Nature, 1995. **374**(6521): p. 425-30.
 162. Strissel, P.L., et al., *Assessment of pituitary and steroid hormones and members of the TGF-beta superfamily for ovarian function in patients with congenital uterus and vaginal aplasia (MRKH syndrome).* Horm Metab Res, 2009. **41**(5): p. 408-13.
 163. Strubbe, E.H., et al., *Evaluation of radiographic abnormalities of the hand in patients with the Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome.* Skeletal Radiol, 1987. **16**(3): p. 227-31.
 164. Strubbe, E.H., et al., *Spinal abnormalities and the atypical form of the Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome.* Skeletal Radiol, 1992. **21**(7): p. 459-62.

165. Strubbe, E.H., et al., *Hearing loss and the Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome*. Am J Otol, 1994. **15**(3): p. 431-6.
166. Talbi, S., et al., *Molecular Phenotyping of Human Endometrium Distinguishes Menstrual Cycle Phases and Underlying Biological Processes in Normo-Ovulatory Women*. Endocrinology, 2006. **147**(3): p. 1097-1121.
167. Tang, R., et al., *WNT9B in 542 Chinese women with Müllerian duct abnormalities: mutation analysis*. Reproductive BioMedicine Online, 2014. **28**(4): p. 503-507.
168. Teo, J.-L. and M. Kahn, *The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: A tale of two coactivators*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2010. **62**(12): p. 1149-1155.
169. Tewes, A.-C., et al., *Sequence Variants in *TBX6* Are Associated with Disorders of the Müllerian Ducts: An Update*. Sexual Development, 2019. **13**(1): p. 35-40.
170. Tewes, A.C., et al., *Variations in *RBM8A* and *TBX6* are associated with disorders of the mullerian ducts*. Fertil Steril, 2015. **103**(5): p. 1313-8.
171. Timmreck, L.S., et al., *Analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in patients with congenital absence of the uterus and vagina*. American Journal of Medical Genetics Part A, 2003. **120a**(1): p. 72-76.
172. Tulac, S., et al., *Identification, Characterization, and Regulation of the Canonical Wnt Signaling Pathway in Human Endometrium*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2003. **88**(8): p. 3860-3866.
173. Turco, M.Y., et al., *Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium*. Nature Cell Biology, 2017. **19**(5): p. 568-+.
174. Vainio, S., et al., *Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 405-9.
175. Valentijn, A.J., et al., *SSEA-1 isolates human endometrial basal glandular epithelial cells: phenotypic and functional characterization and implications in the pathogenesis of endometriosis*. Human Reproduction, 2013. **28**(10): p. 2695-2708.
176. van de Wetering, M., et al., *Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients*. Cell, 2015. **161**(4): p. 933-945.
177. Vasquez, Y.M. and F.J. DeMayo, *Role of nuclear receptors in blastocyst implantation*. Semin Cell Dev Biol, 2013. **24**(10-12): p. 724-35.
178. Verheyen, E.M., et al., *Drugging a Stem Cell Compartment Using Wnt3a Protein as a Therapeutic*. PLoS ONE, 2014. **9**(1).
179. Wagers, A.J. and I.L. Weissman, *Plasticity of adult stem cells*. Cell, 2004. **116**(5): p. 639-48.
180. Wang, H., et al., *A novel model of human implantation: 3D endometrium-like culture system to study attachment of human trophoblast (Jar) cell spheroids*. Molecular Human Reproduction, 2011. **18**(1): p. 33-43.
181. Wang, M., et al., *Analysis of WNT9B mutations in Chinese women with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome*. Reproductive BioMedicine Online, 2014. **28**(1): p. 80-85.

182. Wang, Y., et al., *Evaluation of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome with magnetic resonance imaging: Three patterns of uterine remnants and related anatomical features and clinical settings*. European Radiology, 2017. **27**(12): p. 5215-5224.
183. Warot, X., et al., *Gene dosage-dependent effects of the Hoxa-13 and Hoxd-13 mutations on morphogenesis of the terminal parts of the digestive and urogenital tracts*. Development, 1997. **124**(23): p. 4781-91.
184. Waschk, D.E.J., et al., *Mutations in WNT9B are associated with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome*. Clinical Genetics, 2016. **89**(5): p. 590-596.
185. Watabe-Rudolph, M., et al., *The mouse rib-vertebrae mutation is a hypomorphic Tbx6 allele*. Mech Dev, 2002. **119**(2): p. 251-6.
186. White, P.H., *Defective somite patterning in mouse embryos with reduced levels of Tbx6*. Development, 2003. **130**(8): p. 1681-1690.
187. Wodarz, A. and R. Nusse, *Mechanisms of Wnt signaling in development*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 1998. **14**: p. 59-88.
188. Wottgen, M., et al., *Higher incidence of linked malformations in siblings of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser-syndrome patients*. Hum Reprod, 2008. **23**(5): p. 1226-31.
189. Wranning, C.A., et al., *Auto-transplantation of the uterus in the domestic pig (Sus scrofa): Surgical technique and early reperfusion events*. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 2006. **32**(4): p. 358-367.
190. Wu, S.-P., R. Li, and F.J. DeMayo, *Progesterone Receptor Regulation of Uterine Adaptation for Pregnancy*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2018. **29**(7): p. 481-491.
191. Wulfsberg, E.A. and T.M. Grigbsy, *Rokitansky sequence in association with the facio-auriculo-vertebral sequence: part of a mesodermal malformation spectrum?* Am J Med Genet, 1990. **37**(1): p. 100-2.
192. Yilanlioglu, N.C., et al., *Amniotic Membrane as Allograft for Construction of Neovagina by McIndoe Technique in Vaginal Agenesis*. Global Journal of Health Science, 2016. **9**(4).

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde im Department für Frauengesundheit, Universitätsklinikum Tübingen unter Betreuung von Frau Prof. Dr. med. Sara Brucker und Frau Prof. Dr. med. Katharina Rall durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Dr. André Koch, Frau Prof. Dr. med. Sara Brucker, Frau Prof. Dr. med. Katharina Rall, und mich.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. André Koch von mir eigenständig durchgeführt. Die Verarbeitung sowie Kultivierung der Organoidkulturen aus MRKHS- und Kontrollgewebe wurde von mir selbstständig durchgeführt. Das Protokoll zur Dezidualisierung von Organoidkulturen inklusive weiterer Analyseschritte zur Quantifizierung des Effekts wie RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und quantitative Echtzeit-PCR wurden von mir selbstständig etabliert und durchgeführt.

Die Methoden zur Anfertigung von Paraffin-Schnitten und Immunhistochemischen Färbungen wurden durch Frau Ingrid Teufel sowie in Kooperation mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Die Methode zur Anfertigung von Immunfluoreszenz-Färbungen wurde durch Frau Ingrid Teufel und Frau Dr. Anjali Ralhan Singh durchgeführt.

Die Übertragung der Operations-Berichte der MRKHS-Patientinnen nach REDCap erfolgte durch Frau Anita Cabon. Nach einem Datenexport in Microsoft Excel wurden diese durch mich um die Inhalte der Pathologieberichte ergänzt und anschließend analysiert.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich. Für die Auswertung der Operations- und Pathologie-Berichte erfolgte eine statistische Beratung durch Frau PD Dr. Birgitt Schönfisch.

Ich versichere, das Manuskript dieser Dissertation komplett selbständig nach Anleitung durch Dr. André Koch und Prof. Dr. med. Katharina Rall verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Ein Teil der in dieser Arbeit erhobene Daten ist in zwei Veröffentlichungen eingeflossen (siehe Kapitel 8).

Für die Veröffentlichung in „Disease Models & Mechanisms“ („Endometrial organoids derived from Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome patients provide insights into disease-causing pathways“, DOI: 10.1242/dmm.049379), welche als Kooperation mit dem Institut für Medizinische Genetik Tübingen mit mir als Co-Autor entstanden ist und sich primär mit unserem MRKHS-Organoid-Modell beschäftigt, war ich sowohl an der Methodik, Validierung, Untersuchung, Datenkuration als auch an der Verfassung des ersten Manuskripts sowie dessen Überarbeitung beteiligt.

Die von mir als Erstautor verfasste Veröffentlichung im „Journal of Clinical Medicine“ („A Cohort of 469 Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser Syndrome Patients - Associated Malformations, Syndromes, and Heterogeneity of the Phenotype“, DOI: 10.3390/jcm13020607) behandelt schwerpunktmäßig die von mir durchgeführte Auswertung der Operations- und Pathologieberichte im Zusammenhang mit allgemeinen Patientendaten. Betreut wurde ich hierbei unter anderem durch Frau Prof. Dr. med. Katharina Rall und zur statistischen Beratung durch Frau PD Dr. Birgitt Schönfisch, wobei beide an der Korrektur des Manuskripts beteiligt waren. Die hieraus in Kapitel 3.5 verwendeten Abbildungen und Tabellen wurden von mir selbst entworfen.

Tübingen, den 26.05.2024

Martin Pietzsch

8 Veröffentlichungen

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten wurden nach vorheriger schriftlicher Information an das Promotionsbüro vorab bereits auszugsweise im Journal „Disease Models & Mechanisms“ sowie im „Journal of Clinical Medicine“ veröffentlicht:

Sara Y. Brucker, Thomas Hentrich, Julia M. Schulze-Hentrich, **Martin Pietzsch**, Noel Wajngarten, Anjali Ralhan Singh, Katharina Rall, André Koch; Endometrial organoids derived from Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome patients provide insights into disease-causing pathways. *Dis Model Mech* 1 May 2022; 15 (5): dmm049379. <https://doi.org/10.1242/dmm.049379>

Pietzsch, Martin, Birgitt Schönfisch, Alice Höller, André Koch, Annette Staebler, Katharina Dreser, Kristina Bettecken, Lisa Schaak, Sara Yvonne Brucker, and Katharina Rall. 2024. "A Cohort of 469 Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser Syndrome Patients—Associated Malformations, Syndromes, and Heterogeneity of the Phenotype" *Journal of Clinical Medicine* 13, no. 2: 607. <https://doi.org/10.3390/jcm13020607>

Ein Poster mit Daten und Abbildungen dieser Arbeit wurde zudem auf dem 63. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe präsentiert und mit einem Poster-Preis prämiert [139]:

Pietzsch, M., et al., Establishment and characterization of endometrial organoids derived from MRKHS patients, in Kongressabstracts zur Tagung 2020 der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG). 2020

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht haben. Ohne Ihre Unterstützung wäre die Umsetzung dieses Projekts nicht möglich gewesen:

Mein Dank gilt zunächst meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Sara Y. Brucker, für die Überlassung des Promotionsthemas sowie die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und stetige Unterstützung im Rahmen der gesamten Arbeit.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Katharina Rall für Ihre großartige Mitbetreuung des Projekts sowie die damit einhergehende unermüdliche fachliche und persönliche Unterstützung, welche ich sehr zu schätzen weiß. Der konstruktive Austausch war stets eine Bereicherung für mich.

Ebenfalls gilt mein Dank Herrn Dr. André Koch und seiner Arbeitsgruppe für die offene Aufnahme, angenehme Arbeits-Atmosphäre, geduldige Anleitung und bereichernde Zusammenarbeit im Rahmen dieses Projekts. Für die stetige Unterstützung sowie das hilfreiche Feedback bin ich sehr dankbar.

Bedanken möchte ich mich auch für die hilfreiche und kompetente statistische Beratung durch Frau Dr. Birgitt Schönfisch bei der Auswertung der Operations- und Pathologie-Berichte.

Außerdem gilt mein Dank dem IZKF Promotionskolleg der Medizinischen Fakultät Tübingen für die ideelle und finanzielle Förderung dieses Projektes.

Auch bedanken möchte ich mich bei allen Patienten und Patientinnen, ohne die unser wissenschaftlicher Fortschritt oftmals nicht möglich wäre.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und Mary E. Carter für die nie endende Geduld, hilfreichen Ratschläge und die unermessliche Unterstützung im Rahmen dieses gesamten Projekts von ganzem Herzen bedanken.