

# The pathogenesis of endometriosis: the endometrium - mesothelium dialogue

Citation for published version (APA):

Demir, A. Y. (2004). *The pathogenesis of endometriosis: the endometrium - mesothelium dialogue*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20040312ad>

## Document status and date:

Published: 01/01/2004

## DOI:

[10.26481/dis.20040312ad](https://doi.org/10.26481/dis.20040312ad)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

---

## [ Summary ]

---

Endometriosis is the oestrogen-dependent growth of endometrial cells at sites outside the uterus. This disease is presented in distinct forms, which leads to various clinical manifestations. Although the pathogenesis of endometriosis is still prone to debate, the transplantation theory is widely accepted. According to this theory viable endometrium tissue, which is regurgitated during menstruation into the abdominal cavity through the Fallopian tubes, adheres to the peritoneal surfaces, generates its own blood supply and grows into an active lesion of endometrium-like tissue. Previous adhesion studies using peritoneum and endometrium from different phases of the menstrual cycle have shown that endometrial fragments adhere where the mesothelial layer of the peritoneum is damaged. Based on these findings, an intact mesothelial lining is suggested to be a protective barrier against the adhesion of endometrial fragments obtained from different phases of menstrual cycle. We, therefore, hypothesized that shed menstrual endometrium is capable to disrupt the intact mesothelial lining facilitating the adhesion of endometrium fragments onto the peritoneum surface and hence the development of endometriosis. The studies described in this thesis attempt to illuminate this initial interaction by exploring the effects of shed menstrual endometrium on the cells of the mesothelial lining at the cellular and subcellular level.

Retrogradely shed menstrual effluent is difficult to obtain. Therefore, anterogradely shed menstrual effluent collected with a vaginal cup (Keeper) was used as a source of menstrual endometrium. Monolayers of mesothelial cells recovered from human omentum were used to mimic the mesothelial lining of the peritoneum.

A literature review is presented in **chapter 1** and the aims of the study in **chapter 2**.

In **chapter 3**, the potential detrimental effect of the menstrual effluent components on the mesothelial cell monolayer were investigated with light and scanning electron microscopy. The results of this study pointed out that the paracrine factors present in the menstrual effluent induced changes in mesothelial cell morphology, including retraction and shrinking of the covering layer with exposure of the underlying structures of basement membrane and extracellular matrix. This effect was unique for menstrual effluent since similar experiments with endometrium obtained from secretory and proliferative phases did not cause morphological changes in mesothelial cells. These findings led to the conclusion that menstrual endometrium is able to create adhesion sites by local disruption of the mesothelial layer.

The alterations induced by menstrual effluent as observed in mesothelial cells closely resemble morphological changes during cell death, i.e. apoptosis or necrosis, or during cellular remodeling. In **chapter 4**, it was investigated whether these processes were responsible for the morphological changes in mesothelial cells. Flow cytometric analysis with markers for apoptosis or necrosis, such as the M30 CytoDeath antibody and annexin V

combined with propidium iodide, revealed that after overnight incubation with menstrual effluent only 1 to 7% of the mesothelial cells were apoptotic or necrotic. These numbers were within the physiological range. In contrast, the morphology of almost all mesothelial cells was affected after incubation with menstrual effluent. Immunostaining for cytokeratins, vimentin and fibrillar actin showed that the profoundly altered morphology of mesothelial cells was related to extensive reorganization of cytoskeletal elements. Therefore, we concluded that cellular remodeling, rather than apoptosis or necrosis is responsible for the observed alterations in mesothelial cell morphology.

One of the forms of cellular remodeling is epithelial to mesenchymal transitions (EMT). Therefore, in **chapter 5** this process was studied at the morphological and molecular level in mesothelial cells. By using time-lapse video microscopy we observed that when exposed to menstrual effluent the mesothelial cells underwent a dynamic process, including dissociation of the cellular contacts, increase in cell motility and formation of cellular extensions. Within 24 hours the mesothelial cells obtained a spindle-like or a round morphology. When the culture medium was replaced with the normal culture medium, the typical mesothelial morphology was recovered within 4 days. Based on these observations, we concluded that menstrual effluent causes reversible changes in the morphology of the mesothelium and does not necessarily cause permanent damage to the peritoneal lining. Further evidence was provided that the cellular remodeling in response to shed menstrual effluent is EMT. Inhibition studies demonstrated that the altered morphology was a result of an energy-dependent transition process, which involved (Src) tyrosine kinase signaling. In addition, the expression of vimentin and the transcription factor Snail were up-regulated, whereas the expression of E-cadherin was dramatically reduced and the expression of subtypes of cytokeratins was changed.

In **chapter 6** the functional changes in cellular proteins that determined the EMT in mesothelial cells were assessed. Menstrual factors induced specific changes in the phosphorylation and expression status of regulatory, metabolic and structural proteins relevant to the complex process of EMT. These data allowed a specification of the signaling pathways that contribute to this process. For example, differential phosphorylation of annexin-1, which is a substrate for tyrosine kinase activity associated with growth factor receptors, indicated that (Src) tyrosine kinase pathways are involved in the transduction of EMT-signal in mesothelial cells. Moreover, differential expression of proteins related to the Rho family of small G proteins indicated that menstrual effluent transmitted the EMT inducing message via Ras, Rho, and MAPK signaling pathways as well. Differential phosphorylation of tropomyosin- $\alpha$  and differential expression of actin and tubulin binding proteins, as well as cytokeratin and vimentin filaments indicate that the signal terminates in the reorganization of cytoskeleton proteins, particularly actin filaments and subsequently in the phenotypic changes of mesothelial cells. In this chapter additional information on the mesothelial proteome was also provided.

In order to better understand the process of EMT in mesothelial cells the inducing factor(s) in the menstrual effluent should be characterized and identified if possible. In **chap-**

**ter 7**, strategies are described to purify and characterize these factors. Incubation studies with specific agents that inhibit matrix metalloproteinases, the use of RT-PCR to evaluate iNOS expression and immunostaining for nitrotyrosine did not provide any evidence that these molecules are involved in the EMT process in mesothelial cells. Furthermore, size fractionation techniques revealed that the soluble factors that were assumed to be responsible for the EMT process were proteins with a molecular weight larger than 50 kD. Further analysis by using proteomics yielded the identities of two proteins, i.e.  $\alpha$ -enolase and haemoglobin. Since  $\alpha$ -enolase is a plasminogen receptor and a substrate for (Src) tyrosine kinase proteins, and haemoglobin can change actin cytoskeleton through tyrosine kinase signaling, these two proteins are possible candidates for the induction of EMT in mesothelial cells.

In **chapter 8** the results and conclusions of these studies are discussed and several future perspectives are outlined.

Taken together, the results of the present study contribute to refining the molecular mechanisms that occur at the interface of shed menstrual endometrium and mesothelial cells. The menstrual effluent is capable to induce a transition process in mesothelial cells through which the cells change their phenotype from an epithelial to a fibroblast-type. Several signal transduction pathways, in particular those which involve tyrosine kinases are taking part in this transition process. To date unknown soluble molecules in menstrual effluent are potential candidates for the induction of the signal in mesothelial cells.



## [ Samenvatting ]

Endometriose is de oestrogeen-afhankelijke groei van endometrium op plaatsen buiten de uterus. Deze ziekte heeft verschillende uitingsvormen, die leiden tot verscheidene klinische manifestaties. Hoewel er nog steeds discussie is over de pathogenese van endometriose, is de transplantatietheorie wijdverbreid geaccepteerd. Volgens deze theorie hecht vitaal endometrium, dat tijdens de menstruatie via de eileiders in de buikholte terecht is gekomen, aan het peritoneum, genereert een eigen bloedvoorziening en groeit uit tot een endometriose laesie. Eerdere studies over hechting van endometrium aan peritoneum, waarin gebruik gemaakt werd van endometrium dat verkregen werd uit de verschillende fasen van de menstruele cyclus, hebben aangetoond dat endometriumfragmenten daar aanhechten waar het mesotheel van het peritoneum beschadigd is. Gebaseerd op deze bevindingen wordt verondersteld dat een intacte mesotheellaag een beschermende barrière vormt tegen de hechting van endometriumfragmenten tijdens de menstruatie fase van de cyclus en mogelijk ook in de overige fasen van de cyclus. Onze hypothese luidt dan ook, dat endometrium dat door retrograde menstruatie in de buikholte terecht is gekomen, in staat is de intacte mesotheellaag te beschadigen, waardoor endometriumfragmenten aan de onder het mesotheel gelegen extracellulaire matrix kunnen hechten, waarna endometriose kan ontstaan.

De dialoog tussen endometrium en mesotheel vormt het onderwerp van de studies zoals beschreven in dit proefschrift. De effecten van menstrueel endometrium op de mesotheellaag werden onderzocht op cellulair en subcellulair niveau.

Retrograad afgescheiden menstruum is moeilijk te verkrijgen. Daarom is antegraad afgescheiden menstruum verzameld met behulp van een vaginale cup (Keeper). Monolagen van mesotheelcellen verkregen uit menselijk omentum zijn gebruikt om de mesotheellaag van het peritoneum na te bootsen.

In **hoofdstuk 1** wordt een overzicht gepresenteerd van de relevante literatuur, in **hoofdstuk 2** de doelstellingen van de studie.

In **hoofdstuk 3** wordt het potentieel schadelijke effect van componenten van het menstruum op de mesotheellaag beschreven met behulp van lichtmicroscopie en scanning electronenmicroscopie. De resultaten van deze studie wijzen uit dat paracrine factoren in het menstruum veranderingen induceren in de morfologie van de mesotheelcel. De mesotheelcellen veranderen van vorm, er treedt retractie en krimp op. Dit leidt tot blootstelling van de onderliggende structuren van de basaalmembraan en de extracellulaire matrix. Dit effect is uniek voor menstruum, omdat soortgelijke experimenten met endometrium verkregen uit de secretoire en proliferatieve fasen geen morfologische veranderingen in de mesotheelcellen veroorzaken. Deze bevindingen leiden tot de conclusie dat menstrueel endometrium in staat is hechtplaatsen te creëren door lokale beschadiging van de mesotheellaag.

De door menstruum geïnduceerde veranderingen die geobserveerd werden in mesotheelcellen lijken sterk op de morfologische veranderingen die optreden tijdens apoptose of necrose, of bij het proces van cellulaire hermodellering (cellular remodeling). In **hoofdstuk 4** wordt onderzoek beschreven naar de vraag of deze drie processen verantwoordelijk zijn voor de morfologische veranderingen in de mesotheelcellen. Flow-cytometrische analyses met markers voor apoptose en necrose, zoals het M30 CytoDeath antilichaam en annexine V in combinatie met propidium jodide, wezen uit dat na incubatie met menstruum slechts 1 tot 7% van de mesotheelcellen apoptotisch of necrotisch waren geworden. Deze percentages liggen binnen de fysiologische grenzen. Daarentegen werd de morfologie van bijna alle mesotheelcellen beïnvloed door incubatie met menstruum. Immuunkleuringen voor cytokeratine, vimentine en fibrillair actine toonden aan dat de veranderde morfologie van mesotheelcellen gerelateerd is aan een extensieve reorganisatie van elementen van het cytoskelet. Daarom concluderen wij dat niet de apoptose of necrose, maar de cellulaire hermodellering verantwoordelijk is voor de waargenomen veranderingen in de morfologie van de mesotheelcellen.

'Epitheliale-mesenchymale transitie' (EMT) is een van de vormen van cellulaire hermodellering, waarbij het fenotype van de cel verandert van een epitheliale naar een mesenchymale vorm. In **hoofdstuk 5** wordt dit proces in de mesotheelcellen beschreven op morfologisch en moleculair niveau. Met behulp van time-lapse video microscopie observeerden we dat mesotheelcellen, indien blootgesteld aan menstruum, een dynamische verandering ondergingen, namelijk een dissociatie van de cellulaire contacten, een toename in beweeglijkheid van de cellen en formatie van de cellulaire uitlopers. Binnen 24 uur kregen de mesotheelcellen een spoelvormige of een ronde morfologie. Wanneer het door menstruum geconditioneerde medium vervangen werd door het normale kweekmedium herstelde de typische mesotheelmorfologie zich binnen 4 dagen. Gebaseerd op deze observaties concludeerden we dat menstruum reversibele veranderingen veroorzaakt in de morfologie van het mesotheel en geen permanente schade toebrengt aan de mesotheellaag op het peritoneum. Bovendien werd bewezen dat de cellulaire hermodellering die optreedt in reactie op contact met het menstruum een epitheliale-mesenchymale transitie is. Remmingstudies lieten zien dat de veranderde morfologie het resultaat is van een energieafhankelijk transitieproces, waarbij (Src) tyrosine-kinase signalering betrokken is. Bovendien vond een toename plaats van de expressie van vimentine en van de transcriptie factor Snail, terwijl de expressie van E-cadherine drastisch gereduceerd werd, en de expressie van subtypen van cytokeratinen werd veranderd.

In **hoofdstuk 6** worden de functionele veranderingen in cellulaire eiwitten die de epitheliale-mesenchymale omzetting in mesotheelcellen bewerkstelligen beschreven. Factoren in het menstruum induceren specifieke veranderingen in de mate van phosphorylering en expressie van regulerende, metabole en structurele eiwitten die relevant zijn in het complexe proces van epitheliale-mesenchymale omzettingen. Deze gegevens maakten een specificatie mogelijk van de signaalroutes die bijdragen aan dit proces.

Bijvoorbeeld: een veranderde phosphorylering van annexine 1, dat een substraat is voor de tyrosine-kinase activiteit die geassocieerd is met receptoren voor groeifactoren, wijst erop dat (Src) tyrosine-kinase routes betrokken zijn bij de transductie van het EMT-signaal in mesotheelcellen. Bovendien wijst een veranderde expressie van eiwitten die gerelateerd zijn aan de Rho-familie van kleine G-eiwitten erop, dat menstruum de boodschap die de EMT induceert doorgeeft via Ras, Rho, en MAPK signaalroutes. Veranderde phosphorylering van tropomyosine- $\alpha$  en veranderde expressie van zowel actine en tubuline bindende eiwitten als cytokeratine en vimentine filamenten wijzen erop dat het signaal leidt tot de reorganisatie van cytoskeleteiwitten, in het bijzonder actinefilamenten, en vervolgens resulteert in de fenotypische veranderingen van de mesotheelcellen. In dit hoofdstuk wordt bovendien aanvullende informatie gegeven over het proteoom van het mesotheel.

Om het proces van EMT in mesotheelcellen beter te begrijpen moeten de inducerende factoren in het menstruum gekarakteriseerd worden en zo mogelijk worden geïdentificeerd. In **hoofdstuk 7** worden er strategieën beschreven om deze factoren te specificeren en te identificeren. Remming van matrixmetalloproteinasen, iNOS expressie geëvalueerd met behulp van RT-PCR, en immunohistochemie voor nitrotyrosine in mesotheelcellen leverden geen bewijs dat deze moleculen betrokken waren in het EMT-proces. Het fractioneren van de oplosbare factoren, die verondersteld worden verantwoordelijk te zijn voor het EMT-proces, toonde aan dat dit eiwitten zijn met een moleculair gewicht groter dan 50 kD. Verdere analyse van deze eiwitten met behulp van proteomics leidde tot identificatie van twee eiwitten,  $\alpha$ -enolase en haemoglobine. Omdat  $\alpha$ -enolase een plasminogeenreceptor is, en tevens een substraat is voor (Src) tyrosine-kinase eiwitten, en omdat haemoglobine het actinecytoskelet kan veranderen door tyrosine-kinase signalering, zijn deze twee eiwitten mogelijke kandidaten voor de inductie van EMT in mesotheelcellen.

In **hoofdstuk 8** worden de resultaten van het onderzoek gerelateerd aan bevindingen uit de literatuur en een breder perspectief geplaatst. Tevens wordt een aanzet gegeven tot verder onderzoek.

Samenvattend dragen de resultaten van deze studie bij aan de verfijning van kennis over de moleculaire mechanismen die zich afspelen in de interactie tussen menstruum en mesotheelcellen. Het menstruum is in staat een proces van verandering in mesotheelcellen te induceren, waardoor de cellen hun fenotype van een epitheel- in een fibroblast-type veranderen. Verscheidene signaal-transductie routes, in het bijzonder die van tyrosine-kinase, participeren in dit proces van verandering. Tot nu toe onbekende factoren in menstruum zijn potentiële kandidaten voor de inductie van het signaal in mesotheelcellen.