

Aus der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Der Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors  
auf die Progression der Endometriose

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Katharina Andrea Nees  
aus Bad Soden am Taunus

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

Tag der Promotion: 10.09.2025

Namensnennung, keine Bearbeitung (CC-BY-ND-4.0)

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Inhaltsverzeichnis .....  | 3  |
| Abkürzungsverzeichnis .....   | I  |
| Abbildungsverzeichnis .....   | IV |
| Tabellenverzeichnis.....  | V  |
| 1 Einleitung.....   | 1  |
| 2 Literaturdiskussion .....   | 4  |
| 2.1 Die Endometriose .....  | 4  |
| 2.1.1 Epidemiologie .....   | 4  |
| 2.1.2 Lokalisation.....   | 4  |
| 2.1.3 Die Pathogenese der Endometriose .....                                | 7  |
| 2.1.3.1 Transplantationstheorie.....  | 8  |
| 2.1.3.2 Archimeta-Konzept.....  | 9  |
| 2.1.3.3 Stammzelltheorie.....   | 10 |
| 2.1.3.4 Veränderungen der lokalen Mikroumgebung und des Immun-systems ..... | 11 |
| 2.1.4 Risikofaktoren.....   | 13 |
| 2.1.5 Klassifikation.....   | 14 |
| 2.1.6 Klinische Symptome .....  | 17 |
| 2.1.7 Therapieoptionen .....  | 19 |
| 2.1.7.1 Hormonelle Therapie/ KOK und Progestine .....                       | 19 |
| 2.1.7.2 GnRH-Analoga und Antagonisten .....                                 | 20 |
| 2.1.7.3 Weitere medikamentöse Ansätze .....                                 | 21 |
| 2.1.7.4 Operative Therapie.....   | 21 |
| 2.1.8 Endometriose und Ovarialkarzinom.....                                 | 22 |
| 2.2 Allgemeine Aufgaben und Regulationsmechanismen von Calcium.....         | 23 |
| 2.3 Calcium im Kontext des Krankheitsbilds Endometriose .....               | 23 |
| 2.4 Der Calcium–sensitive Rezeptor (CaSR) .....                             | 24 |
| 2.4.1 Aufbau des Rezeptors.....   | 25 |
| 2.4.2 Agonisten und allosterische Modulatoren .....                         | 27 |
| 2.4.3 Wichtige Signalwege des CaSR .....                                    | 28 |
| 2.4.4 Die verschiedenen Funktionen des CaSR.....                            | 31 |
| 2.4.4.1 Calciumhomöostase .....   | 31 |
| 2.4.4.2 Funktionen außerhalb der Calciumhomöostase .....                    | 33 |
| 2.4.4.3 Tumorgenese und Metastasierung .....                                | 33 |
| 2.4.5 CaSR-Inhibitor NPS2143 .....  | 34 |
| 2.4.6 Bedeutung des CaSR für das Krankheitsbild der Endometriose .....      | 36 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.5     | Zielsetzung der Arbeit .....   | 38 |
| 3       | Material und Methoden .....  | 39 |
| 3.1     | Materialien .....  | 39 |
| 3.1.1   | Chemikalien .....  | 39 |
| 3.1.2   | Verbrauchsmaterialien .....  | 40 |
| 3.1.3   | Gebrauchsmaterialien .....   | 41 |
| 3.1.4   | Kit-Systeme .....  | 42 |
| 3.1.5   | Geräte .....   | 42 |
| 3.1.6   | Medien und Puffer .....  | 43 |
| 3.1.7   | Antikörper .....   | 44 |
| 3.1.8   | Computerprogramme .....  | 45 |
| 3.1.9   | Kontinuierliche Zelllinien .....   | 45 |
| 3.2     | Methoden .....   | 45 |
| 3.2.1   | Steriles Arbeiten .....  | 45 |
| 3.2.2   | Kultivierung humaner Zelllinien .....  | 45 |
| 3.2.3   | Zellkonzentrationsbestimmung .....   | 46 |
| 3.2.4   | Kryo-Konservierung und Rekultivierung .....  | 46 |
| 3.2.5   | Proteinanalyse .....   | 47 |
| 3.2.5.1 | Proteinextraktion aus Zellkulturen .....   | 47 |
| 3.2.5.2 | Proteinkonzentrationsbestimmung .....  | 48 |
| 3.2.5.3 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....                                     | 48 |
| 3.2.5.4 | Western-Blot .....   | 49 |
| 3.2.5.5 | Proteindetektion .....   | 50 |
| 3.2.6   | AlamarBlue™ -Zellviabilitäts-Assay .....   | 51 |
| 3.2.7   | Zellproliferations-Assay .....   | 52 |
| 3.2.8   | Chemotaktische Migration in der Boyden-Kammer .....                                      | 53 |
| 3.3     | Statistische Auswertung .....  | 55 |
| 4       | Ergebnisse .....   | 56 |
| 4.1     | Nachweis der CaSR-Expression im Western-Blot .....                                       | 56 |
| 4.2     | Zellviabilität unter Calcium- und FCS-Reduktion .....                                    | 56 |
| 4.3     | Zellviabilität nach CaCl <sub>2</sub> -Behandlung .....                                  | 59 |
| 4.4     | Zellproliferation nach Calcium-Behandlung .....  | 61 |
| 4.5     | Untersuchung von NPS2143 .....   | 61 |
| 4.6     | Zellproliferation nach CaCl <sub>2</sub> - und Inhibitorbehandlung .....                 | 62 |
| 4.7     | Chemotaktische Zellmigration nach CaCl <sub>2</sub> - und Inhibitor-<br>behandlung ..... | 64 |
| 5       | Diskussion .....   | 66 |
| 5.1     | Die Expression des CaSR in der Zelllinie 12Z .....                                       | 66 |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 5.2 | Der Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen auf die Zelllinie 12Z .....           | 66 |
| 5.3 | Die Bedeutung des CaSR für die Viabilität und Proliferation von Endometriose-<br>Zellen ..... | 68 |
| 5.4 | Der Einfluss des CaSR auf die chemotaktische Migration .....                                  | 70 |
| 5.5 | Ausblick .....  | 73 |
| 6   | Zusammenfassung.....  | 75 |
| 7   | Literaturverzeichnis .....  | 77 |
| 8   | Anhang .....  | VI |
| 8.1 | Werte zu den Abbildungen .....  | VI |

## Abkürzungsverzeichnis

|                   |  |
|-------------------|--|
| ARID1             | AT-rich interactive domain containing protein 1A     |
| ATP               | Adenosintriphosphat                                  |
| BMI               | <i>body mass index</i>                               |
| BrdU              | Bromdesoxyuridin                                     |
| cAMP              | zyklisches Adenosinmonophosphat                      |
| CaSR              | Calcium-sensitiver Rezeptor                          |
| CK 5/6/7          | Zytokeratin 5/6/7                                    |
| COPD              | chronic-obstructive-pulmonary-disease                |
| COX-2             | Cyclooxygenase-2                                     |
| CRD               | Cytosin-rich Domain des CaSR                         |
| DAG               | Diacylglycerin                                       |
| dH <sub>2</sub> O | Destilliertes Wasser                                 |
| DMEM-F12          | Dulbecco`s Modified Eagle Medium                     |
| DMEM-HAM`sF12     | Dulbecco`s Modified Eagle Medium ohne Calciumchlorid |
| DPBS              | Dulbecco`s Phosphate Buffer Saline                   |
| ECD               | Extracellular domain des CaSR                        |
| ELISA             | Enzyme-linked Immunosorbent Assay                    |
| ER                | Östrogenrezeptor                                     |
| FCS               | Fetal-calf-serum                                     |
| FSH               | Follikel-stimulierendes Hormon                       |
| GABA              | $\gamma$ -Aminobutyric-acid                          |
| GnRH              | Gonadotropin-releasing Hormon                        |
| ICSI              | Intrazytoplasmatische Spermieninjektion              |
| IL-1, IL-6, IL-8  | Interleukin 1, 6 oder 8                              |

## Abkürzungsverzeichnis

|                  |  |
|------------------|--|
| IUP              | Intrauterinpessar                      |
| IP <sub>3</sub>  | Inositoltriphosphat                    |
| IVF              | In-vitro-Fertilisation                 |
| KHK              | Koronare Herzkrankheit                 |
| KOK              | Kombinierte orale Kontrazeption        |
| K-ras            | Kirsten-rat-sarcoma-viral-oncogen      |
| LB1/2            | Lobe-1 / Lobe-2 des CaSR               |
| LH               | Luteinisierendes Hormon                |
| MAPK             | Mitogen-activated-protein Kinase       |
| MMP              | Matrixmetalloprotease                  |
| PAGE             | Polyacrylamid-Gelelektrophorese        |
| PGE <sub>2</sub> | Prostaglandin E <sub>2</sub>           |
| pH               | potentia hydrogenii                    |
| PI3K             | Phosphatidylinositol-3-Kinase          |
| PIP <sub>2</sub> | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat   |
| PKA              | Protein Kinase-A                       |
| PKC              | Protein Kinase-C                       |
| PLC-β            | Phospholipase-C β                      |
| PR-A/B           | Progesteronrezeptor A oder B           |
| PRM              | Progesteron-Rezeptor Modulator         |
| P/S              | Penicillin/-Streptomycin               |
| rER              | Raues Endoplasmatisches Retikulum      |
| SDS              | Sodium-Dodecyl-Sulfat                  |
| SERM             | Selektiver Östrogen-Rezeptor Modulator |
| StAR             | Steroidogenic-acute-regulatory-protein |
| STC-1            | Stanniocalcin-1                        |

## Abkürzungsverzeichnis

|               |                                  |
|---------------|----------------------------------|
| TIE           | Tief infiltrierende Endometriose |
| TNF- $\alpha$ | Tumor-necrose-factor $\alpha$    |
| TP53          | Tumor-protein 53                 |
| VFT           | Venus-flytrap des CaSR           |
| ZNS           | Zentrales Nervensystem           |

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Lokalisationen der Endometriose und ihr histologisches Erscheinungsbild.
- Abbildung 2 Mechanismus der Autotraumatisierung des Uterus.
- Abbildung 3 Lokal veränderte Mikroumgebung bei Endometriose.
- Abbildung 4 rASRM-Klassifikation der Endometriose.
- Abbildung 5 Enzian-Klassifikation der Endometriose.
- Abbildung 6 Schematischer Aufbau des CaSR und der VFT.
- Abbildung 7 Die verschiedenen Signalwege des CaSR.
- Abbildung 8 Mechanismen des biased-Agonismus und der biased-Modulation.
- Abbildung 9 Strukturformel von NPS2143.
- Abbildung 10 Der Einfluss von NPS2143 auf den CaSR.
- Abbildung 11 Proteinexpression des CaSR in der Zelllinie 12Z.
- Abbildung 12 Zellviabilität der Zelllinie 12Z bei zunehmender Reduktion von Calcium mittels des Calcium-freien DMEM-HAM's-F12 in serumfreien (A) bzw. serum-reduzierten (B) Medium.
- Abbildung 13 Zellviabilität der Zelllinie 12Z unter dem Einfluss steigender  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen bei unterschiedlicher Inkubationszeit in dreifacher Replikation.
- Abbildung 14 Zellproliferation der Zelllinie 12Z unter Einfluss steigender  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen in dreifacher Replikation..
- Abbildung 15 Zellviabilität der Zelllinie 12Z nach Blockade des CaSR mithilfe steigender Konzentrationen des Inhibitors NPS2143 in dreifacher Replikation.
- Abbildung 16 Einfluss einer  $\text{CaCl}_2$ - und NPS2143-Behandlung auf die Zellproliferation der Zelllinie 12Z in dreifacher Replikation.
- Abbildung 17 Chemotaktische Migration der Zelllinie 12Z nach Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$  und dem CaSR-Inhibitor NPS2143 in serumfreien und Calcium-reduzierten Nährmedien (dreifache Replikation).

## Tabellenverzeichnis

|            |  |
|------------|--|
| Tabelle 1  | Verwendete Chemikalien   |
| Tabelle 2  | Verwendete Verbrauchsmaterialien   |
| Tabelle 3  | Verwendete Gebrauchsmaterialien  |
| Tabelle 4  | Verwendete Kit-Systeme   |
| Tabelle 5  | Verwendete Geräte  |
| Tabelle 6  | Verwendete Medien und Puffer   |
| Tabelle 7  | Verwendete Antikörper  |
| Tabelle 8  | Verwendete Computerprogramme   |
| Tabelle 9  | Pipettierschema SDS-PAGE für 2 Gele  |
| Tabelle 10 | CaCl <sub>2</sub> - Konzentrationen für den AlamarBlue <sup>TM</sup> -Zellviabilitäts-Assay (angesetzt in einem FCS- und Calcium-reduzierten Medium)             |
| Tabelle 11 | NPS2143-Konzentrationen für den AlamarBlue <sup>TM</sup> -Zellviabilitäts-Assay (angesetzt in einem FCS- und Calcium-reduzierten Medium)                         |
| Tabelle 12 | CaCl <sub>2</sub> -Konzentrationen für den Zellproliferations-Assay (angesetzt in einem FCS- und CaCl <sub>2</sub> -reduzierten Medium)                          |
| Tabelle 13 | Kombinierte CaCl <sub>2</sub> - und NPS2143-Konzentrationen für den Zellproliferations-Assay (angesetzt in einem FCS- und CaCl <sub>2</sub> -reduzierten Medium) |
| Tabelle 14 | CaCl <sub>2</sub> - und NPS-Konzentrationen für die chemotaktische Migration (angesetzt in einem FCS- und CaCl <sub>2</sub> -reduzierten Medium)                 |
| Tabelle 15 | Werte der Abbildung 11   |
| Tabelle 16 | Werte der Abbildung 12 A   |
| Tabelle 17 | Werte der Abbildung 12 B   |
| Tabelle 18 | Werte der Abbildung 13 A   |
| Tabelle 19 | Werte der Abbildung 13 B   |
| Tabelle 20 | Werte der Abbildung 14   |
| Tabelle 21 | Werte der Abbildung 15   |
| Tabelle 22 | Werte der Abbildung 16   |
| Tabelle 23 | Werte der Abbildung 17   |

## 1 Einleitung

Die als „*disease of theories*“ in der Literatur beschriebene Erkrankung Endometriose (1) ist Gegenstand intensiver Forschung. Die Beschreibung „*disease of theories*“ soll verdeutlichen, wie unklar und vielfach diskutiert die Pathogenese der Erkrankung ist. Der Begriff Endometriose leitet sich von den altgriechischen Worten ἔνδον (endon = „innen“), μέτρα (metra = „Gebärmutter“) und ωσις (osis = „Erkrankung“) ab und beschreibt damit einen häufigen Manifestationsort des Krankheitsbilds (2). Klinische Aspekte der Erkrankung wurden erstmals vom deutschen Arzt Schrön im 17. Jahrhundert beschrieben (3). Jedoch prägte der amerikanische Gynäkologe John A. Sampson den Begriff Endometriose erst mehrere Jahrhunderte später (4).

Bei der Endometriose handelt sich um ein benignes, inflammatorisches Krankheitsbild, dessen Läsionen mit tumorassoziierten Merkmalen wie lokaler Invasion und Apoptose-Resistenz einhergehen (5). Rund 5-15 % der prämenopausalen Frauen sind betroffen (6) (7) (8), wobei die Prävalenz bei Frauen mit Infertilität deutlich höher liegt (9). Keine einzelne Theorie kann alle Facetten der Pathogenese der Endometriose hinreichend erklären, weshalb eine Kombination aus verschiedenen Erklärungsansätzen angenommen wird (10) (11). Ein Teil der Komplexität der Erkrankung besteht in den variabel ausgeprägten Lokalisationen und damit einhergehenden vielseitigen Beschwerden. Zwar sind intra- oder extragenitale Läsionen am häufigsten, aber prinzipiell können Endometriose-Herde am ganzen Körper auftreten. Beschwerden wie starke Schmerzen, urologische und intestinale Symptome und nicht zuletzt die psychosoziale Komponente sowie ein unerfüllter Kinderwunsch stellen eine enorme Belastung für Betroffene dar (7).

Nicht nur klinische, sondern auch soziale Belastungen gehen mit der Endometriose einher, sodass die Beschäftigung mit diesem Krankheitsbild und seiner Pathogenese von hoher Relevanz ist. Durchschnittlich erfolgt die Diagnosestellung in Deutschland oder Österreich erst nach 10 Jahren (12). Einerseits können sich die Symptome aufgrund des unterschiedlichen Befallsmusters unspezifisch äußern (1), was die Diagnostik erschweren kann, andererseits werden Beschwerden von Betroffenen und deren Umfeld vielfach normalisiert und nicht ernst genommen (13) (14). Ein langer Leidensweg hinsichtlich Diagnose und Beschwerdebild kann eine enorme psychische Belastung für Frauen sein, sodass psychische Erkrankungen nach Diagnosestellung gehäuft auftreten (15). Patientinnen profitieren bei einer gesicherten Diagnose nicht nur von einer symptomlindernden Therapie, sie können auch endlich ihrem Umfeld die Gründe für mögliches Fernbleiben am Arbeitsplatz oder Unpässlichkeiten bei sozialen Aktivitäten erläutern. Folglich ist es das Ziel, einen kausalen Therapieansatz zu finden

## Einleitung

und die bestehenden diagnostischen Optionen zu verbessern. Haben die Beschwerden einen Namen und sind medizinisch diagnostiziert, ist ein Austausch mit anderen Betroffenen sowie mit Medizinern anderer Fachgebiete leichter möglich. Vor allem aber bringt die sichere Diagnose einer benignen Erkrankung den Betroffenen Erleichterung. Herrscht doch bei vielen von Ihnen – vor allem bei längerer Unklarheit – die Angst vor einem malignen Geschehen vor.

Zusätzlich stellt dieses Krankheitsbild eine große finanzielle Belastung des Gesundheitssystems dar (9). In Deutschland betragen die Gesamtkosten für die mit Endometriose assoziierten Behandlungen im Jahr 2006 rund 41 Millionen Euro (16). Eine multizentrische Studie in Europa zeigte, dass sich die durchschnittlichen Kosten für eine erkrankte Person im Jahr 2008 auf etwa 10.000 Euro beliefen, wobei nicht nur direkte Kosten durch medizinische Behandlungen, sondern auch indirekte Kosten durch Ausfälle am Arbeitsplatz aufgrund eingeschränkter Leistungsfähigkeit berücksichtigt wurden (17) (18). Beide Kostenpunkte müssen von Betroffenen teils selbst aufgewendet werden, sodass sich im jährlichen Durchschnitt 4233,81€ Selbstzahlerkosten ergeben können (19).

Sowohl die Belastungen für Patientinnen als auch die Belastungen des Gesundheitssystems zeigen deutlich, wie relevant weitere Forschungen zu Endometriose sind. Obwohl seit der erstmaligen Beschreibung im 17. Jahrhundert schon viele Informationen gewonnen werden konnten, bleibt die Forschungsrelevanz ungebrochen. Wie oben erwähnt, zeichnet sich das Krankheitsbild der Endometriose durch Invasivität und tumor-ähnliches Verhalten aus (5). Ein Rezeptor, dessen Rolle in diesen Zellprozessen bekannt ist, ist der Calcium-sensitive Rezeptor (CaSR) (20). Vorangegangene Studien wiesen dem CaSR wichtige Funktionen in der Pathogenese unterschiedlicher Krankheitsbilder und Tumoren zu (20) (21). Für die Ableitung diagnostischer und therapeutischer Konsequenzen, bezogen auf die Endometriose, ist es von besonderer Bedeutung, die Dimensionen der Erkrankung auf molekularer Ebene zu erfassen. Die Rolle des CaSR für die Erkrankung Endometriose ist derzeit noch nicht verstanden. Allerdings liegen Ergebnisse aus dem Labor der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit der Universitätsmedizin Mainz vor, die die Relevanz des CaSR für die Progression des Ovarialkarzinoms belegen (nicht publiziert). Da die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms aus bestehenden Endometriose-Läsionen möglich ist (22), sollte auch eine Betrachtung des CaSR im Kontext der Endometriose erfolgen. Zunächst soll im Rahmen dieser Arbeit der Nachweis des CaSR im Endometriose-Gewebe auf molekulargenetischer Ebene erfolgen. Anschließend soll die Relevanz des Rezeptors für Prozesse des funktionellen Zellverhaltens untersucht werden, um Aussagen über die Progression des Krankheitsbilds ableiten zu können.

## Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Einfluss des CaSR auf die Mechanismen Zellviabilität, Zellproliferation und Zellmigration der Endometriose-Zelllinie 12Z analysiert. Bei diesen Versuchen wird mit unterschiedlichen Calciumkonzentrationen gearbeitet, da Calcium für die strukturelle Integrität des Rezeptors und seine Aktivierung relevant ist ([23](#)). Die beobachteten Effekte sollen durch Blockade des Rezeptors mit seinem Inhibitor NPS2143 bestätigt werden.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Die Endometriose

#### 2.1.1 Epidemiologie

Bei der Endometriose handelt es sich um eine benigne Erkrankung, die 10-15 % der Frauen im reproduktiven Alter betrifft (6, 24) (25), wobei die Erkrankung aufgrund ihrer Abhängigkeit von ovariell produzierten Steroiden zwischen dem 25. und 35. Lebensjahr einen Altersgipfel aufweist (25). Die Anzahl der Betroffenen unter queeren Personen ist aktuell nicht genau bekannt (26). Mit Beginn der Menopause ist das Beschwerdebild rückläufig, da postmenopausal eine Abnahme des östrogenabhängigen Gewebes stattfindet (26). Es liegt eine familiäre Häufung vor, sodass sich das Risiko zu erkranken bei Verwandten ersten Grades bis zu 7-fach erhöht (2) (25). Obwohl fast ausschließlich Frauen betroffen sind, werden in der Literatur einige wenige Fälle von erkrankten Männern beschrieben. Bei einigen trat die Endometriose am Urogenitaltrakt auf, nachdem eine langjährige Östrogentherapie aufgrund eines Prostatakarzinoms vorausgegangen war (27) (28). Andere wenige Beispiele beschreiben Endometriose-Befunde bei Patienten mit wiederholten Operationen einer Leistenhernie (29) (30). Nach histologischer Untersuchung konnte in diesen Fällen entnommenes Gewebe als endometrioides Stroma und Epithel identifiziert werden (29) (30).

Wird hingegen die Prävalenz der Endometriose bei infertilen Frauen betrachtet, liegt diese bei 30-50 % (26, 31). Ursächlich hierfür sind unter anderem Fibrosen und Verwachsungen, hervorgerufen durch Endometriose-Läsionen, welche die Tuben sekundär verschließen können (25, 32). Außerdem ist die Prävalenz bei Patientinnen mit Endometriose-assoziierten Symptomen erhöht, sodass beispielsweise rund 45 % der Frauen mit unspezifischen abdominellen Beschwerden von der Erkrankung betroffen sind (33). Es ist anzunehmen, dass die wahre Prävalenz höher liegt als beschrieben, da einige Betroffene asymptomatisch sind, orale Kontrazeptiva einnehmen (14) oder eine ärztliche Abklärung trotz bestehender Beschwerden aufgrund sozialen Druckes nicht wahrnehmen.

#### 2.1.2 Lokalisation

Das Befallsmuster der Endometriose kann sehr variabel ausgeprägt sein und theoretisch alle Körperregionen betreffen. Grundsätzlich wird zwischen genitalen, extragenitalen und extraabdominellen Läsionen unterschieden (34). Bei genitalen Läsionen werden Uterus, Ovarien oder Tuben am häufigsten befallen, seltener die Vagina oder das Septum rectovaginale (35). An befallenen Ovarien bilden sich typischerweise große blutgefüllte Zysten aus, die aufgrund

ihrer braunen Farbe auch als „Schokoladenzysten“ bezeichnet werden (2). Bei der Adenomyosis uteri handelt es sich um das Auftreten von endometrioiden Drüsenkörpern und Stroma-Gewebe in der Muskelschicht des Uterus (36), wobei periläsional eine reaktive Proliferation des Myometriums vorliegt (35). Entzündungsreaktionen und eine Hypertrophie der glatten Muskelzellen des Myometriums kommen ebenso vor (37). Inzwischen wird die Adenomyosis uteri, bei der endometriales Gewebe in der Gebärmuttermuskulatur vorkommt, als eigenständiges Krankheitsbild angesehen, obwohl sich viele Krankheitsmerkmale mit der Endometriose überschneiden (36).

Die Endometriose beschränkt sich nicht nur auf die Genitalorgane, vielmehr kann sie auch benachbarte Organe des Uterus invasiv befallen, wie beispielsweise den Gastrointestinaltrakt oder Douglas-Raum (Abbildung 1) (1). Bei rund 10 % der Betroffenen werden Darmabschnitte befallen, darunter am häufigsten Kolon sigmoideum, dann Rektum und Appendix vermiformis (1) (35). Die peritonealen Läsionen variieren hinsichtlich ihrer Größe und farbllichem Erscheinungsbild zwischen Rot, Braun, Weiß oder Schwarz, wobei die Farbe keinen Rückschluss auf die Aktivität derselben erlaubt (35). Beträgt die Implantationstiefe des Gewebes mindestens 5 mm, wurde in früheren Zeiten von einer tief infiltrierenden Endometriose (TIE) gesprochen (38) (39) (40). Eine eindeutigere Klassifikation wird erzielt, wenn die Läsionen als Adenomyosis externa mit Befall von Ligamenten, Vagina, Ureteren oder Harnblase beschrieben wird (7). Bei etwa 20 % der Endometriose-Patientinnen liegt eine TIE vor (41). Derzeit wird diskutiert, ob den oberflächlichen und tiefen Läsionen der Endometriose derselbe Pathomechanismus zugrunde liegt (42). Invasive Mechanismen durch Matrixmetalloproteasen (MMP) scheinen bei TIE ebenso verstärkt aufzutreten wie proliferative Signale, beispielsweise durch NF- $\kappa$ B vermittelt (42). Die Apoptose wird hingegen herunterreguliert (10, 42).

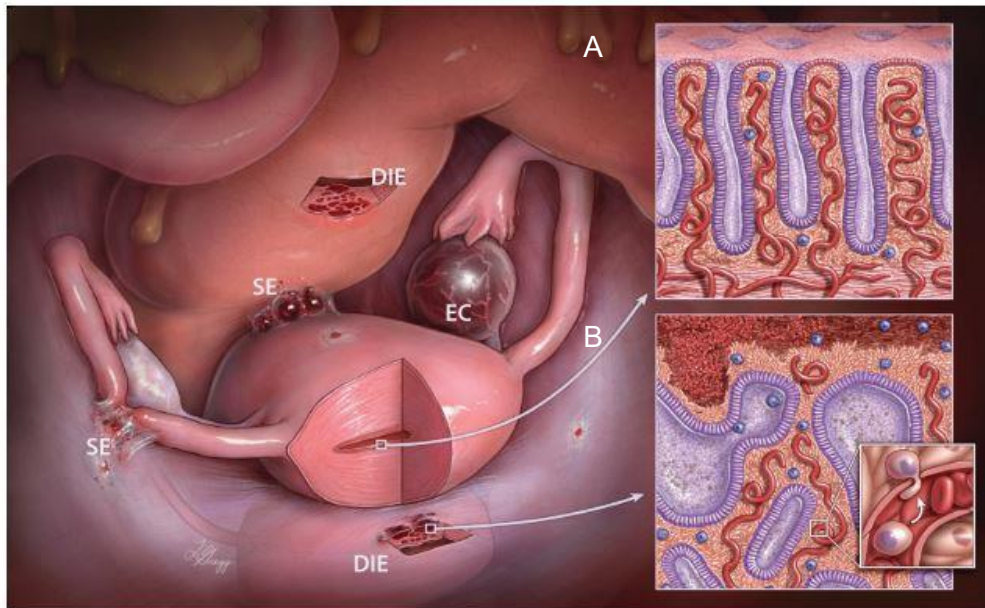


Abbildung 1 Lokalisationen der Endometriose und ihr histologisches Erscheinungsbild. Verschiedene Lokalisationen an Organen und der Peritonealhöhle werden gezeigt. „DIE“ (*deep infiltrating endometriosis*) - tief infiltrierende Endometriose-Läsionen am Darm oder an der Bauchwand; „EC“ (*endometriotic cyst*) - endometrioides Zysten am Ovar; „SE“ (*superficial endometriosis*) - oberflächliche Läsionen an Ligamenten oder im Douglas-Raum. Teil A zeigt ein histologisches Schema des normalen Endometriums, Teil B die histologischen Charakteristika der Endometriose-Läsionen. Hierbei zeigen sich sowohl epitheliale als auch stromale Anteile. *Abbildung modifiziert nach Wang et al. (43).*

Auch die Organe des harnbildenden und harnableitenden Systems können von peritonealer Endometriose befallen werden, mit 1-2 % jedoch deutlich seltener (1) (35). Am häufigsten zeigt sich ein Befall der Harnblase, der oft mit einer TIE assoziiert ist und bis in die Muskelschicht des Organs reicht (38) (44). Ferner ist ein Befall der Ureteren möglich, wobei meistens der linke Ureter im unteren Drittel betroffen ist (1) (38). Als Ursache hierfür wird die räumliche Nähe zum Kolon sigmoideum, einem häufigen Lokalisationsort der Endometriose, vermutet. Es werden zwei Formen des ureteren Befalls unterschieden: Die häufigere Ummauerung des Ureters mit Endometriose-Zellen und die seltenere Muskelschichtinfiltration. Darüber hinaus ist in seltenen Fällen ein Befall der Nieren möglich, wodurch es zur klinisch bedeutsamen Komplikation einer stillen obstruktiven Uropathie kommen kann (1), die schlimmstenfalls zum Funktionsverlust der Niere führt.

Noch seltener sind extraabdominelle Lokalisationen, wobei diese zumeist bei älteren Patientinnen zwischen dem 34. und 40. Lebensjahr vorzufinden sind (1). Bei einem Befall des Thorax wird vom TES (thorakalem Endometriose-Syndrom) gesprochen, welches Pleura, Diaphragma oder Lungenparenchym betreffen kann (35). Extrem selten finden sich Manifestationsorte an Magen, Gallenblase oder Leber (1). Als häufigster Lokalisationsort einer

kutanen Endometriose gilt der Nabel (45) (46), auch *Villar's node* genannt, aufgrund der erstmalig 1886 erfolgten Beschreibung durch Villar (6). Bei dieser Lokalisation wird, wie bei anderen kutanen Manifestationsorten, zwischen primärer oder sekundärer Läsion unterschieden. Sekundäre Läsionen sind Endometriose-Herde an Hautnarben (47) (48), wenn als Ursache des Narbenbefalls eine iatrogene Verschleppung der Endometriose-Zellen während einer vorangegangenen Operation angenommen wird (47). Klassischerweise sind diese Läsionen an Narben nach Sectio caesarea oder Hysterektomie zu finden, jedoch erklärt die Theorie der iatrogenen Verschleppung nicht die geringe Inzidenz, die nach Hysterektomien ohne vorbestehende Endometriose-Diagnose lediglich bei 1,4 % liegt (48).

### 2.1.3 Die Pathogenese der Endometriose

Bis zum heutigen Tag ist die Pathogenese der Endometriose nicht gänzlich aufgeklärt und wahrscheinlich handelt es sich um eine Kombination unterschiedlicher Einflüsse, die zum Entstehen des Krankheitsbildes führen. Grundsätzlich unterliegen die Läsionen zyklischer Proliferation und Abstoßung unter Einfluss des Östrogens, ähnlich dem eutopen Endometrium (34). Östradiol 17- $\beta$ , das potenteste Östrogen, spielt eine wichtige Rolle und wird in den Läsionen der Endometriose verstärkt produziert (24). Im normalen Menstruationszyklus baut sich das Endometrium unter Östrogeneinfluss auf und Progesteronrezeptoren werden ausgebildet. Progesteron wiederum stoppt das Wachstum und induziert eine Änderung des Drüsencharakters in Vorbereitung auf die Implantation (49). Schließlich wird durch schlagartiges Absinken der Östrogen- und Progesteronspiegel das Endometrium abgestoßen (49). Bei einem normalem Progesteron-Gehalt sezernieren die Stromazellen des Endometriums parakrine Faktoren, die in den Epithelzellen das Enzym 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase 2 induzieren, welches Östradiol in Östron umwandeln kann (43). Östron ist weniger wirksam als Östradiol. Durch reduzierte Progesteronspiegel, wie sie bei Endometriose vorkommen, wird dieser enzymatische Umbau verhindert und der Östradiol-Spiegel erhöht sich somit indirekt (42) (50).

Die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase 1 wird hingegen verstärkt exprimiert, sodass die Östradiol-Konzentration zusätzlich erhöht wird (42). Außerdem wurde eine erhöhte Aromatase-Aktivität im Endometriose-Gewebe nachgewiesen, sodass die Biosynthese des Östradiols in hohem Maße stattfindet (42, 43). Verschiedene Ursachen scheinen an der Entwicklung der Progesteron-Resistenz, wie sie bei Endometriose beobachtet wird (51) beteiligt zu sein. Hierbei werden noch nicht alle Mechanismen gänzlich verstanden (50).

Es gibt Hinweise auf eine kongenitale Disposition, die unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann und nach der Pubertät persistiert (50). Außerdem werden Entzündungsmediatoren wie Zytokine und MMP durch die niedrigen Progesteronspiegel bei fehlender Schwangerschaft verstärkt exprimiert. Eine Dysregulation der Progesteronrezeptoren (PR) im eutopen Endometrium unterstreicht die beschriebenen Mechanismen (42). Der PR-A, der eine geringere Aktivität aufweist, wird in Läsionen der Endometriose stärker exprimiert. Die Isoform B des Progesteronrezeptors wird vermindert exprimiert, sodass ein Verlust von parakrinen Signalen resultiert (50) (52) (53). Bei der Expression der Östrogenrezeptoren (ER) zeigt sich eine verstärkte Expression der Isoform  $\beta$  in Läsionen der Endometriose (53). Dies supprimiert die Expression von ER- $\alpha$ , sodass sich der Quotient zwischen beiden Rezeptorformen vergrößert. Dadurch kommt es zu einer Östradiol-vermittelten Inhibition der Progesteronrezeptor-Expression (53) (54). Dieser Mechanismus scheint ein weiterer relevanter Faktor für die Entwicklung der Progesteronresistenz zu sein (42).

### 2.1.3.1 Transplantationstheorie

Sampson wies bereits 1927 Gewebe des Endometriums in ektopen Gefäßen nach und schloss daraus, dass eine Dissemination des Gewebes in die Bauchhöhle durch retrograd fließendes Blut bei jeder Menstruation möglich sein könnte (4). Halme *et al.* gelang es, die retrograde Menstruation vitaler Endometrium-Zellen als physiologischen Prozess bei 90 % der Frauen festzustellen (55) (56). Bei Frauen konnten in der ersten Zyklushälfte vitale Endometrium-Zellen, wie zum Beispiel Zellen aus dem Stroma, in der Peritonealflüssigkeit nachgewiesen werden (57). Sampsons Theorie legt außerdem nahe, dass sich Endometrium-Zellen auch über Blut- und Lymphgefäße im Körper ausbreiten und so in entfernte Körperbereiche vordringen können (4). Diese Dissemination von eutopem endometrioidem Gewebe ähnelt einer Metastasierung, wie sie bei Tumoren zu finden ist. Wenn es zur retrograden Menstruation kommt, können Endometrium-Zellen nach Ruptur des Corpus luteum Zugang zum Ovar erhalten. Nach dortiger Implantation erfolgt die Versorgung über räumlich benachbarte Zellen (43). Auf diesem Wege könnte es zur Entstehung der sogenannten „Schokoladenzysten“ am Ovar kommen (43). Diese Theorie kann oberflächliche peritoneale Läsionen erklären. Es stellt sich jedoch die Frage, warum nur 10 - 15 % der Frauen mit retrograder Menstruation eine Endometriose entwickeln und die Zahl der Betroffenen nicht viel höher liegt (52). Aufgrund dieser Unterschiede in der Häufigkeit der Erkrankung wird eine multifaktorielle Genese angenommen (25), zumal sich durch Sampsons Theorie das Auftreten von Läsionen außerhalb des Peritoneums nicht abschließend erklären lässt.

### 2.1.3.2 Archimetra-Konzept

Laut der Theorie von Leyendecker et al. kommt es zu einem funktionellen Ungleichgewicht der Uterusperistaltik, sodass rezidivierende Autotraumatisierungen eine Krankheits-Entstehung ermöglichen (58) (59). Die Endometriose wird als eine Erkrankung der Archimetra verstanden, welche eine embryologisch alte Struktur des Uterus darstellt. Sie besteht aus Epithel und Stroma des Endometriums sowie aus dem Stratum subvasculare des Myometriums (58) (59). Die Rezeptorexpression unterliegt in diesen Strukturen den Schwankungen des Monatszyklus. In der Neometra hingegen, den beiden äußeren Muskelschichten bestehend aus Stratum vasculare und supravasculare, liegt eine kontinuierlich hohe Rezeptorexpression vor (59). Die Archimetra ist paramesonephrischen Ursprungs, die Neometra hingegen entstammt embryologisch nicht aus den Müller-Gängen.

Im Uterus herrscht eine ständige Peristaltik, welche die Fertilität überhaupt erst ermöglicht und in verschiedenen Zyklusphasen unterschiedlich stark ausgeprägt ist (59) (60). Ein Hyperöstrogenismus in der Archimetra, wie er im Menstruationsblut von Betroffenen nachgewiesen werden konnte, induziert eine Hyperperistaltik des Uterus (58). Diese archimetrale Funktionsstörung im Sinne einer Dysperistaltik führt zu wiederholten Autotraumatisierungen, die auf den erhöhten Druck am Stratum basale und auf eine zunehmende Kontraktionsfrequenz zurückzuführen sind (61). Aufgrund dieser Traumatisierungen des Uterus kommt es zur Ablösung basaler Fragmente und deren infiltratives Wachstum ins Myometrium wird ermöglicht.

Außerdem kann es zu einer Hypermenorrhoe von tiefem Endometrium kommen, sodass die retrograde Menstruation verstärkt wird (58) (59). In diesem Kontext wird von *tissue injury and repair* (TIAR) gesprochen. Durch die zunehmende mechanische Beanspruchung wird die Cyclooxygenase-2 (COX-2) aktiviert und damit die Produktion von Prostaglandin-E2 (PGE2) ermöglicht (61). Im Folgenden wird das Enzym Aromatase-P450 zur Synthese von Östradiol angeregt, wobei *Steroidogenic acute regulatory* Proteine (StAR) ebenfalls beteiligt sind (Abbildung 2). Die lokale Östrogenproduktion im Sinne eines *Circulus vitiosus* wird im Falle einer Dehnung oder Verletzung von Myozyten oder Fibroblasten gefördert (58). Zudem wirken sich iatrogene Verletzungen des Uterus zusätzlich risikoverstärkend aus (58).

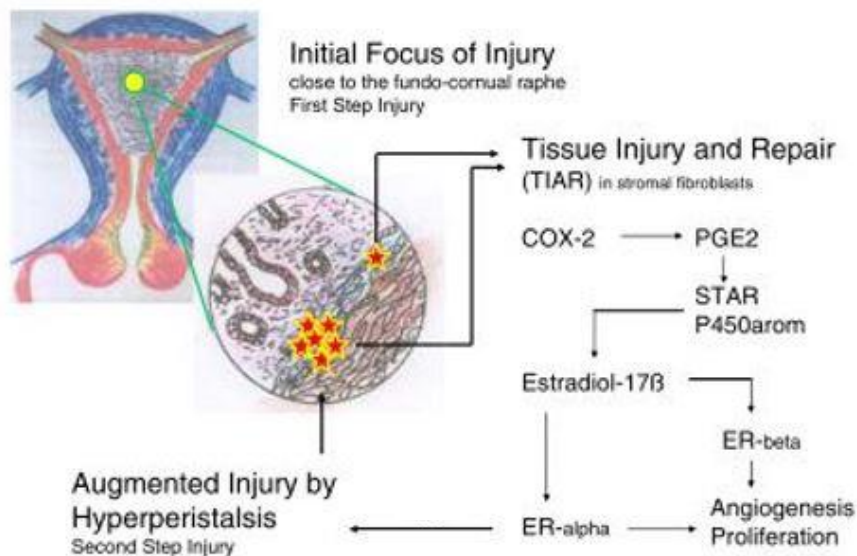


Abbildung 2 Mechanismus der Autotraumatisierung des Uterus. Mechanische Beanspruchung bewirkt eine Induktion der Cyclooxygenase-2 (COX 2), welche über die Synthese von Prostaglandin-E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und die Aktivierung von *steroidogenic acute regulatory* Proteinen (StAR) die Östrogensynthese unterstützt. Mittels des Hormons Östradiol-17β kommt es zur Aktivierung des Östrogenrezeptors α (ER α) beziehungsweise β. Dies führt zur Verstärkung der Entzündung und zu einer Hyperperistaltik. *Modifiziert nach Leyendecker et al. (58).*

### 2.1.3.3 Stammzelltheorie

Derzeit wird diskutiert, welchen Einfluss Stammzellen auf die Pathogenese der Endometriose haben. Stammzellen des uterinen Endometriums oder des Knochenmarks können durch Veränderungen der Mikroumgebung zu Adhäsion und Invasion angeregt werden (43). Im normalen Endometrium kommen epitheliale, mesenchymale und Stammzellen gemischten Ursprungs vor.

Die mesenchymalen Stammzellen befinden sich in den perivaskulären Regionen des Stratum basale und Stratum functionale (43), die epithelialen Stammzellen entstammen möglicherweise dem Stratum functionale des Endometriums (62). An dieser Stelle sind sie geschützt vor der Menstruation und in der Lage, das Epithel des Stratum functionale unter Östrogeneinfluss zu regenerieren. Außerdem nimmt bei der Menstruation die Anzahl der zirkulierenden hämatopoetischen, mesenchymalen und endothelialen Progenitor-Zellen zu und es wird diskutiert, ob diese einen Beitrag zur Regeneration des Endometriums leisten (25) (43). Bei einer räumlichen Dissemination dieses Gewebes könnten sich Herde außerhalb des Peritoneums, zum Beispiel in Lunge oder ZNS, entwickeln (25). Dies könnte auch ein Erklärungsansatz für das Auftreten von Endometriose bei Männern sein: Im Mausmodell wurden männliche Stammzellen in ein Weibchen eingeführt. Anhand des vorhandenen

Y-Chromosoms gelang ein epithelialer und stromaler Nachweis der Stammzellen im Endometrium des Weibchens (25) (62). Diese Theorie passt zur These der retrograden Menstruation und zur Entstehung von TIE, denn die Stammzellen könnten während der Menstruation durch passive Invasion in Gefäße gelangen und sich verbreiten (43). Außerdem wird der Erwerb der Progesteronresistenz von mesenchymalen Stammzellen diskutiert, was durch *in-vitro* Versuche belegt werden konnte (50).

Die Entwicklung pluripotenter Zölon-Zellen der Urogenitalfalte durch Metaplasie in Endometrium-Zellen wird durch die Metaplasie-Theorie nach Meyer beschrieben. Hierbei liegen hormonelle und entzündliche Ursachen zugrunde (57) (63). Durch die einsetzende hormonelle Stimulation mit Östrogenen in der Pubertät differenzieren sich diese Zellen in Endometrium (10). Heutzutage werden epigenetische Veränderungen als Grundlage der Metaplasie angenommen, teilweise liegen sie seit der Geburt vor oder kommen im Laufe des Lebens hinzu (49) (64). So lassen sich Herde in der Bauchhöhle ebenso wie rektovaginale Läsionen erklären, die auf eine Metaplasie des Müller-Gangepithels zurückgeführt werden könnten (65).

### 2.1.3.4 Veränderungen der lokalen Mikroumgebung und des Immunsystems

Bei Endometriose-Patientinnen konnten Veränderungen der lokalen Mikroumgebung, des Immunsystems und entzündliche Prozesse nachgewiesen werden (66). Es wird vermutet, dass diese Mechanismen ineinandergreifen und für eine Aufrechterhaltung oder gar Progression der Erkrankung verantwortlich sind (67). Dafür spricht der Nachweis erhöhter Konzentrationen einiger Zytokine wie IL-1, IL-6 oder IL-8 und TNF- $\alpha$  in der Peritonealflüssigkeit der Betroffenen (66) (68) (69).

Die Peritonealflüssigkeit bildet sich aus ovariellern Exsudat bei Entwicklung des Corpus luteum. Zusätzlich nimmt das Volumen aufgrund einer gesteigerten Kapillarpermeabilität zu, die durch lokal erhöhte Östrogenspiegel hervorgerufen wird (70). Die Zusammensetzung der Peritonealflüssigkeit ähnelt dem Plasma, wobei die Spiegel an ovariellen Steroiden erhöht sind und die Konzentration großer Moleküle erniedrigt ist (70). Bei Endometriose-Patientinnen ist das Volumen der Peritonealflüssigkeit ebenso erhöht (71) wie der PGE2-Spiegel in dieser Flüssigkeit (72). Zelluläre Bestandteile wie Lymphozyten und Makrophagen werden in großer Zahl gefunden und sind für die Synthese von Zytokinen verantwortlich (66, 71). Die erhöhten Zytokin-Spiegel wirken sich auf verschiedene Mechanismen des funktionellen Zellverhaltens aus. So kann IL-4 die Apoptose in Läsionen verhindern und IL-1 ermöglicht die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen oder die Expression von MMP und fördert so eine Invasion (67). Die

MMP-2 scheint dabei eine besondere Rolle für die Pathogenese der Endometriose zu spielen (73, 74). Ihre Konzentration in der Peritonealflüssigkeit ist erhöht und ermöglicht eine Invasion und Wachstum der Läsionen mittels Abbau der extrazellulären Matrix (73, 74). Außerdem induziert IL-1 die Sekretion von PGE<sub>2</sub> durch das Enzym COX-2, sodass inflammatorische Prozesse verstärkt werden (Abbildung 3). Des Weiteren wird die Beteiligung calciumbindender Proteine an den entzündlichen Prozessen diskutiert (75). Diese agieren als Calciumpuffer oder Sensoren und können neuronale Aktivitäten modulieren, was für die Nozizeption relevant ist (75). Es hat sich gezeigt, dass beispielsweise Calbindin oder Calretinin in der Peritonealflüssigkeit von Betroffenen hochreguliert sind (75). Ihre exakte Rolle für die Nozizeption bleibt jedoch Diskussionsgegenstand.

Unklar scheint, ob die Entzündung ursächlich für die Entstehung der Endometriose ist oder nur als Symptom der Erkrankung verstanden werden kann. Sicher ist, dass sich bei Betroffenen erhöhte Spiegel an Entzündungsmediatoren wie COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-8 oder PGE<sub>2</sub> finden lassen (43, 52) (76). Es gibt Hinweise darauf, dass sich das eutope Endometrium von Frauen mit Endometriose hinsichtlich der COX-2-Aktivität und dem Vorkommen von Entzündungszellen vom eutopen Endometrium gesunder Frauen unterscheidet (43). An den Manifestationsorten und in deren Umgebung sind Entzündungszellen wie B-Lymphozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen und regulatorische T-Zellen weit verbreitet (67). Nimmt der Körper das Vorkommen von ektopem Endometrium wahr, wird das Immunsystem aktiviert und greift die Läsionen an. Da das Gewebe jedoch nicht abgestoßen werden kann, akkumuliert das Blut in Zysten und muss mittels der Fenton-Reaktion abgebaut werden (43). Die dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies tragen zu einer weiteren Progression inflammatorischer Prozesse bei (43) (66).

Die vorhandenen NK-Zellen können von verminderter Qualität und das ektote Endometrium gegen deren Zytotoxizität teilweise resistent sein (77). Möglicherweise kann das Immunsystem kleine Herde erfolgreich bekämpfen, sodass diese inaktiv werden. Die klinische Symptomatik könnte durch Herde verursacht werden, die nicht erfolgreich bekämpft werden konnten. Unterschiede im Immunsystem könnten auch ein Grund dafür sein, dass trotz verbreiteter retrograder Menstruation nur ein kleiner Anteil an Frauen an Endometriose erkrankt (25). Die angesprochenen inflammatorischen Veränderungen sorgen zusätzlich für eine herabgesetzte Qualität der Oozyten und des ovariellen Gewebes (25) (69). An der Schnittstelle zwischen Entzündung und Karzinogenese liegt das Molekül NF- $\kappa$ B, das auch bei Endometriose gefunden wird und an Proliferation, Immunsuppression, Angiogenese und Metastasierung beteiligt ist. Die Inflammation wird unter anderem von NF- $\kappa$ B aufrechterhalten (76). Auch Veränderungen verschiedener Signalwege liegen bei Endometriose vor und können mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht werden (11).

Genetische und epigenetische Veränderungen führen zu Veränderungen der Transkription und begünstigen möglicherweise die Progesteronresistenz der Erkrankung (50). Mit Karzinomen-assoziierte Mutationen konnten in den Epithelzellen ovarieller Endometriose-Zysten gefunden werden (78). In Studien wurde gezeigt, dass rund 83 % der benignen TIE-Läsionen somatische Mutationen aufweisen (5). Davon sind circa 20 % *tumor-driver*-Mutationen, wie K-ras (*kirsten rat sarcoma viral oncogen*) oder ARID1A (*AT-rich interactive domain-containing protein 1A*), die teilweise auch beim Endometrium-Karzinom oder Endometriose-assoziierten Ovarialkarzinomen gefunden werden. Diese Mutationen könnten die Progression hin zu Karzinomen begünstigen. Ihr Vorliegen kann jedoch nicht der alleinige Auslöser sein, denn nur 1 % der Betroffenen entwickeln ein Malignom (79). Stattdessen ist von einer multifaktoriellen Genese hinsichtlich des inflammatorischen Umfeldes und der Progression zu bösartigen Tumoren auszugehen (Abbildung 3).

### 2.1.4 Risikofaktoren

Wichtige prädisponierende Risikofaktoren für die Endometriose sind mit dem zyklischen Einfluss der Menstruation verbunden (80). Ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung liegt bei Frauen mit früher Menarche und einem kurzen Menstruationszyklus vor, da retrograde Menstruation und Östrogeneinfluss häufiger vorkommen (43) (80). Zudem beeinflusst ein niedriger *body mass index* (BMI) und damit einhergehend ein schmaler Körperbau das Risikoprofil negativ (26) (81). Der BMI gibt jedoch keine Auskunft über den Fettgewebsanteil an der Gesamtkörpermasse und kann folglich nur bedingt mit der fettgewebsassoziierten Östrogenproduktion korrelieren. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass der BMI bei den vorliegenden Studien als Selbstangabe erhoben wurde und Bias-Effekte vorliegen könnten. Wenn sich der Hauptanteil des Fettgewebes unterhalb der Hüfte befindet, scheint dies die Krankheitsentstehung eher zu begünstigen, als wenn der Hauptanteil des Fettgewebe oberhalb der Hüfte eingelagert ist (81) (82). Außerdem weisen Frauen mit uterinen Obstruktionen ein erhöhtes Risiko für eine Endometriose-Erkrankung auf (43).

Ebenfalls diskutiert wird der Einfluss von Digoxin auf die Krankheitsentstehung, da die hohe Belastung in Belgien mit einer sehr hohen Inzidenz der Endometriose in dem Land korreliert (83) (84). Das Krankheitsrisiko senkende Faktoren stellen ein erhöhter BMI, Rauchen und mehrere Schwangerschaften dar (81). Jedoch haben Endometriose-Patientinnen ein erhöhtes Risiko für andere gutartige gynäkologische Krankheitsbilder, wie beispielsweise Leiomyome oder Dermoidzysten.

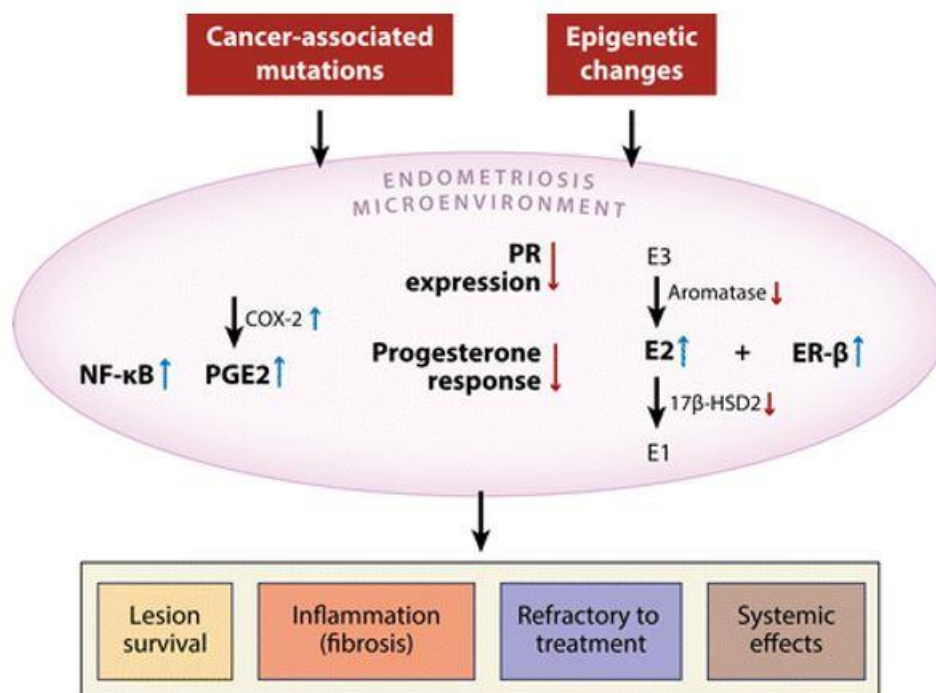


Abbildung 3 Lokal veränderte Mikroumgebung bei Endometriose. Unterschiedliche Einflussfaktoren bedingen die Inflammation und Progression bei der Endometriose. Genetische und epigenetische Veränderungen nehmen ebenso Einfluss wie Mutationen in Tumor-assoziierten Genen. Im umgebenden Gewebe können erhöhte Östradiolkonzentrationen (E2) und eine erhöhte Expression des Östrogenrezeptors  $\beta$  (ER- $\beta$ ) beobachtet werden. Der Abbau des Östradiols mittels 17- $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2 zu Östron (E1) ist ebenso vermindert wie der Umbau von Östriol (E3) durch die Aromatase zu Östradiol. Außerdem ist die Progesteron-Expression (PR) vermindert und somit die Progesteron-Antwort des Gewebes. Der Entzündungsmediator Prostaglandin-E2 (PGE2) wird über die Cyclooxygenase-2 (COX-2) verstärkt exprimiert. Ebenfalls wird NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*) stärker exprimiert. All diese Veränderungen tragen zu systemischen Effekten des Krankheitsbildes und einem refraktären Ansprechen auf Therapien bei. *Modifiziert nach Wang et al. (43).*

## 2.1.5 Klassifikation

Die Endometriose kann einerseits anhand ihres Lokalisationsorts und andererseits durch verschiedene Risiko-Scores klassifiziert werden. Derzeit wird nach einem geeigneten Klassifikationsmodell gesucht, um möglichst viele Aspekte dieses komplexen Krankheitsbildes abdecken zu können (35). Im ICD-10-GM-2025-Klassifikationsmodell wird die Endometriose in den Abschnitten N80.0 bis N80.9 beschrieben (35). Makroskopisch stellen sich Endometriose-Herde als rotschwarze, bläuliche oder braune Läsionen dar. Ihr Wachstum kann polypenartig oder die Umgebung infiltrierend erfolgen. Kleine Bläschen unterschiedlicher Farbe können am Peritoneum gefunden werden, die Zysten an Ovarien sind meist oberflächlich und erscheinen eingeblutet bräunlich. Mikroskopisch erfolgt klassischerweise der

Nachweis endometrialer Drüsen, in denen pigmentspeichernde Histozyten häufig vorkommen (35). Als weitere lokale Veränderungen sind umgebende Fibrosen oder glattmuskuläre Metaplasien zu nennen (35). Bei Gewebe einer Endometriose-Patientin und Gewebe aus eutopem Endometrium handelt es sich um unterschiedliche Gewebearten, die sich in einigen Punkten unterscheiden. Die Rezeptordichte bei Endometriose-Herden fällt geringer als im eutopen Endometrium aus. Immunhistochemisch ist das endometriale Stroma positiv für CD 10, die Histozyten lassen sich positiv für CD 68 anfärben (35). Außerdem ist das Endometriose-Gewebe für folgende Marker positiv: ER, PR, Zytokeratin 7 (CK-7), p16, p53wt und Vimentin. Folgende Moleküle können nicht nachgewiesen werden: Mesothelin und CK 5/6 (35). Histologisch können zwei Formen der Atypien bei Endometriose beobachtet werden: Komplexe atypische glanduläre Hyperplasien und Atypien des Zysten-auskleidenden Epithels (35). Oftmals handelt es sich um einen benignen Verlauf und maligne Transformationen werden nur in 0,5 - 1 % der Fälle beobachtet (85).

Derzeit ist kein Biomarker für die Endometriose im peripheren Blut bekannt und die Entwicklung eines diagnostischen Tests bleibt Gegenstand der Forschung (11). Lange wurde die Verwendung des Glykoproteins CA-125 als möglicher Biomarker diskutiert, welches beim epithelialen Ovarialkarzinom eingesetzt wird (86). Seine Betrachtung scheint jedoch nur im Anschluss an eine operative Endometriose-Therapie sinnvoll. Nach einem initialen Abfall unmittelbar nach der Operation, kommt es bei Krankheitsprogression zu einem Anstieg von CA-125 (10) (49).

Anhand der Lokalisation werden drei Ausprägungsformen der Endometriose unterschieden, die durch die Laparoskopie festgestellt werden können (87). Bei der Endometriosis genitalis interna handelt es sich um Herde innerhalb des Myometriums und im Abgangsbereich der Tuben. Bei dieser Form wird der diffuse vom lokalisierten Befall unterschieden. Die Endometriosis genitalis externa hingegen ist an Stellen außerhalb der Gebärmutter lokalisiert (2). Der Befall des kleinen Beckens, des Peritoneums oder der tief infiltrierende Befall von Rektum oder Harnblase kann zu ausgeprägten Verwachsungen führen. Als Endometriosis extragenitalis werden Herde außerhalb des kleinen Beckens, am Peritoneum, dem Diaphragma oder an Narbengewebe bezeichnet.

Das Klassifikationssystem der *American Society for Reproductive Medicine (rASRM Score)* befasst sich mit der makroskopischen Ausdehnung und Adhäsion der Läsionen (Abbildung 4). Anhand eines Punktesystems ergibt sich ein additiver Kumulativwert, der die Endometriose in Schweregrade von minimal bis schwer einteilt (35). Er weist jedoch mehrere Schwächen auf, da Schwangerschaftsraten, Rezidive oder Schmerzbelastung ebenso unberücksichtigt bleiben wie die TIE (87). Daher sollte er für die Vergleichbarkeit bisheriger wissenschaftlicher Arbeiten

und weniger im klinischen Alltag verwendet werden (35). Der *Endometriosis Fertility Index* (EFI) kombiniert die Beschreibung makroskopischer Veränderungen der Adnexe mit anamnestischen Kriterien und gibt Betroffenen eine Einschätzung wie wahrscheinlich eine Schwangerschaft in den nächsten 36 Monaten ist (35). Dennoch handelt es sich hierbei um kein anerkanntes Screening-Verfahren.

Im deutschsprachigen Raum wurde die Enzian-Klassifikation zur Einteilung tiefer Endometriose-Läsionen entwickelt (87). Hierbei erfolgt die Einteilung in drei anatomischen Ebenen, die Knotengröße wird ähnlich wie in der Onkologie in verschiedene Stadien von 1 bis 3 eingeteilt (35) (87) (Abbildung 5). Ebenfalls in Anlehnung an die Onkologie beschreiben Suffixe die Lokalisation der Herde (87). Aus der exakten Befundbeschreibung durch nichtinvasive und operative Diagnostik lässt sich der Schweregrad der Endometriose ableiten, sodass diese Klassifikation bevorzugt eingesetzt werden sollte (35).

| Endometriose  |                | < 1 cm        | 1 – 3 cm      | >3cm     | Punktzahl   |
|---|----------------|---------------|---------------|----------|-------------|
| Peritoneum  | oberflächlich  | 1             | 2             | 4        |             |
|   | tief           | 2             | 4             | 6        |             |
| Ovar  | rechts         | oberflächlich | 1             | 2        | 4           |
|   |                | tief          | 4             | 16       | 20          |
|   | links          | oberflächlich | 1             | 2        | 4           |
|   |                | tief          | 4             | 16       | 20          |
| <b>Gesamt-Endometriose-Implantat-Punkte</b>             |                |               |               |          |             |
| Douglasobliteration                                     |                | teilweise     |               | komplett | Punktzahl   |
|   |                | 4             |               | 40       |             |
| Adhäsionen  |                | bis 1/3       | bis 2/3       | über 2/3 | Punktzahl   |
| Ovar  | rechts         | zart          | 1             | 2        | 4           |
|   |                | dicht         | 4             | 8        | 16          |
|   | links          | zart          | 1             | 2        | 4           |
|   |                | dicht         | 4             | 8        | 16          |
| Tube  | rechts         | zart          | 1             | 2        | 4           |
|   |                | dicht         | 4*            | 8*       | 16          |
|   | links          | zart          | 1             | 2        | 4           |
|   |                | dicht         | 4*            | 8*       | 16          |
| <b>Gesamt-Adhäsions-Punkte (einschließlich Douglas)</b> |                |               |               |          |             |
| * bei komplettem Tubenverschluss auf 16 Punkte erhöhen  |                |               |               |          |             |
| <b>Gesamt-Endometriose-Implantat-Punkte</b>             |                |               |               |          |             |
| <b>Gesamt-Adhäsions-Punkte (einschließlich Douglas)</b> |                |               |               |          |             |
| <b>Gesamt-Punkte = rASRM Score:</b>                     |                |               |               |          |             |
| rASRM Score   | 1 – 5 Punkte   |               | rASRM Stadium |          | I (minimal) |
|   | 6 – 15 Punkte  |               |               |          | II (gering) |
|   | 16 – 40 Punkte |               |               |          | III (mäßig) |
|   | > 40 Punkte    |               |               |          | IV (schwer) |

Abbildung 4 rASRM-Klassifikation der Endometriose. Makroskopische Ausdehnung und Adhäsionsverhalten der Endometriose-Läsionen werden mittels eines Punktesystems eingeteilt. Der Punktwert korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung, wobei ein höherer Wert auf einen schwereren Verlauf hinweist. *Modifiziert nach S2k-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Endometriose* (35).

| Peritoneum<br>Summe aller<br>Implantate | Ovar<br>Links/Rechts | Tube<br>Links/Rechts<br>Adhäsionen                                      |
|---|----------------------|---|
| P1 (< 3 cm)                             | O1/1<br>(< 3 cm)     | T1/1<br>(1 Ebene/zur Beckenwand)  |
| P2 (3–7 cm)                             | O2/2<br>(3–7 cm)     | T2/2<br>(Adhäsionen in 2 Ebenen/zusätzlich zum Uterus)                  |
| P3 (> 7 cm)                             | O3/3<br>(> 7 cm)     | T3/3<br>(Tubenverschluss, Adhäsionen in 3 Ebenen/zusätzlich zum Rektum) |

|                                | Kompartiment A<br>Septum rectovagi-<br>nale/Vagina | Kompartiment B<br>Lig. sacrouteri-<br>num/Beckenwand | Kompartiment C<br>Rektum |
|--------------------------------|--|--|--------------------------|
| Grad 1: < 1 cm                 | A1   | B1   | C1                       |
| Grad 2: 1–3 cm                 | A2   | B2   | C2                       |
| Grad 3: > 3 cm                 | A3   | B3   | C3                       |
| <b>Weitere Lokalisationen:</b> |  |  |                          |
| Uterus                         | FA   |  |                          |
| Harnblase                      | FB   |  |                          |
| Ureter                         | FU   |  |                          |
| Darm                           | FI   |  |                          |
| Andere                         | F(Angabe der entsprechenden Lokalisation)          |  |                          |

Abbildung 5 Enzian-Klassifikation der Endometriose. Die Einteilung der Läsionen erfolgt in drei Kompartimente, wobei die maximale Ausdehnung in verschiedene Grade eingeteilt wird. Suffixe beschreiben weitere Lokalisationsorte. *Modifiziert nach S2k-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Endometriose (35).*

## 2.1.6 Klinische Symptome

Die klinische Symptomatik der Betroffenen nimmt ein breites Spektrum ein und manifestiert sich in Abhängigkeit der Lokalisation sehr vielseitig. Unabhängig vom betroffenen Organ ist mit einer zyklusabhängigen Zunahme der Beschwerden zu rechnen, was durch die Östrogenabhängigkeit des Gewebes erklärt werden kann (35). Auch ein asymptomatischer Verlauf ist nicht unüblich (31) (58), wodurch die Diagnostik zweifelsohne erschwert wird. Zudem korreliert die Größe der Läsion nicht unbedingt mit der Ausprägung des klinischen Beschwerdebilds, sodass große Läsionen unbemerkt bleiben können und umgekehrt. Charakteristisch sind genitale Beschwerden, da hier die meisten Lokalisationen gefunden werden können. Es können zyklusunabhängige Schmerzen von zyklusabhängiger Dysmenorrhoe, Menorrhagie und Metrorrhagie unterschieden werden (88) (89). Die Schmerzkonstellation wird auch als sekundäre Dysmenorrhoe bezeichnet, welche sich in verlängerter Dauer und fehlendem Ansprechen auf NSAR von der primären Dysmenorrhoe unterscheidet (26). In Abhängigkeit des befallenen Organs treten außerdem gastrointestinale oder urologische Beschwerden auf. Sie können sich abhängig von ihrer Lokalisation und Infiltrationstiefe unterscheiden oder gänzlich asymptomatisch bleiben (1). Typischerweise werden die gastrointestinalen Symptome durch Sklerosierungen oder Fibrosierungen der betroffenen Darmabschnitte, die zum Abknicken derselben führen können, hervorgerufen.

Klassische Beschwerden wie Tenesmen, Obstipation, Dyschezie oder Hämochezie können sich während der Menses verstärken (3) (88). Dies gilt auch für urologische Beschwerden, so dass rund 20 % der Betroffenen eine zyklusbedingte Hämaturie aufweisen (3). Zusätzlich kann es bei einem Befall der Harnblase zu suprapubischen Schmerzen oder Rückenschmerzen sowie Dysurie und Pollakisurie kommen (35) (38). Die Endometriose des Ureters bleibt meistens asymptomatisch (1) (38) (44), eine zyklusbedingte Mikrohämaturie kann allerdings vorkommen. Kritisch wird es, wenn die asymptomatische Obstruktion die Nierenfunktion im Verlauf drastisch einschränkt (1).

Der große Leidensdruck der Betroffenen kann auf die Schmerzsymptomatik zurückgeführt werden, deren psychologische Komponente und Potential zur Chronizität nicht vernachlässigt werden sollte. Die Dimensionen dieses chronischen Schmerzes lassen sich am besten durch das bio-psycho-soziale Modell beschreiben (35). Assoziationen mit chronischen Schmerzzuständen wie Fibromyalgie (26, 90) oder interstitieller Zystitis (91) sind bekannt und schränken auch das soziale und berufliche Leben ein (88). Hier sind eine adäquate Schmerzanamnese sowie eine Überweisung zu Fachärzt\*innen oder Schmerztherapeut\*innen angeraten, um einer Stigmatisierung und Psychologisierung vorzubeugen. Ferner ist zu beachten, dass die Einnahme von Medikamenten – besonders bei jungen Frauen – mit einer stigmatisierenden Komponente verknüpft sein kann (92). Die Endometriose korreliert zudem mit dem Auftreten von Depressionen, Angststörungen oder anderen psychiatrischen Erkrankungen (26) (88), deren Häufigkeit insbesondere nach Diagnosestellung zunimmt (15). Verknüpfungen zu Komorbiditäten wie dem metabolischen Syndrom, Autoimmunerkrankungen oder koronarer Herzkrankheit (KHK) lassen sich ebenfalls beobachten (43) (66).

Eine weitere schwerwiegende Komplikation der Endometriose, die Infertilität, belastet Patientinnen sowohl physisch als auch psychisch. Frauen mit Endometriose weisen im Vergleich zu gesunden Frauen eine deutlich geringere Chance auf, innerhalb von drei Jahren schwanger zu werden (25). Diesem Umstand liegen vermutlich vielfältige Ursachen zugrunde. Anatomische Veränderungen durch Verklebungen und Verwachsungen wirken sich ebenso negativ aus wie starke Schmerzen beim Geschlechtsverkehr (25). Allgemein beschreiben Betroffene eine deutliche Einschränkung ihres Sexuallebens aufgrund der unterschiedlichen physischen und psychischen Beschwerden (7). Auch wenn mechanische Barrieren von den Spermien überwunden werden konnten, ist die Qualität des ovariellen Gewebes und der Oozyten bei Endometriose-Patientinnen durch inflammatorische Zytokine und aktive Zellen der Entzündungsabwehr deutlich herabgesetzt (25) (93). Zudem wird diskutiert, ob sich die Dehnung des ovariellen Kortex und oxidativer Stress negativ auf das Ovar auswirken (31). Durch diese Einflussfaktoren verändern sich die Ovulation und die Implantation wird negativ beeinflusst, da bei Endometriose-Patientinnen das eutope Endometrium ebenfalls abnorme

Veränderungen aufweist (25). Es wird vermutet, dass sich die Progesteronresistenz (52), die bei diesem Krankheitsbild vorzufinden ist, negativ auf die Implantation des Embryos auswirkt. Dies ist jedoch aktuell Gegenstand der Forschung (94). Schließlich soll nicht unerwähnt bleiben, dass auch nach erfolgreicher Implantation vermehrt Komplikationen während Schwangerschaft und Geburt auftreten. Exemplarisch ist hier die erhöhte Abortrate aufgrund der Hyperkontraktilität des Uterus (61) (95) und ein erhöhtes Risiko für Gestationsdiabetes zu nennen (96).

### 2.1.7 Therapieoptionen

Bei der Therapie der Endometriose gilt es, die vielfältigen Manifestationsorte und das resultierende Beschwerdebild in den Therapieplan zu integrieren, um den Betroffenen eine möglichst große Schmerzreduktion zu ermöglichen. Zudem sollte der chronische Charakter der Endometriose unbedingt beachtet werden, wodurch ein Langzeittherapie-Konzept unter Berücksichtigung von Familienplanung und Organbefall notwendig wird (35). Eine Prävention oder kausale Therapie der Erkrankung ist derzeit noch nicht bekannt (35). Die Therapieoptionen werden im Folgenden in hormonelle und operative Therapien unterteilt.

#### 2.1.7.1 Hormonelle Therapie/ KOK und Progestine

Die hormonelle Therapie verfolgt primär das Ziel, einen lokalen hypoöstrogenen Zustand zu erreichen, indem die Funktion des ovariellen Gewebes supprimiert und damit das östrogenabhängige Wachstum der Herde gestoppt wird (97). Hierbei wird die additive Hormontherapie von der ablativen Hormontherapie unterschieden. Die Effektivität der hormonellen Therapien liegt zwischen 60 - 80 % (26). Die additive Hormontherapie verwendet monophasische Gestagen-Östrogen-Kombinationspräparate oder Gestagen-Monopräparate (26) (98), wobei Gestagen-Monopräparate wie Dienogest oder Norethisteronacetat die Therapie der ersten Wahl darstellen (92, 97). Die Gestagene weisen neben der gewünschten antiöstrogenen Wirkung auch antiproliferative, antiinflammatorische und pro-apoptotische Effekte (52) auf und regulieren die Expression des Östrogenrezeptors herunter (99). Dabei kommt es zunächst zu einer initialen Dezidualisierung (99), der eine Atrophie des Endometrium-Gewebes folgt. Ferner weisen reine Gestagen-Präparate ein günstiges Nebenwirkungsprofil auf (35). Bevorzugt eingesetzt werden die Gestagen-Monopräparate bei Patientinnen mit starker Schmerzsymptomatik oder TIE (92) sowie bei Befall von Darm oder Harnblase (100) und zur Rezidivprophylaxe nach laparoskopischer Operation (89).

Die kombinierte orale Kontrazeption soll eine therapeutische Amenorrhoe erzeugen (98), indem die hypophysäre GnRH-Ausschüttung unterdrückt wird, sodass verminderte LH- und FSH-Spiegel die ovarielle Steroidsynthese supprimieren. Ihr Einsatz erfolgt dabei „off-label“ (35). Symptome wie Dysmenorrhoe und menstruationsunabhängige Schmerzen werden bei diesem Ansatz gemildert (92), wobei sich die Einnahme im Langzeitzyklus als besonders vorteilhaft auf die Schmerzreduktion auswirkt (92) (101). Ein Vorteil der KOK liegt in deren kontrazeptivem Effekt (92). Gegenstand aktueller Diskussionen ist, ob die Östrogenkomponente der KOK die Rezidivrate der Endometriose unter gleichzeitiger Maskierung der Symptome erhöht (92, 102). Da die verabreichten Östrogendosen supraphysiologisch sind, sollte eine möglichst niedrige Dosierung bei der Gabe von KOK gewählt werden. Eine Kombination von KOK mit dem Präparat Pycnogenol, einem NF- $\kappa$ B-Inhibitor, reduziert die Dysmenorrhoe noch stärker (76), da das Molekül sowohl im eutopen als auch im ektopen Endometrium blockiert wird.

Die Verwendung eines mit Levonorgestrel beschichteten Intrauterinpressars (IUP) ist möglich und umgeht eine tägliche Medikamenteneinnahme (92). Nebenwirkungen wie Akne, Wasserretention oder Zwischenblutungen können bei Verwendung von Progestinen vorkommen.

### 2.1.7.2 GnRH-Analoga und Antagonisten

Präparate der ablativen Hormontherapie sind GnRH-Analoga oder GnRH-Antagonisten (92). GnRH-Analoga wie Leuprorelin oder Goserelinacetat erzeugen einen hypoöstrogenen Zustand (92) (103), indem sie die GnRH-Rezeptoren im Hypophysenvorderlappen dauerhaft stimulieren, sodass nach einem längeren Zeitraum eine Down-Regulation dieser Rezeptoren stattfindet. Die mit Endometriose-assoziierten Schmerzen werden ebenso vermindert wie die Blutungsstärke und das Volumen der Läsionen (35). Bei den GnRH-Analoga ist eine „Add-back-Therapie“ notwendig, um Nebenwirkungen wie Osteoporose vorzubeugen (92). Außerdem weisen sie keinen kontrazeptiven Effekt auf. GnRH-Antagonisten blockieren als kompetitive Antagonisten den GnRH-Rezeptor und verhindern so die Ausschüttung von FSH und LH, sowie die Östrogenbildung (52). Im Gegensatz zu den Agonisten kommt es nicht zum Verlust der Knochenmatrix (92), jedoch können Zwischenblutungen und Kopfschmerzen als Nebenwirkungen auftreten.

### 2.1.7.3 Weitere medikamentöse Ansätze

Vielfältige weitere Pharmaka können in gewissen Situationen eingesetzt werden oder sind derzeit Gegenstand der Forschung. Progesteronrezeptor-Modulatoren (PRM) (92) (99) wie Mifepriston haben einen antiproliferativen Effekt auf eutopes sowie ektopes Endometrium und supprimieren die Prostaglandin-Synthese (92). Mifepriston reduziert neben der Dysmenorrhoe auch die Dyspareunie (104); die Anwendung kann aufgrund fehlender Daten jedoch nicht routinemäßig empfohlen werden (35) (52) (92). Unklar ist beispielsweise, welche Konsequenzen die als reversibel angenommenen histologischen Veränderungen des Endometriums haben (92) (99). Diese wurden nach Anwendung von PRM beobachtet. Ein weiterer Ansatzpunkt ist das Enzym Aromatase, welches bei Endometriose nicht nur in den Läsionen, sondern auch im eutopen Endometrium eine verstärkte Aktivität aufweist und dadurch einen Hyperöstrogenismus herbeiführt. Präparate wie Anastrozol oder Letrozol können im Rahmen klinischer Studien bei therapierefraktären Patientinnen eingesetzt werden (35) (97), Langzeitdaten sind jedoch nicht vorhanden. Zwei medikamentöse Ansätze zeigten vielversprechende Ergebnisse in Mausmodellen, einerseits die selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) und andererseits die Dopaminagonisten. SERM verursachen eine Regression der Endometriose-Läsionen durch vermindertes Einwandern von Stammzellen aus dem Knochenmark und beeinflussen außerdem die Nozizeptoren (52). Die Dopaminagonisten nehmen zwar auf die Ovulation keinen Einfluss, verhindern aber die endometrioiden Proliferation (52) durch Modulation von pro- und antiangiogenetischen Wegen (105).

Neben der angestrebten Hypoöstrogenämie werden auch Komedikationen eingesetzt, um weitere Symptome zu therapieren. Als Standard zur Linderung der Dysmenorrhoe werden nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) verwendet (52). Bei neuropathischen oder noziplastischen Schmerzen kommen trizyklische Antidepressiva oder Antikonvulsiva zum Einsatz (35). Im Falle chronischer Schmerzen ist grundsätzlich eine multiprofessionelle Betreuung der betroffenen Person empfehlenswert. Zudem kann die Verwendung von Psychopharmaka patientenabhängig diskutiert werden, um psychische Komorbiditäten zu therapieren.

### 2.1.7.4 Operative Therapie

Als Standard der operativen Therapie gilt die Laparoskopie zur Entfernung aller sichtbaren Endometriose-Herde (35). Ziel ist es, das Beschwerdebild und besonders die chronischen Schmerzen zu vermindern und die Lebensqualität der Betroffenen zu verbessern (31). Dabei kann die Entfernung mittels Koagulation oder Exzision durchgeführt werden, wobei eine Kompletresektion immer anzustreben ist (106) (107). Es schließt sich eine postoperative

hormonelle Suppression an, um einem Rezidiv vorzubeugen (107). Diese kann mit individuell abgestimmten Pharmaka durchgeführt werden. Je nach Lokalisation der Endometriose können auch zystoskopische oder koloskopische Entfernungen notwendig werden.

Trotz des Komplikationsrisikos sollte die Resektion am Darm in Erwägung gezogen werden, da Rezidive gut verhindert werden können (108). Bei der operativen Therapie ist außerdem der Kinderwunsch vieler Patientinnen zu berücksichtigen. In jedem Fall muss unter größtmöglicher Schonung des reproduktiven Gewebes und anatomischer Strukturen vorgegangen werden (26). Bei vorliegender Infertilität haben Betroffene durch Methoden wie Intra-zytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) oder In-Vitro Fertilisation (IVF) trotzdem die Möglichkeit erfolgreich schwanger zu werden (25). Die medikamentösen Therapieoptionen erhöhen die Chancen für eine Schwangerschaft jedoch nicht (25).

### 2.1.8 Endometriose und Ovarialkarzinom

Eine Assoziation der Endometriose zum Ovarialkarzinom, welches aus ovariellen Läsionen hervorgehen kann und das zweithäufigste gynäkologische Karzinom in entwickelten Ländern ist, wurde bereit 1925 von Sampson beschrieben (109). Grundsätzlich ist das Risiko für alle histopathologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms erhöht (22).

Ursächlich können ARID1A-inaktivierende Mutationen sein (85), die zusätzlich zu Mutationen von K-ras oder TP53 auftreten (43) (79) (109). Sowohl das Krankheitsbild der Endometriose aber auch die Tumoren weisen Merkmale wie Inflammation, erhöhte Proliferation, aktivierende Invasion und erhöhte lokale Östrogenproduktion auf (109). Patientinnen mit Endometriose weisen ein bis zu 4-fach erhöhtes Risiko einer Erkrankung an einem Ovarialkarzinom auf (35) (79), bei DIE liegt sogar ein rund 9-fach erhöhtes Risiko vor (22). Die Endometriose-assoziierten Formen des Ovarialkarzinoms sind meist epithelialen Ursprungs (79), wobei zu rund 66 % der endometrioider Subtyp auftritt (5, 98) (110). Weitere 20 % entfallen auf den klarzelligen Typ (79) (109) und nur sehr selten treten serös-muzinöse Borderline-Tumoren des Ovars in Assoziation mit Endometriose auf (79) (85) (111). Bei den mit Endometriose-assoziierten Ovarialkarzinomen fällt auf, dass ein früheres Erkrankungsalter als bei typischen *high-grade* serösen Ovarialkarzinomen vorliegt (35). Zudem erfolgt die Diagnosestellung meist früher, sodass sich das Risiko eines Rezidivs verringert (110).

## 2.2 Allgemeine Aufgaben und Regulationsmechanismen von Calcium

Calciumionen spielen bei verschiedenen lebenswichtigen Prozessen wie Knochenbildung und Muskelkontraktion eine entscheidende Rolle und sind sowohl extrazellulär als auch intrazellulär vorhanden (112) (113). Über Schwankungen der Konzentration können Aufgaben als *messenger* auf zellulärer, subzellulärer und extrazellulärer Ebene erfüllt werden (20). Die Serumkonzentration von Calcium liegt zwischen 2,1 mM und 2,6 mM, wobei die Hälfte dissoziiert vorliegt und die andere Hälfte an Proteine gebunden wird (113). Deutlich geringer ist die intrazelluläre Calciumkonzentration, die normalerweise bei rund 100 nM liegt und durch Öffnung von Calciumkanälen oder Freisetzung aus dem rER in den mikromolaren Bereich angehoben werden kann (113). Die Regulation des Calciumhaushalts ist Aufgabe der Organe Nebenschilddrüse, Niere, Knochen sowie Darm und wird von verschiedenen Hormonen beeinflusst. Der Serumcalciumspiegel wird hauptsächlich von Parathormon (PTH) geregelt (114).

Erniedrigte Calciumwerte führen zu einer Ausschüttung von PTH aus der Nebenschilddrüse, wodurch die Calciumexkretion in der Niere sinkt, die intestinale Resorption ebenso wie die ossäre Freisetzung steigt (20), sodass der Serumspiegel des Calciums angehoben werden kann. Umgekehrt verhält es sich, wenn der Serumcalciumgehalt erhöht ist und eine verminderte PTH-Synthese in einer reduzierten renalen Aufnahme und Freisetzung aus dem Knochen resultiert (113) (115) (116). Der Serumcalciumgehalt kann außerdem von aktivem Vitamin D, auch bekannt als Calcitriol, durch Resorption in Niere und Darm gesteigert werden. Außerdem fördert aktives Vitamin D die Mineralisation der Knochen durch Calciumeinbau (114). Als Gegenspieler des PTH gilt Calcitonin aus den C-Zellen der Schilddrüse, welches den Knochenabbau hemmt und somit die Bereitstellung von Calcium senkt. Zudem wird die Calciumresorption aus Niere und Darm vermindert (114).

## 2.3 Calcium im Kontext des Krankheitsbilds Endometriose

Die Rolle von Calciumionen für das Krankheitsbild der Endometriose ist derzeit Gegenstand der Forschung. Es ist bekannt, dass der CaSR und damit auch Calciumionen eine Rolle in der Tumorgenese spielen (117). Die Endometriose als benigne Erkrankung weist Überschneidungen zu malignen Krankheitsbildern auf: Im Serum von Patienten mit Endometriose konnte eine im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Konzentration von Calcium-Ionen nachgewiesen werden und es liegt nahe, dass dies auf eine gesteigerte Calciumzufuhr zurückzuführen ist (118). Möglicherweise begünstigen resultierende Störungen der

Calciumhomöostase die Entstehung von Endometriose (118) (119). Es liegen jedoch auch Studienergebnisse vor, die einen inversen Effekt aufzeigen (120). Erhöhte Vitamin D und Calciumkonzentrationen im Serum waren hier bei symptomatischen Personen mit einem reduzierten Endometrioserisiko verknüpft (121). Somit erschwert die Heterogenität der Erkrankung eine eindeutige Darstellung von Kausalitäten (119). Calcium-bindende Moleküle, zu denen auch der CaSR zählt, spielen für die Pathogenese der Erkrankung eine Rolle, zum Beispiel durch Induktion und Aufrechterhaltung der Inflammation (122). Bei der Inflammation, die sich auch bei Endometriose findet, können Mediatoren wie Histamin die lokale Calciumkonzentration intrazellulär erhöhen und dadurch calciumabhängige Moleküle aktivieren (122).

Die Bedeutung des CaSR für inflammatorische Prozesse wurde von Sundararaman *et al.* (2021) für kardiovaskuläre Pathologien beschrieben (123). Besonders relevant für diesen Rezeptor ist das zweiwertige Kation  $Ca^{2+}$ , welches seine strukturelle Integrität erhält und an seiner Aktivierung beteiligt ist (23). Im Kontext kardiovaskulärer Erkrankungen und anderer Krankheitsbilder wird der CaSR als Ansatzpunkt für eine *targeted-therapy* diskutiert (123). Hiervon werden auch neue therapeutische Ansätze für die Erkrankung Endometriose erhofft, indem entweder der CaSR direkt als *target* verwendet oder nachgeschaltete Signalmoleküle inhibitorisch beeinflusst werden könnten (124). Als Ansatzpunkte hierbei werden unter anderem MAPK/MEK/ERK oder PI3K/AKT diskutiert (124). Im Folgenden wird auf die Funktionsweise des CaSR eingegangen.

## 2.4 Der Calcium-sensitive Rezeptor (CaSR)

Die molekulare Identifikation des pleiotropen Rezeptors gelang erstmals 1993 Brown *et al.* aus der Nebenschilddrüse des Rindes (125). Das für den Rezeptor kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 3 an Position 3q13.2-21 (113) (126), wobei die Expression des Rezeptors von verschiedenen Promotoren wie beispielsweise Vitamin D oder proinflammatorischen Zytokinen auf Transkriptionsebene reguliert wird (113). Es wurden sieben Exons identifiziert, die für verschiedene Anteile des Rezeptors kodieren. So kodieren Exon 2 - 6 für die extrazelluläre Domäne und Exon 7 für die sieben Transmembraneinheiten sowie das C-terminale Ende (113) (116).

## 2.4.1 Aufbau des Rezeptors

Der CaSR gehört zur Klasse C oder III der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (20) (113). G - Protein-gekoppelte Rezeptoren werden in die Klassen A, B und C eingeteilt, wobei die Klasse C mit 22 Rezeptorsubtypen die kleinste Klasse darstellt (127). Der Klasse C gehören neben dem CaSR acht metabotrope Glutamatrezeptoren (mGlu 1 - 8), zwei metabotrope GABA-Rezeptoren (GABA<sub>B1</sub> und GABA<sub>B2</sub>), drei Geschmacksrezeptoren (T1R1-3), ein Rezeptor für L-Aminosäuren (GPRC6A) und sieben Orphan-Rezeptoren an (20) (127). Bei CaSR handelt es sich um einen Homodimer (113) (115), der in dieser Konfiguration ein Molekulargewicht von 240 - 310 kDa aufweist (128).

Zwei Monomere liegen nebeneinander und verbinden sich über Disulfidbrückenbindungen (23) (129), um eine funktionale Konformation einzunehmen. Grundsätzlich wird in eine große extrazelluläre N-terminale Domäne (ECD), eine Cytosin-reiche Domäne (CRD), sieben Transmembrandomänen (TMD) und eine C-terminale Domäne unterschieden (20) (Abbildung 6). Bei der ECD handelt es sich um eine *Venus-fly-trap*-Domäne (VFT) (20) (113), die aus zwei *lobes* (LB1 und LB2) besteht, welche über Disulfidbrücken untereinander und mit der CRD verbunden sind. Die LB1 der beiden Monomere sind womöglich an der Dimerisierung beteiligt, da sie sich im Gegensatz zu den beiden LB2 im inaktiven Zustand räumlich annähern (23). Wie der Name nahelegt, ähnelt die VFT in ihrem Aufbau einer Venusfliegenfalle, denn im inaktiven Zustand bleibt ein Spalt zwischen LB1 und LB2 frei, in den sich Agonisten setzen können. Als Reaktion darauf schließt sich die Lücke und es kommt zu einer Konformationsänderung der TMD und der intrazellulären Domäne (20) (113, 130).

Eine strukturelle Verbindung zwischen der ECD und der TMD wird durch neun Cytosin-Moleküle erreicht, die die CRD darstellen und essenziell für die Signalbildung des Rezeptors sind (116) (129). Die TMD besteht aus sieben Untereinheiten, die untereinander über intrazelluläre Loops verbunden sind, und erfüllt eine wichtige Rolle für die Aktivierung des Rezeptors (113). Außerdem weist die TMD Bindestellen für allosterische Modulatoren auf (116) (131) und beteiligt sich an der Signaltransduktion, indem es zu einer Aufwärtsbewegung von TM5 und TM6 kommt. So können G-Proteine an den Rezeptor binden (113).

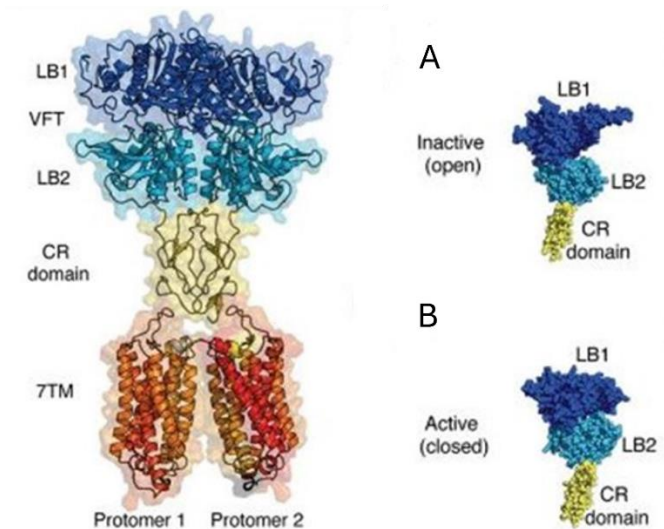


Abbildung 6 Schematischer Aufbau des CaSR und der VFT. Der CaSR besteht aus zwei Monomeren, die über Disulfidbrückenbindungen verbunden werden, um ein funktionsfähiges Dimer zu bilden. Zwei lobes (LB1 und LB2) formen die *Venus-fly-trap*-Domäne (VFT), deren offene und geschlossene Konfiguration auf der rechten Seite dargestellt ist. Über eine Cytosin-reiche Domäne (*CR-domain*) wird die VFT mit den sieben Transmembrandomänen (7TM) verbunden. Teil A zeigt den offenen und inaktiven Zustand der ECD, Teil B den aktiven und somit geschlossenen Zustand. *Modifiziert nach Leach et al. (113).*

Für die Funktionalität des CaSR sind verschiedene Modifizierungen wie Phosphorylierung, Dimerisierung oder posttranslationale Modifikation relevant (127). Posttranslational kommt es zu einer extensiven Glykosylierung des Rezeptors an der VFT-Domäne (132); diese Glykosylierung wird am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) mit Mannose vorgenommen (113). Die Rezeptorfunktion kann nur durch Rezeptor-Dimerisierung gewährleistet werden und geschieht unter Ausbildung zweier Disulfidbrückenbindungen an den Spitzen der VFT-Domäne (113). Zudem beeinflusst die Dimerisierung die allosterische Modulation des Rezeptors, denn negative Modulatoren müssen an beide Monomere binden, um das Signal zu blockieren (113).

Der Aktivitätsgrad des CaSR wird über seine Phosphorylierung mittels verschiedener Proteinkinasen bestimmt, sodass es in der Folge zur intrazellulären Calciummobilisation kommen kann (133). Maßgeblich geschieht dies durch bindende Agonisten (127) und die resultierende Phosphorylierung durch die Proteinkinase-C PKC (134); hierbei wird die Position Thr-888 besonders häufig phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung des Rezeptors an dieser Stelle wird seine schnelle und effizient reversible Inaktivierung erreicht (113).

## 2.4.2 Agonisten und allosterische Modulatoren

Für das Verständnis der Funktionsweise des CaSR ist die Kenntnis über seine Agonisten, Antagonisten und allosterischen Modulatoren sowie deren Bindungsstellen wichtig. Eine besondere Stellung nimmt das zweiwertige Kation  $\text{Ca}^{2+}$  ein, welches die strukturelle Integrität des Rezeptors erhält und an seiner Aktivierung beteiligt ist (23). Pro Monomer werden fünf Bindungsstellen für Calcium an der ECD vermutet (130) (125), wobei sich vier davon an der VFT befinden und nacheinander die weitere Bindung von Calcium ermöglichen (23) (116). Calcium kann daher auch als allosterischer Modulator von sich selbst bezeichnet werden (116) und bindet mit einer Affinität zwischen 3,0 mM und 5,0 mM an die VFT (113) (116).

Diese kooperierende Calciumbindung ermöglicht eine Detektion der Konzentrationsänderungen von weniger als 100  $\mu\text{M}$  (113). Es konnte gezeigt werden, dass die VFT nicht zwingend zur Bindung von Calcium notwendig ist, wodurch die Existenz weiterer Bindungsstellen an der TMD naheliegt (113). Neben Calcium binden noch weitere polyvalente Kationen an den CaSR, wie beispielsweise  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$  oder  $\text{Al}^{3+}$  (113) (135), wobei trivalente Kationen potenter als divalente Ionen sind (113) (135). Auch die Osmolarität oder Änderungen des pH-Werts beeinflussen durch Ionenbindung den Rezeptor, wie beispielsweise die inhibitorische Wirkung einer erhöhten Konzentration von NaCl. Der Rezeptor reagiert sehr sensitiv auf Änderungen des pH-Werts: Ein erhöhter pH aktiviert ihn, wohingegen ein niedrigerer pH den Rezeptor inaktiviert (113) (130).

Der CaSR ist außerdem in der Lage verschiedene weitere Substanzen zu binden. Aminosäuren vom L-Typ sind endogene Aktivatoren des Rezeptors und führen in Abwesenheit von Calcium zu keiner Aktivierung des Rezeptors (23) (113). Jedoch wird ihr Effekt in Anwesenheit von Calciumionen potenziert (130), sodass ihre Funktion im Sinne von Koagonisten diskutiert werden kann. Aromatische Aminosäuren sind potenter als nicht - aromatische (130, 135). Ein aus drei Aminosäuren bestehendes  $\gamma$ -Glutamyl-Peptid, das Glutathion, ist ebenfalls ein potenter Aktivator des CaSR (113) (130). Außerdem binden Polyamine (113), die größer und strukturell komplexer als Ionen sind, an den CaSR. Moleküle wie Spermin, Spermidin oder Putrescin wirken als Agonisten und potenzieren möglicherweise die Effekte des Calciums. Sie werden über die Nahrung aufgenommen, überall im Körper produziert oder von Bakterien des Gastrointestinaltrakts hergestellt (113). In der Lunge sind sie zusammen mit Ionen an der Kontraktion der Atemwege und der Pathophysiologie des Asthma bronchiale beteiligt (113) (136). Spermin ist potenter als Spermidin und dieses wiederum potenter als Putrescin (134). Auch negativ geladene anionische Moleküle wie Phosphat (113) sind in der Lage an den CaSR zu binden. Vier anionische Bindungsstellen konnten in der aktiven und inaktiven extrazellulären Domäne identifiziert werden (23). Ihre Besetzung beeinflusst den CaSR im Sinne

einer nicht - kompetitiven Inhibition (137), sodass Anionen ein negativer allosterischer Effekt zukommt (23). Grundsätzlich können – wenn der Aktivitätszustand des Rezeptors betrachtet wird – positive, negative oder neutrale allosterische Modulatoren unterschieden werden (113).

Unterschieden wird bei Typ-I und Typ-II-Calcimimetika zwischen Liganden, die den Rezeptor im Sinne eines Agonisten aktivieren, und solchen, die sich wie allosterische Aktivatoren verhalten (138). Typ-I-Calcimimetika werden auch orthostatische Agonisten genannt (20) und sind in der Lage die Funktion von Calciumionen zu imitieren (113). Hierzu zählen beispielsweise Aminoglykosid-Antibiotika wie Neomycin und Gentamycin (135). Ebenfalls aktivierend wirken im Sinne eines allosterischen Modulators organische oder synthetische Typ-II-Calcimimetika (113) (135) (139), die an einer anderen Stelle als die Agonisten binden. Je nach Substanzgruppe und Entwicklungszeitpunkt werden drei Generationen unterschieden (20). Die VFT des CaSR ist der Ort, an dem die positiv allosterischen Modulatoren binden (116). Durch Konformationsänderung des Rezeptors wird das Bindungsvermögen der Agonisten beeinflusst (20) (128). Bei einer positiven Beeinflussung wird von Calcimimetika und bei einer negativen Beeinflussung von Calcilytika gesprochen (113).

Zur ersten Generation der Calcimimetika zählt beispielsweise das Phenylalkylamin-Derivat NPS R-568 (138) (140), welches den CaSR in Anwesenheit von Calciumionen aktiviert (141). Ein Präparat der zweiten Generation, Cinacalcet, findet klinische Anwendung zur Therapie einer Hypercalciämie bei primärem Hyperparathyreoidismus oder dem Nebenschilddrüsenkarzinom (138) (142). Ebenfalls ein Arylalkylamin ist Evocalcet, das zur Behandlung eines sekundären Hyperparathyreoidismus bei Dialysepatienten eingesetzt wird (113). Durch die Applikation von Cinacalcet sind geringere Calciumkonzentrationen notwendig, um die PTH-Sekretion zu unterdrücken (113). Zudem führt auch AMG416 als allosterischer Aktivator zu einer schnellen Abnahme des PTH-Spiegels (138).

Die dritte Generation der Typ-II-Calcimimetika sind allosterische Antagonisten, also Calcilytika. Moleküle wie NPS2143 oder Cadhex231 antagonisieren den stimulatorischen Effekt des extrazellulären Calciums und werden im Rahmen von klinischen Studien in der Osteoporose-Therapie eingesetzt (20).

### 2.4.3 Wichtige Signalwege des CaSR

Der CaSR aktiviert eine Vielzahl an monomeren und heterotrimeren G-Proteinen und beeinflusst auf diese Weise nachgeschaltete Signalwege (132) (Abbildung 7). Hauptsächlich Interaktionen erfolgen über  $G_{\alpha_{q/11}}$  und  $G_{\alpha_{i/o}}$  (20) (113) (116), deren Signalmechanismen schließlich zu einer verminderten PTH-Sekretion führen (20) (113).

Durch das G-Protein  $G\alpha_{q/11}$  kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ) und somit zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) (128). Durch Bindung des IP<sub>3</sub> an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor des rER wird Calcium aus diesem freigesetzt. Die Calciumionen aktivieren zusammen mit DAG verschiedene Isoformen der Proteinkinase C (PKC) (135). Diese ermöglicht unter anderem einen weiteren Calciumeinstrom über spannungsabhängige Calciumkanäle (116). Ferner kann die PKC den *mitogen-activated-protein* Kinase (MAPK) - Signalweg mit Bestandteilen wie *extracellular-regulated kinasis* 1/2 (ERK1/2), c - Jun-N-terminale Kinase (JNK) und p38 durch Phosphorylierung aktivieren (20, 128) (135). Diese Moleküle werden durch den CaSR und über das G-Protein  $G\alpha_i$  aktiviert. Die Aktivierung des Pertussis-sensitiven G-Protein  $G\alpha_{i/o}$  bewirkt eine Inhibition der Adenylatzyklase, sodass intrazelluläre cAMP-Spiegel gesenkt werden (113) (128) (135). Zusätzlich kann der PI3K/AKT-Signalweg aktiv werden, der unter anderem einen Einfluss auf die Zellmigration nimmt (143). Das G-Protein  $G\alpha_{q/11}$  aktiviert zudem die zytosolische Phospholipase A2, die Bestandteil des Arachidonsäure-Stoffwechsels ist (113).

Der CaSR vermittelt seine Signale über die G-Proteine  $G\alpha_{12/13}$  und  $G\alpha_s$  (116), wobei nicht alle Mechanismen zum jetzigen Zeitpunkt verstanden werden. Mithilfe von  $G\alpha_{12/13}$  erfolgt eine Kontrolle von Zellmigration und Zellform sowie die Mediation der intrazellulären Calciumkinetik (20) (144). Obwohl die Studien zur Funktion dieses G-Proteins limitiert sind (113), scheint eine Interaktion mit dem monomeren G-Protein Rho A für Mechanismen des Zellverhaltens relevant zu sein (128). Eine besondere Rolle scheint das G-Protein  $G\alpha_{12/13}$  für die Metastasierung von Mamma- und Prostatakarzinom-Zellen zu spielen (145).

Vor allem bei malignen Zellen der Mamma oder der Hypophyse wird das Signal mittels  $G\alpha_s$  umgesetzt, es wird beim Mammakarzinom sogar ein *switch* von  $G\alpha_i$  zu  $G\alpha_s$  vermutet (146). Durch die Adenylatzyklase kommt es zu einer erhöhten cAMP-Produktion und nachfolgend zu einer Aktivierung der PKA (20) (113).

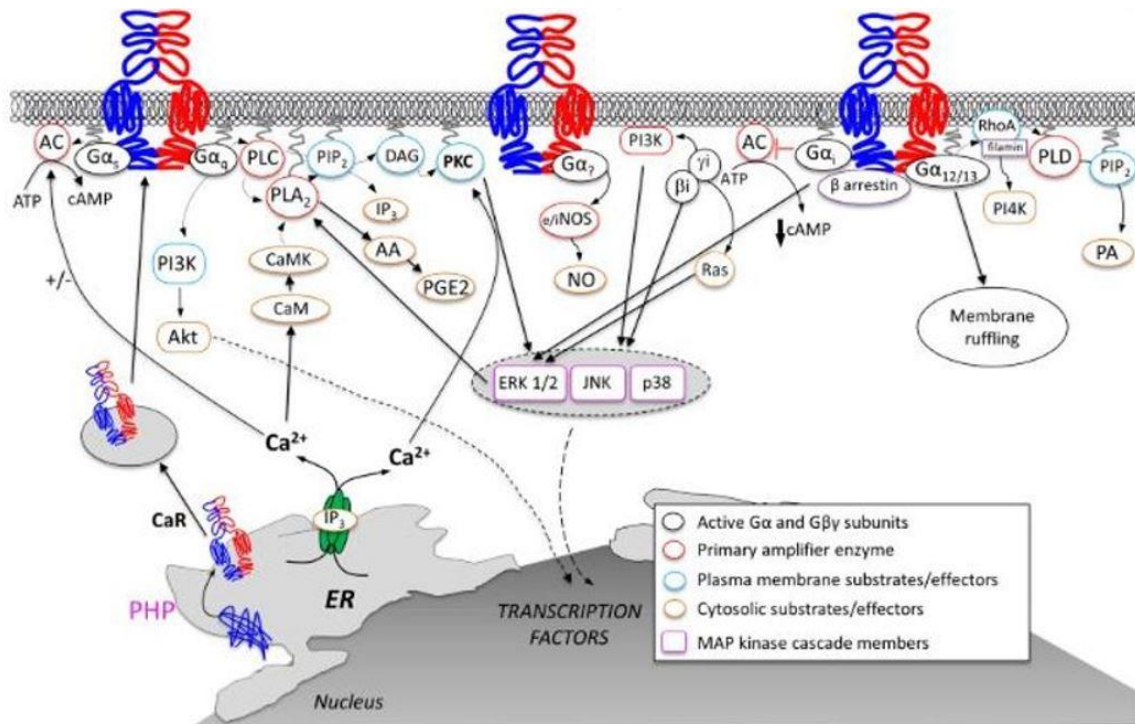


Abbildung 7 Die verschiedenen Signalwege des CaSR. Über verschiedene heterotrimere G-Proteine wie  $G\alpha_{q/11}$  oder  $G\alpha_i$  beeinflusst der CaSR nachgeschaltete Signalkaskaden, wie den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Signalweg oder *extracellular-regulated kinase* (ERK1/2), um Einfluss auf funktionelle Zellprozesse zu nehmen. *Modifiziert nach Gerbino et al. (20).*

Bei den Signalmechanismen des CaSR lassen sich die Phänomene *biased-Agonismus* und *biased-allosterische Modulation* beobachten (20) (113). Es handelt sich beim *biased-Agonismus* um die Agonisten-vermittelte Stabilisierung einer Rezeptorkonformation, die die verstärkte Aktivierung eines entsprechend assoziierten Signalwegs erlaubt (113) (135, 147). Dadurch kann ein Agonist an einem Rezeptor nachgeschaltete Signalwege unterschiedlich stark aktivieren und die Aktivierung ist nicht nur durch eine Rezeptorkonformation möglich (Abbildung 8). Die *biased-Modulation* beschreibt die Beeinflussung der Aktivierung nachgeschalteter Signalwege eines allosterischen Modulators durch seine Bindung (147). Dabei bindet gleichzeitig ein Agonist, dessen erzeugte Rezeptorkonformation durch den allosterischen Liganden hin zu einem spezifischen Signalweg moduliert wird. Beispielsweise führen L-Aminosäuren bei Bindung an den CaSR zu einer von Calcium sensibilisierten Calciumfreisetzung (135) (139).

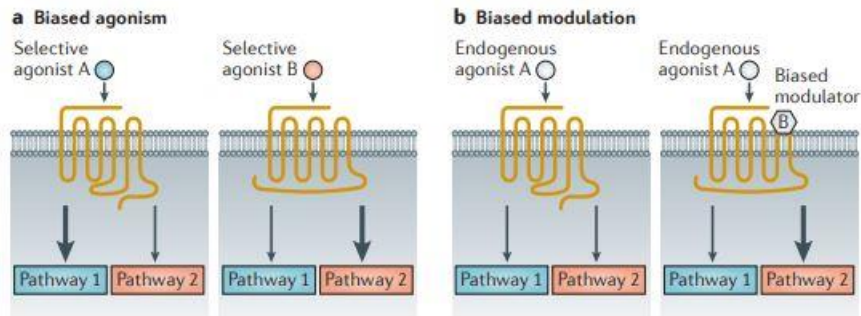


Abbildung 8 Mechanismen des *biased-Agonismus* und der *biased-Modulation*. Beim *biased-Agonismus* (a) stabilisieren unterschiedliche Agonisten jeweils die Rezeptorkonformation, welche einen anderen nachgeschalteten Signalweg stärker aktiviert. Dennoch werden beide Signalwege gleichzeitig aktiv. Bindet ein *biased-Modulator* zusätzlich zu einem Agonisten an den Rezeptor, kommt es zur präferierten Aktivierung eines bestimmten Signalwegs *biased-Modulation* (b). Nach Kenakin et al. (147).

## 2.4.4 Die verschiedenen Funktionen des CaSR

Grundsätzlich ist es die Aufgabe des CaSR, die Konzentration des dissoziierten Calciums zwischen 1,2 mM und 1,4 mM konstant zu halten (116) (135), wobei extrazelluläre Calciumkonzentrationen über ein Spektrum von 0,05 - 5 mM detektiert werden können (112). Der Rezeptor ist in Geweben der Calciumhomöostase, aber auch in vielen anderen Geweben vorzufinden (113).

### 2.4.4.1 Calciumhomöostase

Die Hauptfunktionen des CaSR sind die Wahrnehmung von Veränderungen des Calciumspiegels im Serum und die Aufrechterhaltung der systemischen Calciumhomöostase (148), weshalb der Rezeptor besonders in solchen Geweben exprimiert ist. Die Hormone Parathormon (PTH), Calcitriol und Calcitonin sind an der Regulation des Calciumstoffwechsels beteiligt und können in deren Synthese und Sekretion mittels des CaSR reguliert werden. Hierzu wird mithilfe des Rezeptors die Sekretion von PTH verändert und der Körper vor einer Hypokalzämie geschützt (20) (113).

Bei einer reduzierten extrazellulären Calciumkonzentration wird PTH aus der Nebenschilddrüse freigesetzt, wodurch sich die Calciumexkretion in der Niere reduziert und die intestinale Resorption mittels Vitamin D gefördert wird (20). Außerdem erfolgt eine ossäre Freisetzung des Calciums, sodass der Calciumspiegel insgesamt angehoben wird (20). In Abhängigkeit des Bedarfs kann die Expression des CaSR durch Vitamin D beeinflusst werden. In der Nebenschilddrüse erhöht 1,25-Dihydroxyvitamin D die Transkription der mRNA des CaSR

ebenso wie in Niere und Schilddrüse durch vitamin-D-response-elements (VDRE) (133). Durch verstärkte Rezeptorexpression wird die Drüse sensitiver für Veränderungen des extrazellulären Calciums (133). An der Nebenschilddrüse können zudem veränderte Plasmaspiegel von L-Aminosäuren oder lokal generierten Polyaminen wahrgenommen werden (126) (139).

In den oxyphilen Zellen der Nebenschilddrüse wird der CaSR verstärkt exprimiert und Calcitriol (Vitamin D<sub>3</sub>), ein Inhibitor der PTH-Synthese, wird produziert (149). Ist der Serumspiegel des Calciums erhöht, wird die Synthese und Sekretion des PTH vermindert und folglich die ossäre Calciumfreisetzung ebenso herabgesetzt wie die Reabsorption in der Niere (113) (115) (116). Parafollikuläre Zellen der Schilddrüse weisen eine starke Rezeptorexpression auf (130), sodass hier die Sekretion des Peptidhormons Calcitonin gefördert wird (113) (116). Erhöhte Calciumspiegel stimulieren die Ausschüttung von Calcitonin, welches über verminderte ossäre Resorption den Calciumspiegel senken kann (113). Im Nierengewebe wird eine der höchsten Rezeptorexpressionen im Körper gefunden (126) (150); hier wird die Nierenfunktion hormonabhängig und hormonunabhängig reguliert. Der Rezeptor ist auf basaler und apikaler Membranseite exprimiert und kann die Calciumkonzentrationen in Urin und Plasma wahrnehmen (150). Verschiedene Zellen des Knochens exprimieren den CaSR. Zu diesen gehören beispielsweise Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten (116), die Teil der Knochenentwicklung und -erhaltung sind und hormonabhängig reguliert werden können.

Verschiedene Krankheitsbilder, die den Calciumhaushalt betreffen, manifestieren sich bei Mutationen des Rezeptorgens. *Loss-of-function* Mutationen im CaSR-Gen verursachen die familiäre hypocalcämische Hyperkalzämie oder den neonatalen Hyperparathyroidismus (20) (115) (126). Die familiäre hypokalzämische Hyperkalzämie geht mit einem leicht bis moderat erhöhten Calciumspiegel, einer Hypermagnesämie und normalerweise erhöhten PTH-Spiegeln einher (113) (128). Die autosomal-dominante Hypokalzämie oder das Bartter-Syndrom V werden hingegen durch *gain-of-function* Mutationen des Rezeptors hervorgerufen (20). Die autosomal-dominante Hypokalzämie weist eine erhöhte Sensitivität des CaSR-Signalwegs auf (128). Neben einem niedrigen Serumcalciumspiegel, einer absoluten oder relativen Hyperkalziurie und einer milden Hypomagnesämie sind normale oder niedrige PTH-Spiegel vorzufinden. Beim Bartter-Syndrom Typ V liegen eine hypokalämische Alkalose, ein renaler Salzverlust und ein Hyperaldosteronismus vor (128).

#### 2.4.4.2 Funktionen außerhalb der Calciumhomöostase

Auch in Geweben, die nicht an der Calciumhomöostase beteiligt sind, wird der CaSR exprimiert. Im ZNS reguliert er das neuronale Zellwachstum sowie die Migration und Reifung von Oligodendrozyten (151). Im Pankreas beteiligt er sich an der Regulation der B-Zell-Funktion, da Calcium bei der Exozytose aus Insulin-Vesikeln freigesetzt wird (152). Auch im Magen oder am Herzen kann er gefunden werden (128). Über die Regulation der glatten Muskelzellen an arteriellen Gefäßen wird ein Einfluss auf den Blutdruck genommen (153). Außerdem bewirken veränderte Calciumkonzentrationen in Epithelzellen der Brustdrüse oder in ovariellen Oberflächenepithelzellen eine Änderung des Zellverhaltens (112). Die Zellen proliferieren und können sich terminal differenzieren (112). Während der Laktation wird die Brustdrüse zu einem calcitropen endokrinen Organ (128). In Epithelzellen der Brustdrüse vermittelt der CaSR den Transport von Calciumionen in die Milch und fördert die Freisetzung von *parathyroid hormone-related protein* (116). Durch dieses Protein wird Calciumfreisetzung mittels Osteoklasten am Knochen verstärkt (116, 154).

#### 2.4.4.3 Tumorgenese und Metastasierung

Durch die vielfältigen Rollen des Rezeptors für Differenzierung, Migration oder Apoptose, scheint der CaSR für verschiedenste Tumorentitäten und deren Zellverhalten relevant zu sein (20). Die Tumorgenese kann in Abhängigkeit des zellulären Kontexts durch das Vorhandensein von pro- oder anti-proliferativen Signalen entweder gefördert oder verhindert werden. Mutationen des Rezeptors scheinen nicht früh in der Karzinogenese stattzufinden (20). Je nach Lokalisation oder Tumorentität erfüllt der Rezeptor Funktionen als Onkogen oder Tumorsuppressor (128). Die Rolle des Tumorsuppressors kommt dem CaSR bei Tumoren der Nebenschilddrüse oder des Kolons zu (155) (156). Normalerweise inhibiert der Rezeptor die Zellproliferation und induziert die Apoptose in diesen Geweben (20).

Bei den Tumoren ist seine Expression jedoch reduziert (20), sodass abnorme Differenzierung und Progression beim kolorektalen Karzinom resultieren können (112). Es wird diskutiert, ob sich eine calciumreiche Ernährung schützend auf die Entstehung kolorektaler Tumoren auswirkt, da die CaSR-Expression durch aktives Vitamin D nach oben reguliert wird (157). Ein onkogenes Potential kommt dem Rezeptor beim Prostata- oder Mammakarzinom zu (20) (21), denn hier ist die Expression des Rezeptors erhöht (128) (158). Auffällig ist außerdem, dass diese Tumorentitäten zu Knochenmetastasierung neigen (158). Studien zeigten, dass die erhöhte Rezeptorexpression beim Mammakarzinom in Kombination mit dem G-Protein  $G\alpha_{12/13}$  die Zellmigration und Metastasierung aktivierend beeinflusst (20) (21) (148). Zellen, die zur

Metastasierung neigen, wiesen eine gesteigerte Migration auf, wobei der ERK-Signalwege involviert zu sein scheint (21). Die erhöhten Calciumkonzentrationen in der Knochenmatrix könnten die Ursachen für die Knochenmetastasierung bestimmter Tumorentitäten sein (158) (159). Dieser Mechanismus wird für das Nierenzellkarzinom (160), aber auch für Zellen des Mammakarzinoms diskutiert, denn erhöhte extrazelluläre Calciumspiegel konnten die Migration dieser Zellen fördern (21). Bei Patienten mit Knochenmetastasen fanden sich deutlich erhöhte Spiegel des CaSR. Beispielsweise konnte bei Nierenkarzinomzellen, die zur Knochenmetastasierung neigen, eine gegenüber der Referenz vierfach erhöhte CaSR-Expression gezeigt werden (160). Ebenfalls konnte an knochenmetastasierenden Zellen des Nierenzellkarzinoms eine deutlich erhöhte Proliferations- und Migrationsrate nachgewiesen werden (160). Der nachgeschaltete AKT-Signalweg, der an diesen Prozessen beteiligt zu sein scheint, wurde durch die Aktivierung des CaSR gefördert (160). Die Substanz NPS2143, ein Inhibitor des CaSR, konnte diese Effekte aufheben (160).

### 2.4.5 CaSR-Inhibitor NPS2143

Der Aminoalkohol NPS2143 gehört zu den Calcilytika und ist ein Antagonist des CaSR (20) (138) (Abbildung 9). Der negative allosterische Modulator (116) bindet an die TMD (141), wobei die genaue Position noch unklar ist. NPS2143 besitzt ein chirales C-Atom und der R-Enantiomer bindet mit einer höheren Affinität an den Rezeptor als der S-Enantiomer (140).

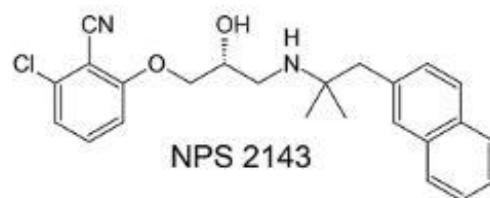


Abbildung 9 Strukturformel von NPS2143. Modifiziert nach Nemeth et al. (138).

Durch seine lange Wirkung kann der Inhibitor die Spiegel von PTH über eine längere Zeit aufrecht erhalten und führt so zum Aufbau von neuem Knochen (138). Dieser Mechanismus wird sich in der klinischen Praxis bei der Osteoporose-Therapie zunutze gemacht (138). An einem ovariectomierten Rattenmodell wurde NPS2143 angewendet, um die Auswirkungen auf die postmenopausale Osteoporose untersuchen zu können. Nach einer fünfwöchigen Applikation konnte jedoch keine Zunahme der Knochendichte nachgewiesen werden (161). Deshalb ist die klinische Anwendung im Rahmen der Osteoporose-Therapie derzeit nicht möglich (138). Unterschiedliche Studien untersuchten den Einfluss von NPS2143 auf

verschiedene Pathologien und die Tumorgenese, um therapeutische Rückschlüsse abzuleiten. Im Modell erfolgte die Anwendung von NPS2143 bei Asthma bronchiale, wobei die Hyperreaktivität der glatten Muskelzellen erfolgreich reduziert werden konnte (136). Der negative allosterische Modulator trägt außerdem durch die Hemmung vieler Signalprozesse zur Inhibition der Entzündung bei (162). Ebenfalls an der Lunge wurden die Effekte auf das Krankheitsbild der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) untersucht. Hier kommt es, oft verursacht durch Zigarettenrauch, zu einer erhöhten Schleimproduktion (163). An der Pathogenese dieses Krankheitsbilds scheint der MAPK-Signalweg beteiligt zu sein, dessen Aktivierung sich durch die Behandlung mit NPS2143 reduzierte (163). Außerdem nahm durch die Anwendung von NPS2143 die Expression der MMP-9 ab, welche die extrazelluläre Matrix abbaut und als Aktivitätsmarker für die COPD verwendet werden kann. Die Expression von inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) reduzierte sich (163). Der Inhibitor NPS2143 erzeugt am CaSR ein *biased-signaling*, wobei seine Signalwege hemmend moduliert werden, der Transport des Rezeptors zur Zelloberfläche aber gleichzeitig erhöht wird (20) (164).

Bei verschiedenen Mutationen des CaSR, wie sie bei unterschiedlichen Krankheitsbildern zu finden sind, kann durch die Anwendung von NPS2143 die Funktion der intrazellulären Signalkaskaden wiederhergestellt werden (165). Dies wurde besonders bei *gain-of-function* mutierten CaSR beobachtet (165). Bei einer Bindung an die ECD des Rezeptors konnte der Inhibitor – ähnlich wie Cinacalcet – die Effekte einer *gain-of-function* Mutation und die folglich erhöhte Aktivität reduzierend kompensieren (141). Eine leicht zu transportierende Rezeptorform wird stabilisiert, was allerdings nicht bei allen *gain-of-function* Mutationen zutrifft (166). Beispielsweise wurde in einem Mausmodell mit *gain-of-function* mutiertem CaSR die Hypokalzämie durch Anwendung von NPS2143 korrigiert, indem der PTH-Spiegel angehoben wurde. Bei einer langen Expositionszeit wird NPS2143 möglicherweise in das Zellinnere aufgenommen und beeinflusst die Konformation neu synthetisierter Rezeptoren am rER destabilisierend (166) (Abbildung 10).

In einer weiteren Studie konnte für NPS2143 auch eine antitumoröse Wirkung nachgewiesen werden, bei der ein zeitabhängiger inhibitorischer Effekt auf das Zellwachstum der Tumoren auftrat. Für Zellen des Magenkarzinoms konnte eine Inhibition der Proliferation und Migration nachgewiesen werden. Diese Zellen exprimierten den CaSR verstärkt (167). Durch Blockade des Rezeptors kam es nicht zur Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs, der bei Tumoren oftmals verändert ist. Dadurch konnte die Proliferation inhibiert und die Apoptose gefördert werden (167). Die Anwendung von NPS2143 erhöhte die Apoptoserate (167). Untersuchungen mit Melanom-Zellen konnten die inhibitorischen Effekte auf Proliferation und Migration ebenso bestätigen wie eine Aktivierung der Apoptose über den mitochondrialen Weg (168).

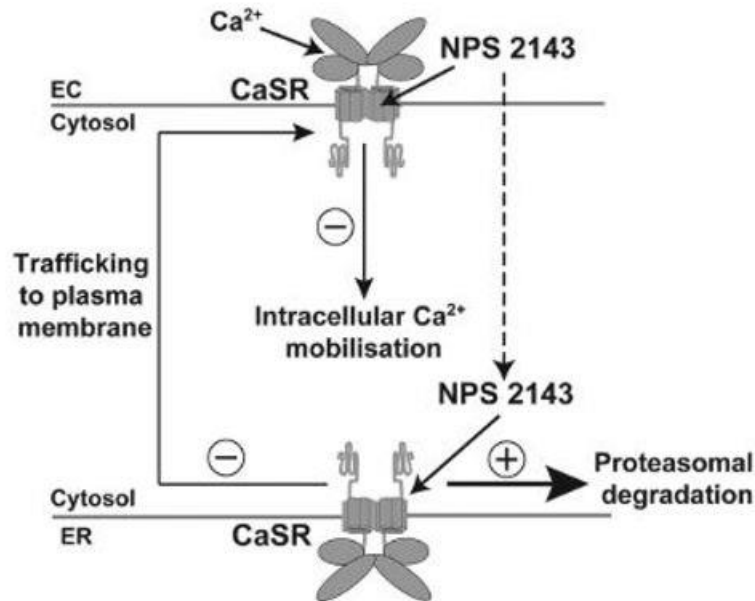


Abbildung 10 Der Einfluss von NPS2143 auf den CaSR. Durch Bindung von NPS2143 an die Transmembran-Domäne (TMD) des Calcium-sensitiven Rezeptors (CaSR), welche den Extrazellularraum (EC) mit dem Zytosol verbindet, wird der Rezeptor blockiert und die intrazelluläre Calciummobilisierung reduziert. Die Aufnahme des Inhibitors ins Zytoplasma ermöglicht eine Rezeptorbindung am endoplasmatischen Retikulum (ER), sodass der Transport zur Plasmamembran vermindert und der Rezeptorabbau mittels Proteasomen gefördert wird. *Modifiziert nach Hannan et al. (166).*

## 2.4.6 Bedeutung des CaSR für das Krankheitsbild der Endometriose

Die Bedeutung des CaSR für das Krankheitsbild der Endometriose ist derzeit noch nicht bekannt. Untersuchungen zu seiner Expression in Zellen des Endometriumkarzinoms liegen vor und zeigten eine verringerte Expression (169). Es wird eine inhibitorische Rolle des Rezeptors im Sinne eines Tumorsuppressors bei dieser Tumorentität vermutet. Der *knock-down* des Rezeptors konnte das Überleben der Zellen und ihre Invasivität erhöhen (169). Außerdem ermöglichte der aktive CaSR die Bildung eines E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin-Komplexes an der Zellmembran der Endometriumkarzinom-Zellen und inhibiert potenziell die Tumordinvasion (169). Die Kombination aus Calcium und CaSR schien in der verwendeten Ishikawa-Zelllinie die Apoptose zu induzieren (169).

Eine andere Studie untersuchte die Rolle des Stanniocalcin-1 (STC-1), einem Molekül des Calciumhaushalts und Ligand des CaSR, im Kontext der Endometriose. Bei STC-1 handelt es sich um ein Glykoprotein, welches von der PKC phosphoryliert wird und im Kreislauf außer bei einer Schwangerschaft nicht detektiert werden kann (170) (171). Das Molekül reguliert das Calcium- und Phosphatgleichgewicht im Körper und spielt potenziell bei der Implantation eine

Rolle. STC-1 scheint ein wichtiger Parameter der normalen und pathologischen Endometrium-Funktion zu sein (172). Der für die STC-1-Sekretion verantwortliche Rezeptor ist CaSR (173). Er vermittelte in einem Fischmodell die Sekretion in Abhängigkeit der extrazellulären Calciumkonzentration und wies dem STC-1 eine anti-hypercalcämische Aufgabe zu (173). Calcimimetika beeinflussten die Sekretion positiv, da der Rezeptor sensitiver wurde (173).

Die Expression des CaSR wies im humanen Endometrium unter zyklischen hormonellen Einflüssen keine Veränderung auf (172). Ebenso konnten keine Veränderungen bei Endometriose-Patientinnen beobachtet werden (172). Allerdings zeigte sich eine Dysregulation der STC-1 Expression bei Frauen mit Endometriose in der Mitte der sekretorischen Phase, da dieses verstärkt exprimiert wurden (172). Im Vergleich dazu fluktuierten die mRNA-Spiegel von gesunden Probandinnen zwar während des Menstruationszyklus, es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Die Untersuchung der CaSR-mRNA zeigte in der Gruppe unter Einfluss des Zyklus keine Unterschiede hinsichtlich der Expression (172).

## 2.5 Zielsetzung der Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit ist es, die Rolle des CaSR für das Krankheitsbild der Endometriose zu untersuchen und seine Einflüsse auf die Progression zu erörtern. Der CaSR scheint bei vielen Pathologien, besonders bei malignen Prozessen, in seiner aktiven Form einen Einfluss auf das funktionelle Zellverhalten zu nehmen. Eine Überexpression und gleichzeitige Aktivierung stellt sich hierbei als migrations- und proliferationsfördernd heraus. Es soll untersucht werden, ob diese Mechanismen beim Krankheitsbild der Endometriose ebenso beeinflusst werden. Durch den Nachweis des CaSR im Western-Blot wird eine Aussage zu seinem Expressionsmuster in der Endometriose-Zelllinie 12Z möglich. Dieser Nachweis ist Grundlage für nachfolgende Versuche zum funktionellen Zellverhalten.

Durch Variationen des extrazellulären Calciumspiegels mittels  $\text{CaCl}_2$  soll auf die dosisabhängige Aktivierung des Rezeptors rückgeschlossen werden und folgende Konsequenzen für das funktionelle Zellverhalten werden dargestellt. Um die Ergebnisse verifizieren zu können, ist die Blockade des CaSR durch seinen Inhibitor NPS2143 notwendig. Dadurch können mögliche Unterschiede hinsichtlich des funktionellen Zellverhalten auf den CaSR zurückgeführt werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien

*Tabelle 1 Verwendete Chemikalien*

| <b>Chemikalien</b>                                  | <b>Firma</b>                  |
|---|-------------------------------|
| Acrylamid Rotiphorese Gel 30                        | Carl Roth, Karlsruhe          |
| AlamarBlue®   | Thermo Fisher Scientific, USA |
| APS, p.a.   | Carl Roth, Karlsruhe          |
| Aqua dest.  | Fresenius Kabi, Bad Homburg   |
| BSA   | Sigma-Aldrich, USA            |
| CaCl <sub>2</sub>                                   | Merck, Darmstadt              |
| DMEM/F12  | Thermo Fisher Scientific, USA |
| DMEM -HAM's F12                                     | Bioconcept, Schweiz           |
| DMSO  | Sigma-Aldrich, USA            |
| DPBS  | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Enhanced Luminol Reagent                            | PerkinElmer Inc., USA         |
| Ethanol absolute (99,8 %)                           | AppliChem, Darmstadt          |
| Fetales Kälber-Serum (FCS)                          | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Fibronektin 1 mg/ml                                 | Merck, Darmstadt              |
| Glutamax  | Thermo Fisher Scientific, USA |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1M                   | Merck, Darmstadt              |
| Hemacolor® Rapid Staining of Blood Smear Solution 2 | Merck, Darmstadt              |
| Hemacolor® Rapid Staining of Blood Smear Solution 3 | Merck, Darmstadt              |
| Immersionsöl  | Zeiss, Oberkochen             |
| NaOH  | Merck, Darmstadt              |
| NPS2143   | Tocris Bioscience, UK         |
| Magermilchpulver                                    | AppliChem, Darmstadt          |
| Oxidizing Reagent                                   | PerkinElmer Inc., USA         |
| Penicillin/-Streptomycin                            | Sigma-Aldrich, USA            |
| Phosphatase Inhibitor Cocktail II                   | Sigma-Aldrich, USA            |
| Protease Inhibitor Cocktail                         | Sigma-Aldrich, USA            |

| <b>Chemikalien</b>                  | <b>Firma</b>         |
|-------------------------------------|----------------------|
| Roti-Block 10x Konzentrat           | Carl Roth, Karlsruhe |
| Roti-Blot K 10x Konzentrat          | Carl Roth, Karlsruhe |
| Roti-Blot A 10x Konzentrat          | Carl Roth, Karlsruhe |
| Roti-blue 5x Konzentrat             | Carl Roth, Karlsruhe |
| Rotiphorese SDS-PAGE 10x Konzentrat | Carl Roth, Karlsruhe |
| SDS (10 %)                          | Carl Roth, Karlsruhe |
| Sammelgelpuffer                     | Carl Roth, Karlsruhe |
| TEMED                               | Sigma-Aldrich, USA   |
| Puffertabletten nach Weise          | Merck, Darmstadt     |
| Terg-a-Zyme                         | Sigma-Aldrich, USA   |
| Trenngelpuffer                      | Carl Roth, Karlsruhe |
| Trypsin-EDTA                        | Sigma-Aldrich, USA   |
| Tween20                             | Carl Roth, Karlsruhe |

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

*Tabelle 2 Verwendete Verbrauchsmaterialien*

| <b>Verbrauchsmaterial</b>  | <b>Firma</b>                   |
|--|--------------------------------|
| Aluminiumfolie   | Paclan, Mönchengladbach        |
| Deckgläser Marienfeld 24x50 mm   | Marienfeld, Lauda-Königshofen  |
| Einweghandschuhe nitril  | JOZA, MedNet, Münster          |
| Einwegpipetten Cellstar®, serologisch<br>(1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 50 mL)  | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| Kryoröhrchen Cryogenic Tubes   | Thermo Fisher Scientific, USA  |
| LUNA™ Cell Counting Slides   | Logos Biosystems, Südkorea     |
| Membranen für Boydenkammer,<br>8 µm Pore                                   | Neuroprobe, USA                |
| Objektträger   | Vogel, Gießen                  |
| Pasteurpipetten, Kunststoff  | VWR® International, USA        |
| Pipettenspitzen FilterTips, TipOne®<br>(0,5-10 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL) | Eppendorf, Hamburg             |
| Polypropylen Röhrchen (15 mL, 50 mL)                                       | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| Reaktionsgefäße (0,5; 1 und 2 mL)  | Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht |
| Schülke Wipes 70 % Ethanol   | Schülke, Norderstedt           |

| <b>Verbrauchsmaterial</b>   | <b>Firma</b>                   |
|---|--------------------------------|
| Zellkulturflaschen, Cellstar®<br>(25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> ) | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| Zellkulturplatten, Cellstar® (96-Well)                                      | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| Zellkulturschalen (100 mm x 20 mm)  | Greiner Bio-One, Frickenhausen |

### 3.1.3 Gebrauchsmaterialien

*Tabelle 3 Verwendete Gebrauchsmaterialien*

| <b>Gebrauchsmaterial</b>   | <b>Firma</b>            |
|--|-------------------------|
| Abwurfbehälter   | Dahlhausen, Köln        |
| Blotting Roller  | Invitrogen, USA         |
| Boyden- Migrationskammer,<br>48-Well-Mikro-Chemotaxis-Kammer                             | Neuroprobe, USA         |
| Dewargefäß   | KGW Isotherm, Karlsruhe |
| Filtertemplate für Boydenkammer  | Neuroprobe, USA         |
| Küchenschaber  | Rössle, Markoberdorf    |
| Medizinischer Abfallbehälter   | Infa Lentjes, Herdecke  |
| Mehrkanalpipetten Transferpette® S-8<br>(10-100 µL, 20-200 µL)                           | Brand, Wertheim         |
| Pipetten Eppendorf Research<br>(0,5-10 µL, 1-100 µL, 2-20 µL, 20-200 µL,<br>100-1000 µL) | Eppendorf, Hamburg      |
| Pipettierhilfe, Accu-jet pro   | Brand, Wertheim         |
| Polystyrene Reagent Reservoir 25 mL  | VWR International, USA  |
| Pinzetten  | Labotec, Wiesbaden      |
| Scheren  | Aesculap, Buchbach      |
| Schutzbrille   | Uvex, Fürth             |
| Stoppuhr   | TFA Dostmann, Wertheim  |
| Transferpette® (0,5-10µl, 10-100µl)  | Brand, Wertheim         |

### 3.1.4 Kit-Systeme

*Tabelle 4 Verwendete Kit-Systeme*

| <b>Kit-System</b>                                 | <b>Firma</b>                  |
|---|-------------------------------|
| BCA Protein Assay Kit                             | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Kit | Roche Diagnostics, USA        |
| Western Lightning Plus-ECL Kit                    | PerkinElmer Inc., USA         |

### 3.1.5 Geräte

*Tabelle 5 Verwendete Geräte*

| <b>Gerät</b>                              | <b>Firma</b>                       |
|---|------------------------------------|
| Absaughilfe Vacuboy                       | Vaccubrand, Wertheim               |
| Autoklav                                  | Zirbus, Bad Grund                  |
| BIO-RAD Mini PROTEAN Tetra System         | BIO-RAD, USA                       |
| BIO-RAD Trans-Blot Turbo                  | BIO-RAD, USA                       |
| CO <sub>2</sub> -Inkubator Hera Cell 150  | Thermo Fisher Scientific, USA      |
| Computer                                  | LG, Südkorea                       |
| Eismaschine                               | Scotsman, Italien                  |
| Gefrierschrank -20 °C                     | Bauknecht, Stuttgart               |
| Gefrierschrank -80 °C Heraeus Hera freeze | Thermo Fisher Scientific, USA      |
| Geldetektionsgerät Fluorochem E           | ProteinSimple, USA                 |
| GLOMAX® multi                             | Promega detection system, Mannheim |
| Heraeus Fresco 17 Mikrozentrifuge         | Thermo Fisher Scientific, USA      |
| Kryo Stickstofftank Locator 6 Plus        | Thermo Fisher Scientific, USA      |
| Kühlschrank 4 °C                          | Liebherr, Schweiz                  |
| Labor-Feinwaage                           | Sartorius, Göttingen               |
| LUNA™ Automated Cell Counter              | Logos Biosystems, Südkorea         |
| Mikroskop, Axioskop 2                     | Zeiss, Oberkochen                  |
| Mikroskop, Axiovert 200                   | Zeiss, Oberkochen                  |
| Mikroskop, Leica DMIL LED                 | Leica, Schweiz                     |
| Magnet-/Heizrührer                        | Witeg, Wertheim                    |
| Schüttel- und Mischgerät Duomax 1030      | Heidolph Instruments, Schwabach    |
| Sicherheitswerkbank Heraeus HeraSafe      | Thermo Fisher Scientific, USA      |
| Standard power Pack P25                   | Biometra, Göttingen                |

| Gerät                        | Firma                            |
|------------------------------|----------------------------------|
| Thermostat 5320 Block Heater | Eppendorf, Hamburg               |
| Thermoschüttler pro          | Cellmedia GmbH und Co. KG, Zeitz |
| Vortex                       | Heidolph Instruments, Schwabach  |
| Wasserbad AquaLine AL18      | Lauda, Lauda-Königshofen         |
| Zentrifuge 6K15              | Sigma, Osterode                  |

### 3.1.6 Medien und Puffer

Tabelle 6 Verwendete Medien und Puffer

| Medium oder Puffer   | Zusammensetzung  |
|--|--|
| Anodenpuffer   | 84 mL dH <sub>2</sub> O<br>32 mL Ethanol<br>16 mL RotiBlot A   |
| CaCl <sub>2</sub> -reduziertes und FCS-freies Kulturmedium | 500 mL DMEM-HAM's F12<br>5 mL Glutamax<br>5 mL P/S   |
| CaCl <sub>2</sub> - und FCS-reduziertes Kulturmedium       | 30 % DMEM/F12, FCS-frei<br>70 % DMEM-HAM's F12<br>1 % FCS  |
| FCS-freies Kulturmedium                                    | 500 mL DMEM/F12<br>5 mL P/S  |
| Kathodenpuffer   | 84 mL dH <sub>2</sub> O<br>32 mL Ethanol<br>16 mL RotiBlot K   |
| Kulturmedium   | 500 mL DMEM/F12<br>50 mL FCS<br>5 mL P/S   |
| Ladepuffer (6x)  | 350 mM Tris-HCl, 34,4 % Glycerol, 10 % SDS,<br>10 % β-Mercapto-Ethanol, 0,06 %<br>Bromphenolblau, eingestellt auf einen pH-Wert<br>von 6,8 |

| <b>Medium oder Puffer</b> | <b>Zusammensetzung</b>   |
|---------------------------|--|
| Lysepuffer                | 500 µL 10x Puffer C<br>50 µL Phosphatase-Inhibitor<br>50 µL Protease-Inhibitor<br>50 µL DTT<br>4350 µL dH <sub>2</sub> O       |
| Puffer nach Weise         | 1 Puffertablette<br>1 l dH <sub>2</sub> O  |
| Sammelgelpuffer           | Carl Roth, Karlsruhe   |
| Trenngelpuffer            | Carl Roth, Karlsruhe   |
| 10x Puffer C              | 20 mM Hepes<br>0,2 M NaCl<br>0,5 mM MgCl <sub>2</sub><br>0,4 mM EDTA<br>1 % Triton X-100                                       |
| 1x Rotiblock              | 100 mL 10x Rotiblock<br>900 mL dH <sub>2</sub> O   |
| 1x SDS-Laufpuffer         | 100 mL 10x SDS-Laufpuffer<br>900 mL dH <sub>2</sub> O<br>26 g Tris-HCl<br>4,24 g Tris<br>292,7 g NaCl<br>1 l dH <sub>2</sub> O |
| 10x TBS                   |  |
| 1x TBST                   | 100 mL 10x TBS<br>900 mL dH <sub>2</sub> O<br>1mL Tween20  |

### 3.1.7 Antikörper

*Tabelle 7 Verwendete Antikörper*

| <b>Antikörper</b>  | <b>Klon</b> | <b>Bestellnummer/Firma</b>                    |
|--------------------|-------------|---|
| Anti-β-Aktin       |             | A5441/Sigma-Aldrich,<br>St. Louis USA         |
| Anti-CaSR Antibody | Monoklonal  | 5C10/ADD, Novus<br>biologicals, Littleton USA |

### 3.1.8 Computerprogramme

Tabelle 8 Verwendete Computerprogramme

| Computerprogramm        | Firma                      |
|-------------------------|----------------------------|
| Leica Application Suite | Leica, Schweiz             |
| Microsoft Excel         | Microsoft Corporation, USA |

### 3.1.9 Kontinuierliche Zelllinien

#### 12Z (Goethe-Universität, Frankfurt am Main)

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um epitheliale Endometriose-Zellen aus einer roten peritonealen Läsion einer 37-jährigen Frau während der proliferativen Zyklusphase, die mittels des SV40-Virus immortalisiert wurde ([24](#), [67](#)). Die Zellen exprimieren unter anderem den Östrogenrezeptor  $\alpha$  und  $\beta$ , Progesteronrezeptoren und die Aromatase - P450 ([67](#)). Sie wurden freundlicherweise von Frau Prof. Starzinski-Powitz von der Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Steriles Arbeiten

Zur Vermeidung unerwünschter Kontamination fand die Versuchsdurchführung an einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen statt. Alle verwendeten Materialien wurden steril geliefert oder waren autoklaviert. Vor Beginn wurden alle notwendigen Medien in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt und vor dem Überführen in die Werkbank mit 70 %igem Ethanol (EtOH) desinfiziert, um eine Kontamination zu verhindern. Beim Arbeiten mit Zellen wurden stets Einweg-Handschuhe getragen.

### 3.2.2 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C und unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (5 %) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 %. In regelmäßigen Abständen wurde das Zellwachstum kontrolliert und das Kulturmedium ausgewechselt, sobald ein Farbumschlag hin zum Bernsteinfarbenen stattgefunden hatte. Für die Zelllinie 12Z wurde das Kulturmedium DMEM/F12 mit dem Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) sowie

1 % Penicillin/-Streptomycin verwendet. Nachdem das konfluente Wachstum der Zellen überprüft worden war, wurden sie gesplittet und unter einer höheren Passage-Nummer weiterkultiviert. Dazu wurde das ursprüngliche Medium abgesaugt, der adhärente Zellrasen mit 10 mL *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline* (DPBS) gewaschen und anschließend mit 1 mL Trypsin-EDTA abgelöst. Nach der Inkubationszeit von rund 60 Sekunden wurden 9 mL FCS-haltiges Medium zugegeben, um die Reaktion zu stoppen.

Im Anschluss an die Resuspension wurde ein Teil der Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit vorgelegtem Medium überführt, welche mit Zelllinie, Passage-Nummer und Datum der Passage beschriftet worden war. Am Tag der jeweiligen Versuchsdurchführung wurden die Zellen auf ein FCS- und Calcium-reduziertes Medium umgestellt. Am Versuchstag selbst wurde ein FCS-freies und gleichfalls Calcium-reduziertes Medium verwendet.

### 3.2.3 Zellkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der benötigten Zellzahl für die Versuche wurden die Zellen in Suspension mithilfe des Systems *LUNA™ Automated Cell Counter* gezählt. Hierfür wurden 10 µL einer Zellsuspension, die nach oben beschriebener Methode erhalten worden war, in einen zu dem System gehörenden Objektträger aus Kunststoff pipettiert und in das Gerät überführt. Um eine möglichst genaue Zählung sicherzustellen, wurde das Bild möglichst scharf eingestellt und der auszuzählende Bereich auf Zellklumpen kontrolliert. Die Konzentration der Zellen in der Suspension wurde auf dem Gerät in der Einheit (Zellzahl/mL) angegeben. Mit der erhaltenen Zellkonzentration konnten im Anschluss die für Versuche benötigten Volumina berechnet und die entsprechende Menge Zellsuspension entnommen werden.

### 3.2.4 Kryo-Konservierung und Rekultivierung

Die durchgeführte Kryo-Konservierung sollte das Fortschreiten höherer Passagen zwischen den einzelnen Versuchen minimieren. Dazu wurde das Nährmedium aus den Zellkulturflaschen entfernt, der adhärente Zellrasen mit 10 mL DPBS gewaschen und anschließend unter Verwendung von 1 mL Trypsin-EDTA unter Beachtung der zellspezifischen Inkubationszeit abgelöst. Diese Reaktion wurde durch die Zugabe von 9 mL Kulturmedium abgestoppt, sodass die Zellsuspension im Anschluss in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt werden konnte. Nun wurden die Gefäße für 4 min bei 300 g und Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1 mL FCS mit 10 % DMSO resuspendiert und in ein Kryogefäß überführt, welches mit Informationen zu Zelllinie, Passage-Nummer und Datum beschriftet wurde. Die Kryogefäße wurden dann in einem

## Material und Methoden

Isopropylbehälter für 24 h bei -80 °C eingefroren, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt werden konnten. Für die Reaktivierung wurden die Kryogefäße dem Stickstofftank entnommen und den Sicherheitsvorkehrungen folgend zur sterilen Werkbank transportiert. Vor der Verdünnung mit 1 mL Kulturmedium wurden die Kryogefäße in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Danach erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 300 g, nach welcher der Überstand abgesaugt und verworfen wurde. Das Zellpellet wurde mit 3 mL Nährmedium resuspendiert, sodass die Suspension anschließend in eine Zellkulturflasche mit 25 cm<sup>2</sup> Fläche, in der entsprechend Kulturmedium vorgelegt worden war, überführt werden konnte.

### 3.2.5 Proteinanalyse

Um die Expression des CaSR in der Zelllinie 12Z nachzuweisen, wurden Proteinanalysen durchgeführt. Alle Arbeiten mit Proteinen erfolgten auf Eis. Zuerst wurden die Proteine aus den Zellen extrahiert und dann ihre Konzentration bestimmt. Anschließend erfolgten Natrium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot-Analysen, sodass die Proteine anhand ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt und detektiert werden konnten.

#### 3.2.5.1 Proteinextraktion aus Zellkulturen

Zur Gewinnung der Proteine wurden die Zellen der Zelllinie 12Z in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/mL in Zellkulturschalen (145/20 mm) ausgesät und für 24 h anwachsen gelassen. Das Medium wurde am nächsten Tag entfernt und durch ein FCS-freies Medium ersetzt. Im Anschluss an die Inkubation wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 10 mL eiskaltem DPBS pro Schale gewaschen. Danach wurden 500 µL Lysepuffer pro Zellkulturschale zugegeben. Nach mechanischer Ablösung der Zellen mittels Zellschaber wurden sie in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt.

Die Lysate lagerten für 30 min auf Eis und wurden zwischenzeitlich gevortext, um eine Durchmischung zu gewährleisten. Danach wurden die Suspensionen für 10 min bei 2000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand, der die Proteine enthielt, konnte in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren werden.

### 3.2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinmenge aus den Zell-Lysaten wurde eine quantitative Konzentrationsbestimmung mittels *BCA protein assay reagent kit* der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Das Prinzip beruht auf einer Reduktion von zweiwertigen Kupferionen im alkalischen Medium durch Proteine zu einwertigen Kupferionen (Biuret-Reaktion). Die Ionen bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violett gefärbten Komplex, dessen Absorption bei 562 nm photometrisch gemessen werden kann. Für die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden 15 µL Zell-Lysat in einem 2 mL Reaktionsgefäß mit 60 µL dH<sub>2</sub>O verdünnt. Dabei betrug die Proteinkonzentration 3182,83 µg/mL. Es wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) eine Verdünnungsreihe angesetzt und 75 µL von jedem Ansatz in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurden in jede Probe 600 µL der Reaktionslösung (Lösung A: Lösung B 50:1) hinzugefügt. 200 µL jeder Probe wurden in dreifacher Replikation auf eine 96-Well-Platte überführt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Absorption bei  $\lambda = 562$  nm detektiert. Die Datenauswertung erfolgte mittels Microsoft Excel.

### 3.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung wurden die Proteine nach dem Prinzip des SDS-PAGE anhand ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Für eine Molekülmasse von über 100 kDa kommt ein 7,5 %-iges Trenngel zum Einsatz. Die Eigenladung der Proteine wurde durch das anionische Detergens SDS überdeckt, sodass alle Proteine eine einheitlich negative Ladung aufwiesen.

Für die Herstellung der Polyacrylamid-Gele wurde das Trenngel mithilfe des Pipettierschemas (Tabelle 9) hergestellt und in die Gießapparatur eingegossen. Das Trenngel wurde sofort mit 1 mL EtOH bedeckt. Nach 30 min Polymerisation wurde das EtOH abgegossen und der Ansatz für das Sammelgel hinzugefügt. Durch Einlage eines Kamms wurden Aussparungen für die Probenaschen geformt. Das Gel polymerisierte für 30 min. Die Nutzung zweier unterschiedlicher Gele (diskontinuierlichen Gelelektrophorese) ermöglichte eine einheitliche Probenauftrennung. Nach Durchwanderung des Sammelgels erreichten die Proteine einen gemeinsamen Startpunkt, bevor sie in das Trenngel wanderten.

Tabelle 9 Pipettierschema SDS-PAGE für 2 Gele

| Substanz         | Trenngel (7,5 %) | Sammelgel (4 %) |
|------------------|------------------|-----------------|
| Aqua dest.       | 5,3 mL           | 3,4 mL          |
| Acrylamid (30 %) | 2,5 mL           | 830 µL          |
| Trenngelpuffer   | 2,6 mL           | -               |
| Sammelgelpuffer  | -                | 630 µl          |
| SDS (10 %)       | 100 µl           | 50 µl           |
| APS              | 100 µl           | 50 µl           |
| TEMED            | 4 µl             | 5 µl            |

Während der Polymerisation der Gele wurden die bereits in Ladepuffer gelösten Proteine für 10 min bei 96 °C aufgeköcht und nach einer kurzen Zentrifugation auf Eis inkubiert. Dabei betrug die Proteinkonzentration 4077 µg/mL und es wurden 50 µg pro Tasche verwendet. Nach abgeschlossener Polymerisation wurden die Kämme vorsichtig entfernt und die Gele in eine Gelelektrophorese-Kammer der Firma BioRad eingesetzt. Die Kammer wurde mit 1x SDS-Rotiphorese-Puffer befüllt. Die erste Geltasche wurde mit 5 µL des *BenchMark™* zur optischen Detektion und 3 µL des *MagicMark™* zur Lumineszenz-Detektion gefüllt. Die anderen Taschen wurden mit 15 µL der eingesetzten Proteinprobe beschickt. Um die Proteinauftrennung zu starten, wurde die Elektrophorese-Kammer an den *power supply* gekoppelt und mit Strom versorgt.

In einer ersten Phase wurden die Proteine bei konstanter Spannung von 75 V durch das Sammelgel geführt. In der darauffolgenden Trenngel-Phase wurde die Spannung auf 125 V erhöht. Die Spannungsquelle wurde abgestellt, sobald die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Direkt im Anschluss wurden die Gele aus der Kammer entnommen und geblottet.

### 3.2.5.4 Western-Blot

Zur Analyse nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine wiederum durch Stromfluss in Richtung Anode von dem Polyacrylamid-Gel auf die Polyvinylidendifluorid-Transfermembran (PVDF-Membran) überführt. Kurz vor Ende der Gelelektrophorese-Phase wurden die Kathoden- und die Anodenpuffer angesetzt. Die PVDF-Membran und zwölf Filterpapiere wurden auf eine zum Gel passende Größe zugeschnitten. Die Membran wurde zur Aktivierung 1 min in EtOH gelegt, danach für 2 min in dH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend für 5 min in Anodenpuffer äquilibriert. Je sechs Filterpapiere wurden in Anoden- oder Kathodenpuffer getränkt. Die Anode wurde mit Anodenpuffer befeuchtet und anschließend mit sechs

getränkten Filterpapieren belegt. Es folgte die PVDF-Membran, das Gel und sechs in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Mögliche Luftblasen wurden mit dem Blotting-Roller entfernt. Die Apparatur wurde angeschlossen und die Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert, wobei eine Spannung von 25 V und eine Stromstärke von 0,1 A für 30 min angelegt wurde.

### 3.2.5.5 Proteindetektion

Nach der Übertragung der Proteine auf die Membran wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine Behandlung mit 20 mL 5 % Milchpulver-Lösung in 1x TBST für 1 h auf dem Inkubationsschüttler blockiert. Danach wurden die Membranen in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt und über Nacht bei 4 °C auf einem Rollschüttler mit dem primären Antikörper inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in einer 1:1000 Verdünnung im Blocking-Reagenz angesetzt. Nach Entfernung am nächsten Tag und Lagerung bei -20 °C konnte die Antikörperlösung weitere zwei bis drei Mal verwendet werden. Die Membranen wurden dreimal für 10 min mit 1x TBST gewaschen. Während dieser Zeit wurde die sekundäre Antikörperlösung, welche gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet war, 1:5000 im Blocking-Puffer verdünnt.

Es erfolgte die Inkubation des sekundären Antikörpers für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Erneut wurden die Antikörperreste durch einen dreimaligen Waschschrift mit TBST auf dem Schüttler entfernt. Der sekundäre Antikörper war an eine Peroxidase gekoppelt, die nach Zugabe eines Substrats eine Reaktion katalysiert, welche durch Chemielumineszenz sichtbar gemacht werden kann. Als Substrat diente das *Western Lightning Plus ECL* Detektionsreagenz, bestehend aus gleichen Teilen *Oxidizing Reagent* und *Enhanced Luminol Reagent Plus*. Diese Lösung wurde im Verhältnis 1:1 angesetzt, bedeckend auf die Membran gegeben und für eine Minute bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt und durch Ausrollen von überschüssigem ECL-Reagenz und Luftblasen befreit. Mittels des *Fluorchem Detektors* wurde die Chemilumineszenz der Proteinbanden detektiert und durch das Programm Alpha View quantifiziert und mit Microsoft Excel bearbeitet.

Um die Membran mehrfach verwenden zu können, wurde sie nach der Proteindetektion gestriipt, sodass die gebundenen Antikörper entfernt wurden. Dazu wurde die Membran 5 min in dH<sub>2</sub>O gewaschen, 20 min mit 0,2 M NaOH auf dem Schüttler inkubiert und wieder für 5 min mit dH<sub>2</sub>O gewaschen.

### 3.2.6 AlamarBlue™ -Zellviabilitäts-Assay

Die Zellviabilität wurde mithilfe des *AlamarBlue*™-Assays bestimmt, wobei die Menge des umgesetzten *AlamarBlues* mit der Viabilität korreliert. Der Assay basiert auf der metabolischen Aktivität vitaler Zellen und deren Fähigkeit, ein Substrat durch Reduktion in ein anderes zu überführen. Der zunächst blaue, nicht fluoreszierende Farbstoff Resaruzin wird durch enzymatische Reduktion in die rote und stark fluoreszierende Substanz, Resorufin umgesetzt. Diese Fluoreszenz verhält sich proportional zur Stoffwechselaktivität der Endometriose-Zellen. Da Resorufin nicht toxisch für die verwendete Zelllinie ist, konnten die vorbereiteten 96-Wellplatten wiederverwendet werden.

Eine 96-Wellplatte wurde mit je 100 µL einer Zellsuspension beschickt, die durch Trypsin-Reaktion, Zentrifugation, Zellkonzentrationsbestimmung und Resuspension in FCS-haltigem Kulturmedium erhalten worden war. Pro Well wurden  $2,5 \times 10^3$  Zellen ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium entfernt und nach einem Waschgang mit je 100 µL DPBS durch ein FCS- und Calcium-reduziertes Medium ersetzt.

Am Versuchstag wurde dieses Medium ebenfalls entfernt und jeweils 100 µL der CaCl<sub>2</sub>- und/oder NPS2143-Behandlung (Tabelle 10, Tabelle 11) nach vorherigem Waschen zugegeben, wobei die Inkubationszeit für die CaCl<sub>2</sub>-Behandlung bei 30 min und in einer weiteren Versuchsreihe bei 16,5 h lag. Die isolierte Inkubationszeit des Inhibitors NPS2143 belief sich auf 60 min und wurde ebenso wie die CaCl<sub>2</sub>-Behandlung im CO<sub>2</sub>-Inkubator durchgeführt. Bei einer Kombination aus CaCl<sub>2</sub> und Inhibitor NPS2143 wurde zunächst die entsprechende NPS2143-Konzentration zugegeben und für 30 min inkubiert. Danach wurde die entsprechende Menge an CaCl<sub>2</sub> zugegeben und für weitere 30 min inkubiert, sodass die Gesamtinkubationszeit für NPS2143 bei 60 min und für CaCl<sub>2</sub> bei 30 min lag.

Die Medien wurden entfernt und jeweils 100 µL einer *AlamarBlue*-Lösung, die zuvor 1:10 in einem FCS-freien und CaCl<sub>2</sub>-reduzierten Medium verdünnt worden war, zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Fluoreszenz des Resorufins bei  $\lambda = 525$  nm gemessen (Referenz  $\lambda = 600$  nm). Die anschließende Datenauswertung erfolgte mittels Microsoft Excel.

*Tabelle 10* CaCl<sub>2</sub>- Konzentrationen für den AlamarBlue™-Zellviabilitäts-Assay (angesetzt in einem FCS- und Calcium-reduzierten Medium)

|                           |   |   |   |     |   |     |    |    |                 |
|---------------------------|---|---|---|-----|---|-----|----|----|-----------------|
| CaCl <sub>2</sub><br>(mM) | - | 1 | 2 | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | 20 | 30 min / 16,5 h |
|---------------------------|---|---|---|-----|---|-----|----|----|-----------------|

## Material und Methoden

Tabelle 11 NPS2143-Konzentrationen für den AlamarBlue™-Zellviabilitäts-Assay (angesetzt in einem FCS- und Calcium-reduzierten Medium)

|                              |   |       |      |     |      |     |       |        |
|------------------------------|---|-------|------|-----|------|-----|-------|--------|
| NPS2143<br>( $\mu\text{M}$ ) | - | 1,075 | 2,15 | 4,3 | 6,45 | 8,6 | 10,75 | 60 min |
|------------------------------|---|-------|------|-----|------|-----|-------|--------|

### 3.2.7 Zellproliferations-Assay

Für den Nachweis der Zellproliferation wurde ein Kit der Firma Roche verwendet, welches auf dem Einbau von BrdU (Bromdesoxyuridin) in die DNA der Zellen basiert. Mithilfe eines Antikörpers, an den eine Peroxidase gekoppelt ist, wird das BrdU detektiert. Durch die Peroxidase wird ein Substrat umgesetzt, sodass der entstehende Farbumschlag photometrisch gemessen werden kann. Hierbei ist die Intensität des Signals proportional zur Menge des eingebauten BrdU's und spiegelt dadurch die proliferative Kapazität der Endometriose-Zellen wider.

Zur Versuchsdurchführung wurde eine 96-Well-Platte mit je 100  $\mu\text{L}$  einer Zellsuspension beschickt, die zuvor durch Trypsin-Reaktion, Zentrifugation, Zellkonzentrationsbestimmung und Resuspension in FCS-haltigem Medium gewonnen worden war. Pro Well wurden  $2,5 \times 10^3$  Zellen ausgesät. Am Folgetag wurde das Nährmedium gegen ein FCS- und Calcium - reduziertes Medium ausgetauscht und für 24 h belassen. Schließlich wurde dieses Medium am Versuchstag entfernt und die Zellen mit DPBS gewaschen, bevor 100  $\mu\text{L}$  des mit  $\text{CaCl}_2$ -versetzten Mediums (Tabelle 12) beziehungsweise des mit  $\text{CaCl}_2$ - und NPS2143-versetzten Mediums (Tabelle 13) in jedes Well gegeben wurde. Die Inkubationszeit für  $\text{CaCl}_2$  betrug 30 min und wurde im  $\text{CO}_2$ -Inkubator bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre durchgeführt. Bei einer Kombination aus  $\text{CaCl}_2$  und Inhibitor NPS2143 wurde zunächst die entsprechende NPS2143-Konzentration zugegeben und für 30 min inkubiert. Danach wurde die notwendige Menge an  $\text{CaCl}_2$  zugegeben und für weitere 30 min inkubiert, sodass die Gesamtinkubationszeit für NPS2143 bei 60 min und für  $\text{CaCl}_2$  bei 30 min lag.

Für den Assay wurde die *BrdU-Labeling-Solution* 1:100 fach in DPBS verdünnt und 10  $\mu\text{L}$  zu den Proben hinzugegeben. Die Proben wurden 2 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach Abkippen der Lösung wurden die adhärenen Zellen mit 200  $\mu\text{L}$ /Well *FixDenat-Lösung* für 30 min bei Raumtemperatur denaturiert und fixiert. Nach Abkippen der *FixDenat-Lösung*, wurden 100  $\mu\text{L}$ /Well einer Antikörper-Lösung (1:100 in *Dilution Solution*) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden dreimal mit der *Washing-Solution* (200  $\mu\text{L}$ /Well, 1:10 in  $\text{dH}_2\text{O}$ ) gewaschen und mit 100  $\mu\text{L}$  Substrat-Lösung versetzt.

## Material und Methoden

Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur wurden 25  $\mu\text{L}$  einer 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung pro Well hinzugegeben und für 1 min auf einer Schüttelplatte bei 300 rpm verteilt. Die Absorption wurde bei  $\lambda = 450 \text{ nm}$  (Referenz  $\lambda = 650 \text{ nm}$ ) gemessen und die Daten mittels Microsoft Excel ausgewertet.

*Tabelle 12*  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen für den Zellproliferations-Assay (angesetzt in einem FCS- und  $\text{CaCl}_2$ -reduzierten Medium)

|                         |   |   |   |     |   |     |    |    |        |
|-------------------------|---|---|---|-----|---|-----|----|----|--------|
| $\text{CaCl}_2$<br>(mM) | - | 1 | 2 | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | 20 | 30 min |
|-------------------------|---|---|---|-----|---|-----|----|----|--------|

*Tabelle 13* Kombinierte  $\text{CaCl}_2$ - und NPS2143-Konzentrationen für den Zellproliferations-Assay (angesetzt in einem FCS- und  $\text{CaCl}_2$ -reduzierten Medium)

|                              |   |     |   |     |     |     |      |        |
|------------------------------|---|-----|---|-----|-----|-----|------|--------|
| $\text{CaCl}_2$<br>(mM)      | - | 2,5 | 5 | 2,5 | 5   | -   | -    | 30 min |
| NPS2143<br>( $\mu\text{M}$ ) | - | -   | - | 4,3 | 4,3 | 4,3 | 6,45 | 60 min |

### 3.2.8 Chemotaktische Migration in der Boyden-Kammer

Durch die Migrationsversuche sollte die chemotaktische Bewegung der Endometriose-Zellen nach  $\text{CaCl}_2$ - und/oder Inhibitorbehandlung zu einem zellspezifischen Lockstoff nachgewiesen werden. Für den Versuchsaufbau wurde eine sogenannte Boyden-Kammer mit 48 Wells verwendet, deren Grundplatte durch eine poröse Polycarbonat-Membran mit einer Porengröße von 8  $\mu\text{m}$  von der Deckplatte getrennt wurde. Diese Membran konnte von den Zellen nicht passiv, sondern allein durch aktive, gerichtete Bewegung überwunden werden. Als Lockstoff diente das chemotaktisch wirkende Fibronectin, welches in der Konzentration 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  verwendet wurde. In die unteren Wells wurde jeweils 29  $\mu\text{L}$  dieses Lockstoffes vorgelegt; als Negativkontrolle diente serumfreies Medium.

Für die Herstellung der Zellsuspension wurden die Zellen auf ein FCS- und Calcium-reduziertes Medium umgestellt. Nach 24 h wurde durch Trypsin-Reaktion, Zentrifugation, Resuspension in FCS- und Calcium-reduziertem Medium und Zellkonzentrationsbestimmung eine Zellsuspension von  $6 \times 10^5$  Zellen generiert, die in 1000  $\mu\text{L}$  Reaktionsgefäße aufgeteilt wurde. Die Suspensionen wurden mit  $\text{CaCl}_2$ , Inhibitor oder der Kombination aus beiden (Tabelle 14) behandelt und 30 min für die  $\text{CaCl}_2$ -Behandlung oder 60 min für die NPS2143-Behandlung inkubiert. Bei der Kombination von  $\text{CaCl}_2$  und NPS2143 erfolgte die Calcium-Zugabe nach 30 min.

## Material und Methoden

Eine Polycarbonat-Membran wurde 2 min in DPBS eingeweicht und mit glänzender Seite nach unten auf die Grundplatte der Boyden-Kammer gelegt. Nach der Befestigung einer Dichtung sowie der Deckplatte wurden 50  $\mu\text{L}$  der Probelösung unter Resuspension in die oberen Wells eingebracht und die Kammer verschlossen. Die Migrationskammer wurde für 16 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert.

Im Anschluss wurden die migrierten Zellen zu fixiert und gefärbt. Zunächst wurde die Zellsuspension aus den Wells der Deckplatte auf ein Papiertuch abgekippt und diese durch Öffnen der Schrauben entfernt. Die Membran wurde vorsichtig abgenommen und zwischen zwei Klammern eingespannt. Es war zu beachten, dass sich die migrierten Zellen auf der glänzenden Membranseite befanden; folglich wurde die Polycarbonat-Membran auf der matten Seite zum Trocknen abgelegt. Die trockene Membran wurde dann mit der matten Seite durch den Puffer nach Weisse gezogen und mithilfe eines Küchenschabers von nicht migrierten Zellen befreit. Anschließend trocknete die Membran erneut mit der glänzenden Seite nach oben an der Luft. Durch ein einminütiges Bad der Membran in EtOH wurden die Zellen auf der glänzenden Seite, die vormals dem Lockstoff zugewandt war, fixiert. Nach erneuter Trocknung an der Luft wurden die Zellen mithilfe des Färbe-Kits *Hemacolor* gefärbt. Dazu wurde die glänzende Membranseite dreimal durch die rötliche Eosin-Lösung und sechsmal durch die bläuliche Thiazin-Lösung gezogen. Anschließend wurde die Membran so lange im Puffer nach Weisse gereinigt, bis keine Farbschlieren mehr zurückblieben. Nach erneuter Trocknung konnte, die auf diese Weise gefärbte Membran zerschnitten, auf einem Objektträger mit Immersionsöl glattgestrichen und mit einem Deckglas bedeckt werden, welches an den Rändern mit klarem Nagellack abgedichtet wurde.

Für die Auswertung wurden die Areale der migrierten Zellen unter dem Lichtmikroskop mit 40-facher Vergrößerung und unter Zuhilfenahme eines Rasterokulars betrachtet. Dieses Rasterokular zeigt ein Quadrat, das aus 10 x 10 Kleinquadraten mit je einer Fläche von 1  $\text{mm}^2$  besteht. Pro Well wurden 10 Raster (entsprechend einer Fläche von 0,25  $\text{mm}^2$ ) mäanderrförmig ausgezählt und der Mittelwert gebildet, wobei nur die Zellen gezählt wurden, die entweder vollständig im Raster lagen oder den unteren bzw. den äußeren rechten Rand berührten. Das Ergebnis wurde in der Einheit Zellen/ $\text{mm}^2$  angegeben.

Schließlich musste die Migrationskammer noch von den Resten der Zellsuspension und des Chemotaxins gereinigt werden. Hierzu wurde eine 1 % Terg-a-Zyme-Lösung hergestellt, indem 5 g Terg-a-Zyme in 500 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  unter Rühren und Erwärmung auf 40 °C gelöst wurden. Die auseinandergebaute und mit destilliertem Wasser abgespülte Kammer wurde über Nacht in diese Lösung gelegt und am nächsten Tag erneut mit destilliertem Wasser abgespült, bevor sie zum Trocknen ausgelegt werden konnte.

Tabelle 14 CaCl<sub>2</sub>- und NPS-Konzentrationen für die chemotaktische Migration (angesetzt in einem FCS- und CaCl<sub>2</sub>-reduzierten Medium)

|                           |   |   |     |     |        |
|---------------------------|---|---|-----|-----|--------|
| CaCl <sub>2</sub><br>(mM) | - | 5 | 5   | -   | 30 min |
| NPS2143<br>( $\mu$ M)     | - | - | 4,3 | 4,3 | 60 min |

### 3.3 Statistische Auswertung

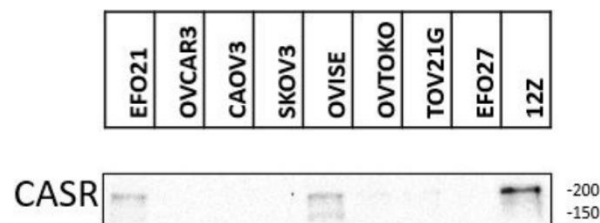
Von den beschriebenen Experimenten wurden jeweils drei unabhängige Versuche nach vorheriger CaCl<sub>2</sub>- oder Inhibitorbehandlung durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde das Programm Microsoft Excel verwendet. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde ein *student's* t-Test durchgeführt, wobei statistische Signifikanz bei einem p-Wert <0,05 angenommen wurde.

## 4 Ergebnisse

Die Proteinexpression des CaSR in der Endometriose-Zelllinie 12Z wurde mittels Western-Blot, als Grundlage für weitere Versuche, nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde die Rolle des CaSR für verschiedene Aspekte des funktionellen Zellverhaltens bei Endometriose-Zellen untersucht. Hierfür wurden die Auswirkungen einer geänderten extrazellulären Calciumkonzentration auf die Zellviabilität, die Zellproliferation und auf das chemotaktische Migrationsverhalten betrachtet. Die Versuche wurden nach der Blockade des CaSR durch seinen Inhibitor NPS2143 wiederholt, um die Rolle desselben für diese Prozesse bestätigen zu können.

### 4.1 Nachweis der CaSR-Expression im Western-Blot

Um die Proteinexpression des CaSR in Endometriose-Zellen zu beurteilen, wurden Western-Blot-Analysen mit Proteinextrakten der Zelllinie 12Z durchgeführt. Das Molekulargewicht des dimeren CaSR liegt bei 240 – 310 kDa ([128](#)). In der Zelllinie 12Z konnte eine Protein-Expression mit einem Molekulargewicht von 200 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 11).



*Abbildung 11* Proteinexpression des CaSR in der Zelllinie 12Z. Das Expressionsniveau des CaSR wurde durch den Western-Blot beurteilt. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin detektiert. In der Zelllinie 12Z konnte eine starke Expression des dimeren CaSR-Proteins mit einem Molekulargewicht von 200 kDa nachgewiesen werden. Es wurde ein 7,5 %iges Gel verwendet ein und pro Tasche wurden 50  $\mu$ g Protein eingesetzt.

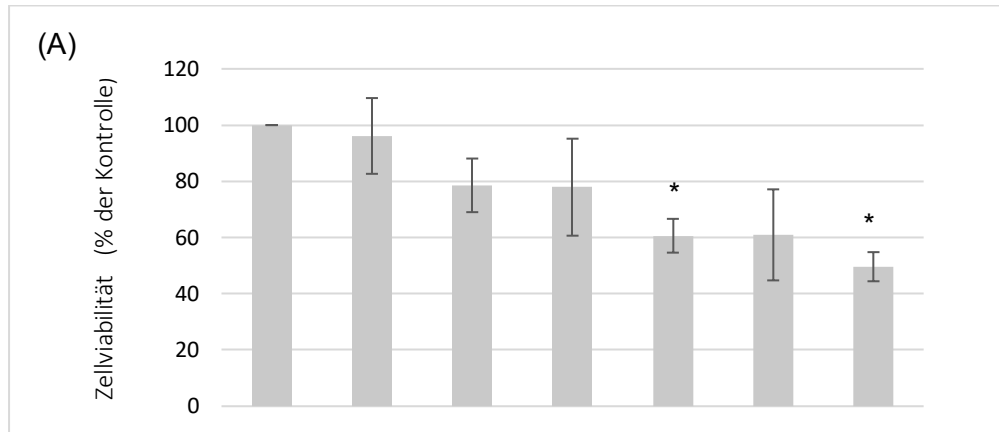
### 4.2 Zellviabilität unter Calcium- und FCS-Reduktion

Zunächst sollte ein geeignetes Kulturmedium für die Zelllinie 12Z mit möglichst geringer Calciumkonzentration und niedrigem Serumanteil ermittelt werden. Dafür wurden verschiedene Mischungen des Kulturmediums DMEM/F12 (1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) mit dem Calcium-freien DMEM-HAM's F12 angesetzt und ohne oder mit 1 % FCS versehen (Abbildung 12). Als Indikator für den metabolischen Aktivitätszustand der Zellen wurde die Zellviabilität mithilfe des *AlamarBlue*<sup>TM</sup>-Zellviabilitäts-Assays bestimmt.

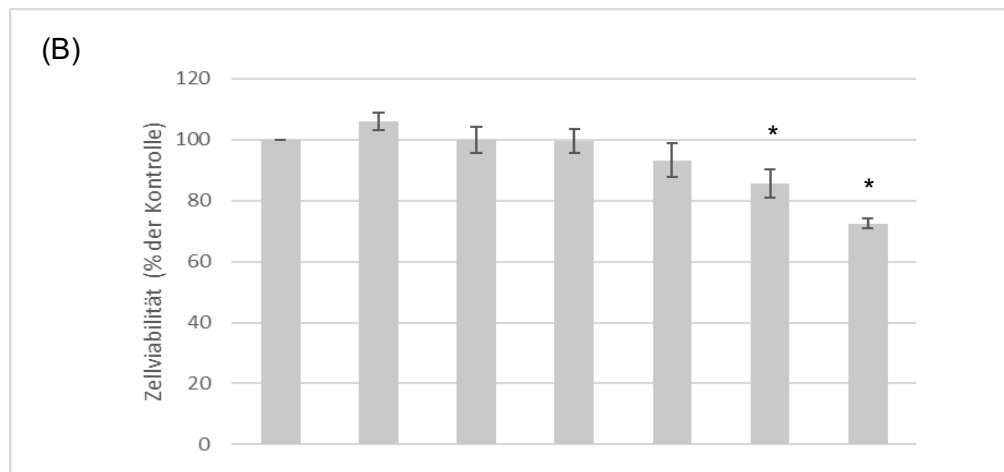
## Ergebnisse

Die Viabilität der Zellen, die in serumfreiem Medium kultiviert wurden, sank mit abnehmender Calcium-Konzentration kontinuierlich ab (Abbildung 12 A). Bei einer Calcium - Konzentration, die mit 0,5 mM um 50 % gegenüber der Kontrolle reduziert worden war, zeigten die Zellen noch eine Viabilität von 95 % im Vergleich zur Referenz. Jedoch sank die metabolische Aktivität der Zellen bei abnehmender Calcium-Konzentration immer stärker (beispielsweise auf 60 % des Referenzwerts bei 0,3 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Die Zugabe von jeweils 1 % FCS in das entsprechend Calcium-reduzierte Medium reduzierte die Anzahl metabolisch aktiven Zellen ebenfalls, jedoch erst bei einer deutlich niedrigeren Calciumkonzentration als bei den Zellen in serumfreiem Medium (beispielsweise 85 % bei 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ ) (Abbildung 12 B). Darauf basierend wurde für alle folgenden Versuchsreihen ein Medium bestehend aus 30 % DMEM/F12 und 70 % DMEM-HAM's F12 verwendet, da hier die Zellviabilität nahezu identisch zu, der Kontrolle war, die Calciumkonzentration jedoch um 70 % auf 0,3 mM reduziert werden konnte. Am Vortag eines Versuches wurde diesem Medium 1 % FCS hinzugefügt und am Versuchstag komplett darauf verzichtet.

## Ergebnisse



|                        |     |     |     |     |      |     |      |      |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|------|
| DMEM/F12 (%)           | 100 | 50  | 40  | 30  | 25   | 20  | 15   | 24 h |
| CaCl <sub>2</sub> (mM) | 1   | 0,5 | 0,4 | 0,3 | 0,25 | 0,2 | 0,15 | 24 h |
| DMEM-HAM's F12 (%)     | -   | 50  | 60  | 70  | 75   | 80  | 85   | 24 h |
| FCS (%)                | -   | -   | -   | -   | -    | -   | -    | 24 h |



|                        |     |     |     |     |      |     |      |      |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|------|
| DMEM/F12 (%)           | 100 | 50  | 40  | 30  | 25   | 20  | 15   | 24 h |
| CaCl <sub>2</sub> (mM) | 1   | 0,5 | 0,4 | 0,3 | 0,25 | 0,2 | 0,15 | 24 h |
| DMEM-HAM's F12 (%)     | -   | 50  | 60  | 70  | 75   | 80  | 85   | 24 h |
| FCS (%)                | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 1   | 1    | 24 h |

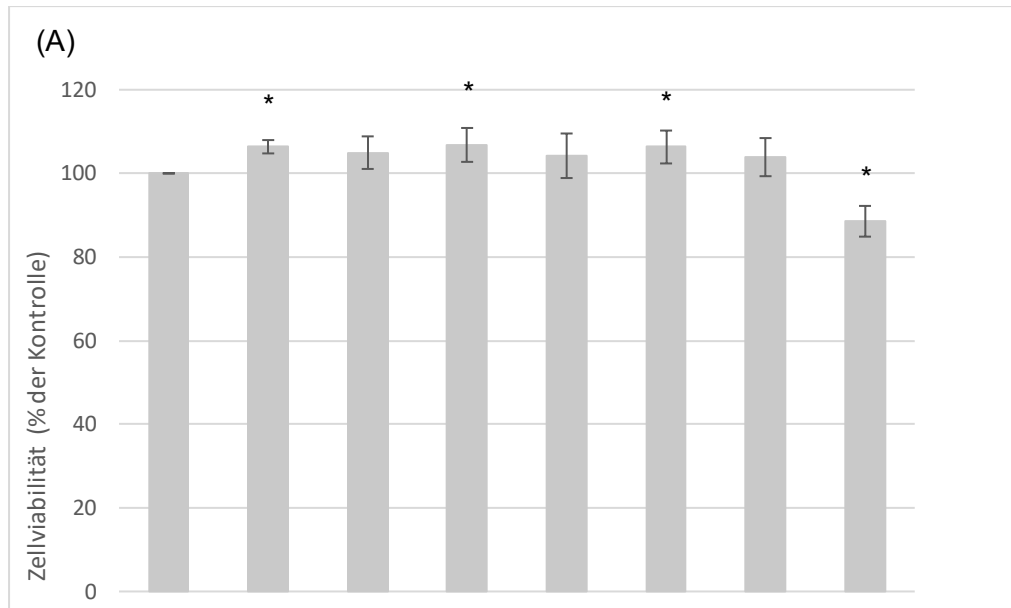
Abbildung 12 Zellviabilität der Zelllinie 12Z bei zunehmender Reduktion von Calcium mittels des Calcium-freien DMEM-HAM's-F12 in serumfreien (A) bzw. serumreduzierten (B) Medium. Die Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien ist in den Tabellen angegeben. Die Ermittlung der Zellviabilität erfolgte durch den *AlmarBlue*<sup>TM</sup>-Zellviabilitäts-Assay. In einem ersten Versuch (A) wurde kein Serum in die entsprechenden Medien zugegeben, im zweiten Versuch (B) erfolgte eine Zugabe von 1 % FCS. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. Die Signifikanz \* der Ergebnisse bezog sich auf die im DMEM/F12 kultivierte Kontrolle und wurde mithilfe eines t-tests ermittelt ( $p < 0.05$ ).

### 4.3 Zellviabilität nach $\text{CaCl}_2$ -Behandlung

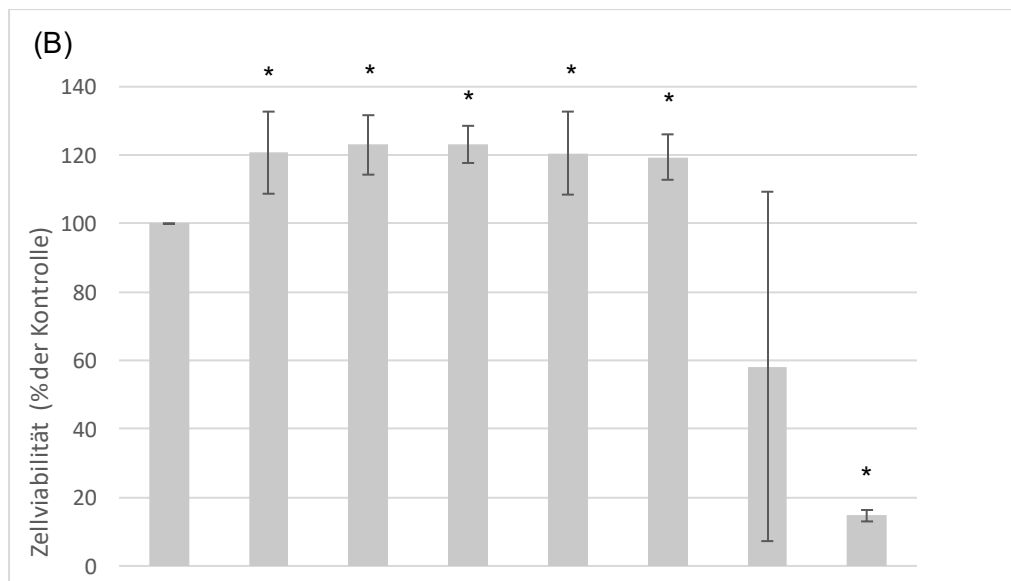
Um den Einfluss einer  $\text{CaCl}_2$ -Behandlung auf die Viabilität der Zelllinie 12Z zu beurteilen, wurden zwei Versuchsdurchgänge mit unterschiedlichen Inkubationszeiten durchgeführt. Bei einer 30-minütigen  $\text{CaCl}_2$ -Behandlung zeigten die Endometriose-Zellen eine nur leicht erhöhte Zellviabilität von 5 % (Abbildung 13 A). Die Daten verdeutlichen, dass eine sehr hohe Calciumkonzentration von 20 mM die Viabilität um rund 10 % im Vergleich zur Referenz reduzierte.

Dieser Effekt verstärkt sich bei einer Behandlungsdauer von 16,5 h (Abbildung 13 B). Hier erhöhte sich die Viabilität der Zelllinie 12Z bei Konzentrationen zwischen 1 mM und 7,5 mM noch deutlicher als bei der vorangegangenen Versuchsreihe (beispielsweise circa 20 % bei 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) ( $p < 0,05$ ). Hohe Calciumkonzentrationen von 10 mM beziehungsweise 20 mM reduzierten die Anzahl stoffwechselaktiver Zellen stark (beispielsweise auf rund 15 % des Referenzwertes bei einer Behandlung mit 20 mM  $\text{CaCl}_2$ ).

## Ergebnisse



| CaCl <sub>2</sub> (mM) | - | 1 | 2 | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | 20 | 30 min |
|------------------------|---|---|---|-----|---|-----|----|----|--------|
|------------------------|---|---|---|-----|---|-----|----|----|--------|

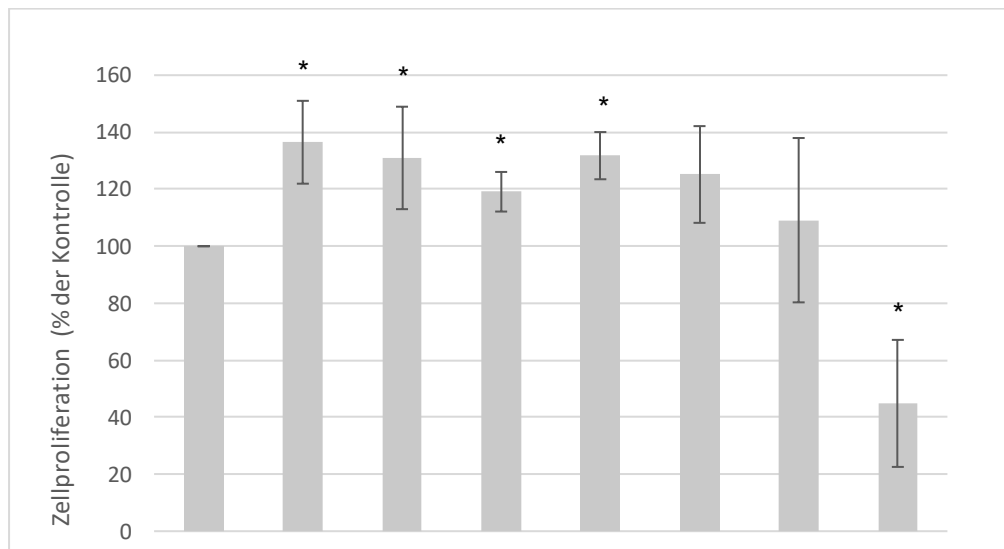


| CaCl <sub>2</sub> (mM) | - | 1 | 2 | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | 20 | 16,5 h |
|------------------------|---|---|---|-----|---|-----|----|----|--------|
|------------------------|---|---|---|-----|---|-----|----|----|--------|

Abbildung 13 Zellviabilität der Zelllinie 12Z unter dem Einfluss steigender CaCl<sub>2</sub>-Konzentrationen bei unterschiedlicher Inkubationszeit in dreifacher Replikation. Die Inkubationszeit der Behandlung betrug 30 min (A) und 16,5 h (B) in einem serumfreien und Calcium-reduzierten Medium. Als Referenz dienten in serumfreien und Calcium-reduzierten Medium kultivierte Zellen. Mit \* gekennzeichnete Werte sind signifikant ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4 Zellproliferation nach Calcium-Behandlung

Um die Auswirkungen steigender extrazellulärer  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen auf die DNA - Synthese der Zelllinie 12Z festzustellen, wurden BrdU-Proliferations-Assays mit einem Kit der Firma Roche durchgeführt. Bei einer Calciumbehandlung zwischen 1 mM bis 7,5 mM proliferierten die Endometriose-Zellen durchschnittlich 20 % bis 30 % stärker als die unbehandelte Kontrolle ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 14). Ab einer Konzentration von 10 mM war dieser Effekt rückläufig und die Proliferation nahm um etwa 10 % zu. Bei noch höherer Konzentration wurde die Zellteilungsrate der Endometriose-Zellen deutlich beeinträchtigt, sodass die Zellen nur noch 45 % der Proliferationsrate der Kontrolle zeigten.



| CaCl <sub>2</sub> (mM) | - | 1 | 2 | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | 20 | 30 Min |
|------------------------|---|---|---|-----|---|-----|----|----|--------|
|------------------------|---|---|---|-----|---|-----|----|----|--------|

Abbildung 14 Zellproliferation der Zelllinie 12Z unter Einfluss steigender  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen in dreifacher Replikation.  $\text{CaCl}_2$  wurde in serumfreiem und Calcium-reduzierten Medium gelöst und 30 min inkubiert. Als Referenz dienten unbehandelte Zellen, in FCS- und Calcium-reduzierten Kulturmedien. Mit \* gekennzeichnete Werte sind signifikant ( $p < 0.05$ ).

#### 4.5 Untersuchung von NPS2143

Durch Hemmung des CaSR mittels seines Inhibitors NPS2143 sollte die CaSR-Abhängigkeit des gefundenen Effekts belegt werden. Dazu wurden, die einzusetzenden NPS2143-Konzentrationen bestimmt. Niedrige Konzentrationen des Inhibitors nahmen nur geringfügigen Einfluss auf die Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 15). Ab einer

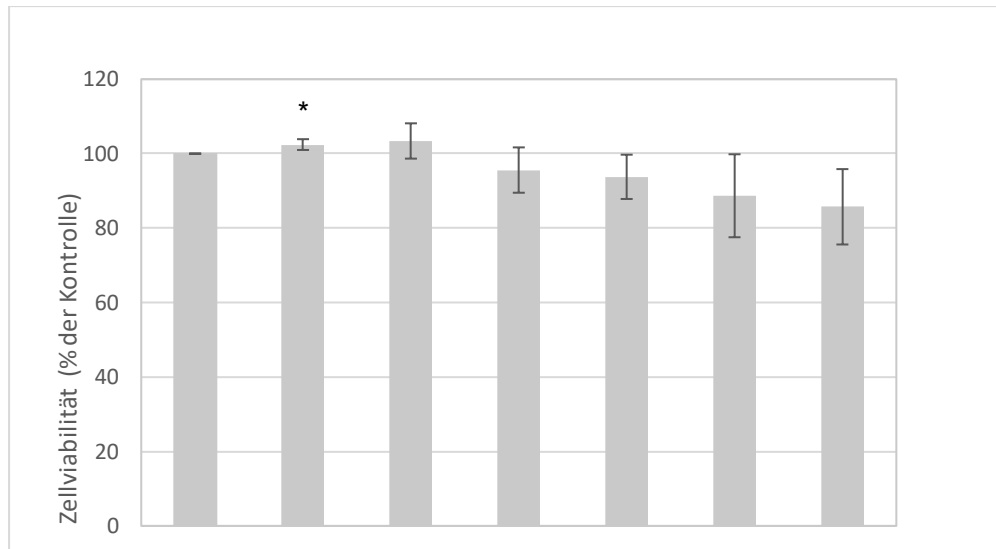
## Ergebnisse

Inhibitor-Konzentration von 8,6  $\mu\text{M}$  nahm die Anzahl stoffwechselaktiver Zellen im Vergleich zur Kontrolle ab (beispielsweise 89 % des Referenzwerts bei 8,6  $\mu\text{M}$ ). Diese Abnahme der Zellviabilität setzte sich bei noch höheren Konzentrationen, wie bei 10,75  $\mu\text{M}$  auf 85 % des Referenzwertes, weiter fort.

### 4.6 Zellproliferation nach $\text{CaCl}_2$ - und Inhibitorbehandlung

In einer zweiten Versuchsreihe sollte die Zellteilungsrate der Endometriose-Zelllinie 12Z bei Blockade des CaSR durch seinen Inhibitor NPS2143 betrachtet werden. Dazu wurden die Zellen mit  $\text{CaCl}_2$ , dem Inhibitor oder einer Kombination beider Substanzen behandelt (Abbildung 16). Als Inhibitor-Konzentrationen wurden 4,3  $\mu\text{M}$  und 6,45  $\mu\text{M}$  ausgewählt, da sie keine signifikanten Unterschiede der Zellviabilität verursacht hatten. Ähnlich wie in der ersten Versuchsreihe proliferierten die Zellen nach  $\text{CaCl}_2$ -Behandlung verstärkt. Mit einer Zunahme um rund 40 % zeigte sich hier der Effekt noch deutlicher. Wurde vor einer  $\text{CaCl}_2$ -Behandlung der CaSR mithilfe des Inhibitors NPS2143 blockiert, blieb die Zellteilungsrate jeweils hinter der Kontrolle zurück (beispielsweise 82 % bei 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$  und 4,3  $\mu\text{M}$  NPS2143). Bei einer isolierten Behandlung mit NPS2143 konnte für eine Konzentration von 6,45  $\mu\text{M}$  ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der proliferativen Kapazität festgestellt werden ( $p < 0,05$ ).

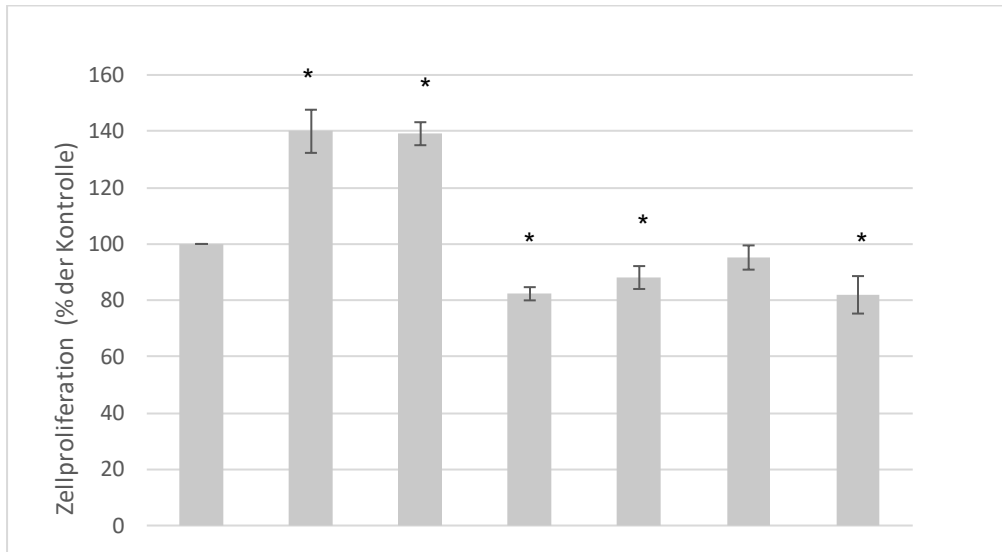
## Ergebnisse



|                 |   |       |      |     |      |     |       |           |
|-----------------|---|-------|------|-----|------|-----|-------|-----------|
| NPS2134<br>(μM) | - | 1,075 | 2,15 | 4,3 | 6,45 | 8,6 | 10,75 | 60<br>min |
|-----------------|---|-------|------|-----|------|-----|-------|-----------|

Abbildung 15 Zellviabilität der Zelllinie 12Z nach Blockade des CaSR mithilfe steigender Konzentrationen des Inhibitors NPS2143 in dreifacher Replikation. Der Inhibitor NPS2143 wurde zu einer Mischung aus 30 % DMEM/F12 und 70 % DMEM-HAM'sF12 gegeben. Die eingesetzten Konzentrationen wurden anhand vorliegender Ergebnisse aus dem Labor der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit an der Universitätsmedizin Mainz, ausgewählt. Die Inkubationszeit betrug 60 min. Als Referenz diente selbiges Medium mit einer Zugabe von 0,5 % DMSO. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die unbehandelte Kontrolle wurde mithilfe eines t-Tests ermittelt und bei einem  $p < 0.05$  mit einem \* gekennzeichnet.

## Ergebnisse



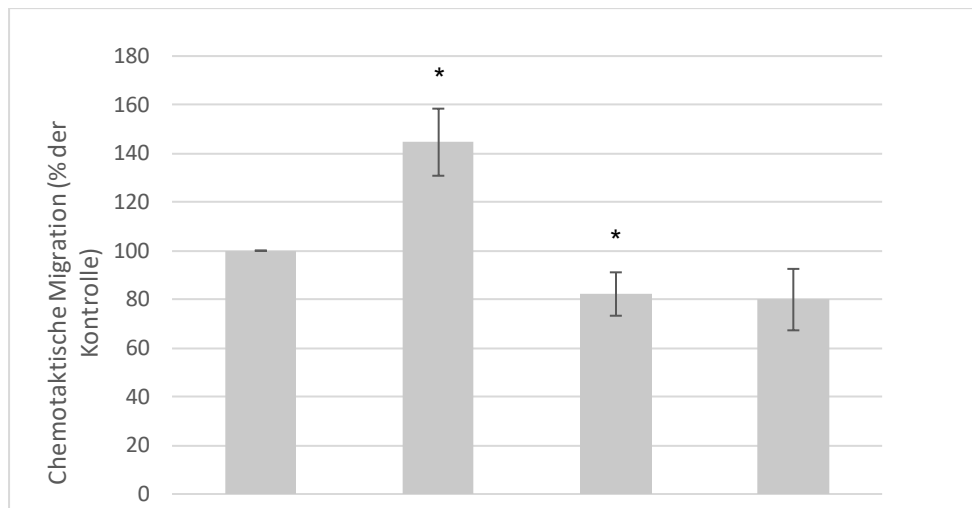
|                           |   |     |   |     |     |     |      |           |
|---------------------------|---|-----|---|-----|-----|-----|------|-----------|
| CaCl <sub>2</sub><br>(mM) | - | 2,5 | 5 | 2,5 | 5   | -   | -    | 30<br>min |
| NPS2143<br>(µM)           | - | -   | - | 4,3 | 4,3 | 4,3 | 6,45 | 60<br>min |

*Abbildung 16* Einfluss einer CaCl<sub>2</sub>- und NPS2143-Behandlung auf die Zellproliferation der Zelllinie 12Z in dreifacher Replikation. Die CaCl<sub>2</sub>- und NPS2143-Lösungen wurden in einem serumfreien und Calcium-reduzierten Medium angesetzt und 30 min für die CaCl<sub>2</sub>- Behandlung sowie 60 Minuten für die Inhibitorbehandlung inkubiert. Für eine kombinierte Behandlung wurde die entsprechende Menge CaCl<sub>2</sub> nach 30 min zugegeben, sodass die Inkubationszeit des NPS2143 insgesamt 1 h betrug. Als Referenz dienten unbehandelte Zellen mit einer Zugabe von 0,5 % DMSO. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, wurde mithilfe eines t-Tests ermittelt und bei  $p < 0.05$  mit einem \* gekennzeichnet.

### 4.7 Chemotaktische Zellmigration nach CaCl<sub>2</sub>- und Inhibitorbehandlung

Ein weiterer wichtiger Aspekt stellte die Untersuchung der chemotaktischen Zellmigration dar, da sie eine Dissemination der Endometriose-Zellen ermöglicht. Nach einer Behandlung mit 5 mM CaCl<sub>2</sub> migrierte die Zelllinie 12Z deutlich stärker im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 17). Wurde diese Calciumbehandlung mit 4,3 µM des Inhibitors NPS2143 kombiniert, blieb das Migrationsverhalten hinter dem der Kontrolle zurück ( $p < 0,05$ ). Dies konnte auch bei einer isolierten Inhibitorbehandlung zur Blockade des CaSR beobachtet werden (nicht signifikant).

## Ergebnisse



|                           |   |   |     |     |        |
|---------------------------|---|---|-----|-----|--------|
| CaCl <sub>2</sub><br>(mM) | - | 5 | 5   | -   | 30 min |
| NPS2143<br>(μM)           | - | - | 4,3 | 4,3 | 60 min |

*Abbildung 17* Chemotaktische Migration der Zelllinie 12Z nach Behandlung mit CaCl<sub>2</sub> und dem CaSR-Inhibitor NPS2143 in serumfreien und Calcium-reduzierten Nährmedien (dreifache Replikation). Als Referenz diente das gleiche Medium mit Zugabe von 0,5 % DMSO. Die Inkubationszeit betrug 30 min für CaCl<sub>2</sub> und 60 min für NPS2143; im Anschluss erfolgte für 16 h die chemotaktische Migration. Im Falle einer kombinierten Behandlung, wurde nach 30-minütiger NPS2143-Inkubation CaCl<sub>2</sub> zugegeben und beides für weitere 30 min inkubiert. Als Referenz diente eine unbehandelte Kontrolle. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, wurde mithilfe eines t-Tests ermittelt und bei einem  $p < 0.05$  mit einem \* gekennzeichnet.

## 5 Diskussion

Eine Expression des dimeren CaSR-Proteins im Western-Blot lässt bei Expression in Endometriose-Gewebe auf eine bedeutende Rolle des Rezeptors für das Krankheitsbild der Endometriose schließen. Nach der Behandlung der Zelllinie 12Z mit unterschiedlichen Calciumkonzentrationen zeigten sich Veränderungen des funktionellen Zellverhaltens. Die Calciumkonzentrationen, bei denen signifikante Unterschiede nachgewiesen wurden, befanden sich im supraphysiologischen Bereich. Viabilität, Proliferation und Migration nahmen durch diese Behandlung zu, während der Inhibitor NPS2143 diese Effekte reduzierte. Die Daten weisen darauf hin, dass die funktionellen Zellprozesse von der CaSR-Aktivierung abhängig sind.

### 5.1 Die Expression des CaSR in der Zelllinie 12Z

Der Nachweis des dimeren CaSR in den Western-Blot-Analysen weist auf eine Rolle für Prozesse des funktionellen Zellverhaltens bei der Endometriose hin. Eine nachgewiesenermaßen deutlich verstärkte Expression des Rezeptors in seiner aktivierten Form, deren Molekulargewicht zwischen 240 – 310 kDa liegt ([128](#)), unterstreicht seine Rolle für die Progression der Endometriose. In verschiedenen malignen Zellmodellen zeigte sich die Beteiligung des Rezeptors an Metastasierung und Krankheitsprogression ([168](#)). Ergebnisse aus dem Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit an der Universitätsmedizin Mainz legen beispielsweise eine Beteiligung des CaSR an Pathomechanismen des Ovarialkarzinoms nahe. Es wurde gezeigt, dass der Rezeptor in den Zelllinien OVISE und EFO-21 exprimiert wird und über Beeinflussung des funktionellen Zellverhaltens einen Einfluss auf die Tumorprogression nimmt. In seltenen Fällen kann sich ein Ovarialkarzinom aus bestehenden Endometriose-Läsionen entwickeln ([35](#)) ([79](#)) ([98](#)). Deshalb ist es von großer Bedeutung, die Rolle des CaSR nicht nur im Kontext der Endometriose, sondern auch seine Funktion für das Krankheitsbild des Ovarialkarzinoms zu kennen.

### 5.2 Der Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen auf die Zelllinie 12Z

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, den Einfluss einer Calciumbehandlung auf Mechanismen des funktionellen Zellverhaltens unter Betrachtung des CaSR zu untersuchen. Diese Mechanismen werden durch nachgeschaltete Signalwege des CaSR aktiviert.

## Diskussion

Im Vorfeld der Versuche erfolgte die Suche nach einem geeigneten Kulturmedium mit möglichst geringer FCS- und Calciumkonzentration. So sollten die hormonellen Einflüsse minimiert und eine Beeinflussung der Ergebnisse durch unbekannte Komponenten des FCS reduziert werden. Zusätzlich befinden sich Zellen nach einer eintägigen FCS-Karenzzeit in einem ähnlichen Teil des Zellzyklus, sodass Schwankungen der Testergebnisse reduziert werden. Neben der Konzentration von FCS sollte auch die Calciumkonzentration im Kulturmedium so gering wie möglich sein, um mögliche Effekte einer Calciumbehandlung deutlich erkennen zu können. Normalerweise beträgt die Standardkonzentration von FCS im Kulturmedium 10 %. Die Calciumkonzentration im DMEM/F12, welches für die Zelllinie 12Z verwendet wird, liegt bei 1 mM.

Fetales Kälberserum (FCS) wurde erstmals in den 1950er Jahren als Zusatz für Kulturmedien verwendet (174). Es zeigte sich, dass dieser Zusatz die Wachstumsphase von Zellen verlängern konnte. Im FCS sind neben einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren auch Vitamine und Proteine enthalten, die für den Zellstoffwechsel relevant sind (175). Eine wichtige Substanz ist beispielsweise Glutamin, das als Wachstumsfaktor dient, aber durch seine Zersetzung auch Ammonium bereitstellen kann (176). Es konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter FCS-Gehalt mit einer verstärkten Glutamin-Zersetzung einhergeht (176). Trotz positiver Effekte für die Zellkultivierung, ist die Verwendung von FCS aufgrund seiner Herstellung ethisch fragwürdig und geht mit Tierleid einher (175) (177). Die genaue Zusammensetzung dieses Naturproduktes ist zudem nicht bekannt, weist saisonale sowie geografische Abweichungen auf und unterliegt Schwankungen innerhalb verschiedener Chargen (175) (176) (177). Deshalb kann die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen erschwert werden (177) (178), was auch bei eigenen Versuchen beobachtet werden konnte.

Der Zellviabilitäts-Assay mit serumfreiem Medium bei gleichzeitiger Calciumreduktion zeigte eine deutlich verringerte Zellviabilität. Dieser Effekt konnte bei Zellen mit einem Zusatz von 1 % FCS weniger stark beobachtet werden. Vermutlich profitieren die Zellen von Wachstumsfaktoren und Nährstoffen des FCS, was die Unterschiede erklären kann. Es wurde deutlich, dass eine komplette FCS-Reduktion in der Zellkultur nicht möglich ist. Nicht nur Wachstumsfaktoren sind relevant, sondern auch Calciumionen, die an zellulären Signalmechanismen (20) (112, 179) beteiligt sind, sodass zu niedrige Konzentrationen die Zellviabilität zusätzlich negativ beeinflussen könnten. Es war notwendig, einen Kompromiss hinsichtlich FCS- und Calciumkonzentration zu finden, sodass nach diesen Versuchen ein Kulturmedium mit 1 % FCS und einer Calciumkonzentration von 0,3 mM ausgewählt wurde.

Ein Medium mit noch geringerer Calciumkonzentration hätte keine ausreichende Viabilität der Endometriose-Zellen für die Versuche ermöglicht, wie durch Ergebnisse des Zellviabilitäts-Assays belegt wird. Bei nachfolgend durchgeführten Versuchen mit einer  $\text{CaCl}_2$ -Behandlung muss folglich die basale Konzentration von 0,3 mM  $\text{CaCl}_2$  im Hinterkopf behalten und zur entsprechenden Behandlungskonzentration addiert werden.

### 5.3 Die Bedeutung des CaSR für die Viabilität und Proliferation von Endometriose-Zellen

Die Viabilität und Proliferation der Endometriose-Zellen wurden durch Calcium dosis- und zeitabhängig gesteigert. Es konnte nach Calcium-Behandlung in unterschiedlichen Konzentrationen eine Steigerung der Zellviabilität beobachtet werden. Die Konzentrationen, welche signifikante Unterschiede herbeiführten, befanden sich je nach Behandlungsdauer im physiologischen oder supraphysiologischen Bereich (1 mM-7,5 mM plus 0,3 mM basal). Bei einem Behandlungszeitraum von 16,5 h erhöhte sich die Zellviabilität deutlicher als bei einer 30-minütigen Behandlung. Auch konnte eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration (1 mM-5 mM plus 0,3 mM basal) die Proliferationsrate signifikant beeinflussen. Der Anstieg der Proliferation bei einer Behandlung mit 7,5 mM  $\text{CaCl}_2$  (supraphysiologisch) ist nicht signifikant.

Die Fachliteratur stimmt überein, dass der CaSR im aktiven Zustand über nachgeschaltete Signalwege zur Aktivierung der Zellproliferation führen kann (159) (160). Dies wurde bei Zelltypen des Nierenzellkarzinoms nachgewiesen, die in den Knochen metastasieren können (160). Aufgrund erhöhter Calciumspiegel wird von diesen Zellen der Knochen als Metastasierungsort bevorzugt (160). Saidak et al. zeigten diese Effekte auch für Zellen des Mammakarzinoms (21). Zwar handelt es sich bei der Endometriose um eine benigne Erkrankung; Disseminierung und invasiver Befall ähneln allerdings der Metastasierung bei malignen Krankheitsbildern (180). Es ist anzunehmen, dass die Aktivität des CaSR erhöht wird und es über die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden zu einer Zunahme der proliferativen Kapazität kommt. Ein wichtiges an diesem Prozess beteiligtes G-Protein ist  $G_{\alpha 12/13}$  (144), außerdem ist der MAPK-Signalweg für die Proliferation relevant (124, 181). Bei neoplastischen Zelltypen konnte gezeigt werden, dass  $G_{\alpha 12/13}$  auf Zellproliferation und Zelltransformation Einfluss nimmt, wobei Moleküle *downstream* dieses G-Proteins wie beispielsweise Rho A und dadurch JNK oder p38 MAPK aktiv werden (144). Bei malignen Zellarten wie Mamma- oder Prostata-Karzinomen scheint dieses G-Protein besonders stark exprimiert zu sein (144). Inwiefern dieses Expressionsmuster auch bei Endometriose-Zellen vorliegt, die einige

## Diskussion

Charakteristika maligner Zellarten aufweisen, kann aus den vorliegenden Ergebnissen nur vermutet und nicht belegt werden. Ferner schienen sich sehr hohe Calciumkonzentrationen schädigend auf die Viabilität oder Proliferation auszuwirken, was auch in der Literatur beschrieben wird. Calcium wirkte sich schädigend auf die Viabilität von Hepatozyten im Mausmodell aus (182) (183); dabei scheinen verschiedene Mechanismen an der Calcium-vermittelten Zytotoxizität beteiligt zu sein (184). Einerseits wird ein Calciumeinstrom durch Verletzungen der Plasmamembran bei Zerstörung des Zytoskeletts ermöglicht, andererseits spielen Veränderung des Calcium-Konzentrationsgradienten eine Rolle (185). Normalerweise herrscht ein steiler Konzentrationsgradient des Calciums von extra- nach intrazellulär. Extrazellulär liegen die Konzentrationen im mikromolaren Bereich, intrazellulär im nanomolaren Bereich (184), wobei der Gradient durch ATPasen und Calciumspeicherung in intrazellulären Kompartimenten aufrechterhalten wird (186). Ein Verlust dieser Calciumhomöostase kann zu Zellverletzungen führen, wobei calciumunabhängige Mechanismen ebenfalls beteiligt sein müssen (184). Zudem kommt es zur Zerstörung des Zytoskeletts und calciumabhängige katabole Enzyme werden aktiviert (186).

Eine abrupte Änderung des extrazellulären Calciumspiegels scheint die Schädigung von Zellen zu initiieren (184). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich eine Zugabe von 10 mM oder 20 mM  $\text{CaCl}_2$  schädigend auf Endometriose-Zellen auswirkt. Bei einer Konzentration von 20 mM  $\text{CaCl}_2$  war dieser Unterschied bereits nach 30-minütiger Behandlungsdauer für beide Versuchsreihen signifikant. Somit können die stark erhöhten und deutlich supra-physiologischen extrazellulären Calciumkonzentrationen, vermutlich durch oben beschriebene Mechanismen, die Endometriose-Zellen schädigen.

Die Verwendung von NPS2143, einem allosterischen Inhibitor des CaSR, führte zu inversen Effekten auf die Viabilität und Proliferation. Es zeigte sich eine abnehmende Viabilität der Endometriose-Zellen bei steigenden Inhibitor-Konzentrationen. Die geringfügig vorhandene Aktivität des CaSR kann beispielsweise auf die geringe basale Calciumkonzentration im Medium oder andere den CaSR-aktivierende Substanzen, wie mehrwertige Kationen oder Aminosäuren zurückgeführt werden. Zhang et al. zeigten einen inhibitorischen Effekt von NPS2143 auf das Zellwachstum in Zellen des Magenkarzinoms (167). Diese Ergebnisse unterstützen die beobachteten Effekte im Endometriose-Zellmodell. Für weitere Versuche wurden NPS2143-Konzentrationen von 4,3  $\mu\text{M}$  beziehungsweise 6,45  $\mu\text{M}$  verwendet, weil diese Konzentrationen die Viabilität der Endometriose-Zellen nicht signifikant senkten.

NPS2143 kann in Abhängigkeit des CaSR die Apoptose induzieren und somit die Anzahl proliferierender Zellen reduzieren. Im Zellmodell des Melanoms wurde eine Zunahme der Apoptose nach Behandlung mit NPS2143 nachgewiesen (168). Es wurde gezeigt, dass die

Expression anti-apoptotischer Proteine (Bcl-2) abnahm und die Expression pro-apoptotischer Proteine (Bax, Caspase-3 und 9) nach Behandlung mit NPS2143 zugenommen hatte. Anhand der Expression dieser apoptotischen Proteine lässt sich auf eine Aktivierung der Apoptose durch den mitochondrialen Weg schließen ([168](#)). Diese Studie geht davon aus, dass durch die Verwendung von NPS2143 der PI3K-Signalweg blockiert wird und so die reduzierte Proliferation und Migration der Zellen im Modell erklärt werden können. Der PI3K-Signalweg ist für diese Zellprozesse relevant und dem CaSR nachgeschaltet, sodass auf eine Blockade desselben rückgeschlossen werden kann. Die Ergebnisse im Endometriose-Zellmodell könnten diese Theorie unterstützen, da die Zellviabilität der mit Inhibitor-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle vermindert war. Die Zellviabilität bildet die Summe von Zellwachstum und Zelltod ab, sodass eine eingeleitete Apoptose die Reduktion der Zellzahl erklären könnte. Über die Aktivierung des PI3K-Signalwegs oder seine Blockade kann an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden.

Im Labor wurde der inhibitorische Effekt des NPS2143 auf die Proliferation von malignen Zellarten untersucht. So wies Zhang et al. eine dosisabhängig reduzierte Proliferation in Zellen des Magenkarzinoms nach, nachdem diese mit NPS2143 behandelt wurden ([167](#)). Die Zellen waren vorher in calciumhaltigem Medium (DMEM) kultiviert worden, sodass von einem aktiven CaSR ausgegangen werden kann. Dieser Effekt zeigte sich auch bei Melanom-Zellen der Zelllinie M14, wie von Wang et al. nachgewiesen werden konnte ([168](#)). Auch in knochenmetastasierenden Zellen des Nierenzellkarzinoms oder in Zellen des Prostatakarzinoms wurde die Proliferation durch Verwendung von NPS2143 inhibiert ([160](#)) ([187](#)). Demnach lässt sich auf eine Beteiligung des CaSR am Proliferationsprozess schließen. Die Aufhebung der Calciumvermittelten Rezeptoraktivierung mittels NPS2143 konnte durch die Versuche dieser Arbeit auch im Endometriose-Zellmodell nachgewiesen werden. Sowohl bei isolierter NPS2143-Behandlung als auch bei kombinierter Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$ , zeigte die Zelllinie 12Z eine schwächere Proliferationsrate als die unbehandelte Kontrolle. Es kann davon ausgegangen werden, dass durch die geringe Menge an vorhandenem Calcium oder Aminosäure eine leichte Aktivität des CaSR erreicht wird, die durch NPS2143 aufgehoben wird.

## 5.4 Der Einfluss des CaSR auf die chemotaktische Migration

Der aktivierte CaSR beeinflusst über nachgeschaltete Signalwege die Zellmigration, wie in verschiedenen Zellmodellen gezeigt werden konnte. In Melanom-Zellen konnte die Migration der Zellen ebenso gesteigert werden wie in Zellen des Magenkarzioms ([167](#)) ([168](#)). Ebenfalls wurde eine verstärkte Zellmigration bei knochenmetastasierenden Zellen des Nierenzellkarzinoms nachgewiesen, nachdem diese mit Calcium behandelt worden waren ([159](#)) ([160](#)).

Besonders relevant ist der PI3K/AKT-Signalweg (143), wie für Osteoklasten-Vorläuferzellen nachgewiesen werden konnte. Die Beteiligung des CaSR an diesem Prozess konnte durch den *knockdown* des Rezeptors und eine folglich ausbleibende Migration nachgewiesen werden. Mittels des G-Proteins  $G\alpha_{q/11}$  wird dieser Signalweg aktiviert und die Zellmigration gefördert, was ebenfalls in einem Osteoklasten-Zellmodell nachgewiesen wurde (20) (143). Es konnte gezeigt werden, dass der PI3K/AKT-Signalweg in eutopen und ektopen Endometrium von Frauen mit Endometriose verstärkt aktiv ist (188, 189). Bei der Betrachtung des Migrationsverhaltens der Endometriose-Zellen zeigte sich eine deutliche Steigerung nach Behandlung mit 5 mM  $CaCl_2$ , was einer supraphysiologischen Konzentration entspricht. Die Aktivierung des CaSR und des nachgeschalteten PI3K/AKT-Signalwegs könnte diesen Zellen eine Migration ermöglichen.

Zudem scheinen weitere G-Proteine am Mechanismus der Zellmigration beteiligt zu sein. Die G-Proteine  $G\alpha_{12/13}$ , sind an der Migration von Tumorzellen beteiligt (144). Die Endometriose als benignes Krankheitsbild weist einige Überschneidungen zu malignen Erkrankungen auf, was möglicherweise auch auf den im Folgenden beschriebenen Signalmechanismus zutrifft. Einerseits kommt es durch die Aktivierung der Proteine  $G\alpha_{12/13}$  zur Aktivierung von Rho A, sodass es zur Induktion der Aktin-Bildung und Zellkontraktion kommt. Dies beeinflusste im Zellmodell die Migration von Neutrophilen und Fibroblasten (144). Andererseits wechselwirken diese G-Proteine mit Cadherinen, sodass Transkriptionsaktivatoren frei werden und die Migration über adhäsive Funktionen gefördert wird. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit kann eine Beteiligung der G-Proteine  $G\alpha_{12/13}$  an der Migration der Endometriose-Zellen nur vermutet werden und auch die Rolle der Cadherine an diesem Prozess kann nicht beurteilt werden.

Die Blockade des CaSR mit NPS2143 erreichte eine Verringerung der Zellmigration ebenso wie die kombinierte Behandlung mit NPS2143 und  $CaCl_2$ . Dies gelang einerseits durch die apoptotischen Effekte des NPS2143, indem die Konzentration pro-apoptotische Moleküle erhöht wurde (168), andererseits durch die durchgehende latente Aktivität des CaSR, was durch die geringe restliche Konzentration von Calcium im Medium oder Aminosäuren des FCS bedingt sein könnte. Durch die Verwendung des Inhibitors fällt diese Form der Aktivierung weg. Auch in der Literatur wird auf inhibitorische Effekt des NPS2143 für die Zellmigration hingewiesen (187).

Nachdem Zellen des Magenkarzinoms mit diesem Inhibitor behandelt worden waren, zeigten sie eine reduzierte chemotaktische Migration (167). Ursächlich kann vermutet werden, dass eine durch den Inhibitor NPS2143 verringerte Aktivierung des CaSR und eine damit ausbleibende Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs vorliegt. Die relevanten Proteine p-mTOR und p-AKT waren nach Inhibitor-Behandlung signifikant verringert.

## Diskussion

Ein *knockdown* des CaSR verringerte die Proliferation und das Mobilitätsverhalten der betrachteten Tumor-Zelllinie signifikant, eine Inhibitor-Behandlung nahm jedoch keinen weiteren Einfluss auf die Zellen ohne CaSR. Dementsprechend ist eine Suppression der Migration in Abhängigkeit des CaSR anzunehmen. Diese Theorie könnte sich auch auf das Krankheitsmodell der Endometriose übertragen lassen, wobei der Nachweis beteiligter Moleküle aussteht. In knochenmetastasierenden Nierenkarzinomzellen oder Melanom-Zellen konnte die Migration durch Verwendung des NPS2143 ebenfalls inhibiert werden ([160](#)) ([168](#)). Im Unterschied zum Krankheitsbild der Endometriose herrscht im Knochen bedingt durch seine Speicherfunktion eine deutlich höhere Calciumkonzentration vor. Der Knochenabbau mittels Metastasen führt neben erhöhten Calciumspiegeln auch zu einer Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, welche die Metastasierung zusätzlich vorantreiben. Für die umliegenden Zellen sind diese Calciumkonzentrationen als physiologisch zu betrachten. In diesen Punkten unterscheiden sich die knochenmetastasierenden Nierenkarzinomzellen vom Zellmodell der Endometriose.

## 5.5 Ausblick

In den Versuchen dieser Arbeit konnte die Beteiligung des CaSR am funktionellen Zellverhalten der Endometriose-Zellen nachgewiesen werden. Durch die verstärkte Expression des aktiven CaSR-Proteins im Western-Blot lässt sich auf seine Relevanz für das Krankheitsbild der Endometriose schließen. Es zeigte sich, dass erhöhte extrazelluläre Calciumkonzentrationen Zellviabilität, Zellproliferation und chemotaktische Zellmigration signifikant beeinflussen. Diese Konzentrationen befanden sich im supraphysiologischen Bereich. Diesen Mechanismen muss eine Aktivierung des CaSR mittels Calciumionen vorausgehen, sodass nachgeschaltete Signalwege aktiv wurden. Durch die Inhibition des Rezeptors mittels NPS2143 konnten die Effekte eindeutig auf den CaSR zurückgeführt werden. Die Ergebnisse geben einen wichtigen Hinweis auf die Ursachen der Progression von Endometriose. Neue Ansätze für funktionelle Analysen wurden geschaffen, sodass zelluläre Prozesse auch in Zukunft besser verstanden werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression des CaSR im Western-Blot ohne vorausgehende Behandlung mit NPS2143 oder Calcium nachgewiesen. Es zeigte sich eine deutliche Expression des aktiven CaSR-Proteins, allerdings kann keine Aussage über das Expressionsmuster nach NPS2143- oder Calciumbehandlung getroffen werden. Bei Zellen des Prostatakarzinoms, die für 72 h mit dem Inhibitor NPS2143 behandelt worden waren, zeigte sich eine verringerte Expression des CaSR-Proteins ([187](#)). Ob dies auch bei Endometriose-Zellen beobachtet werden kann, sollte durch Western-Blot-Analysen überprüft werden. Zukünftig sollte die Untersuchung von Signalkaskaden, die dem CaSR nachgeschaltet sind, auf molekularer Ebene erfolgen. Der Signalweg PI3K/AKT, welcher an Proliferation und Migration beteiligt ist ([20](#)) ([143](#)), sollte auf seinen Phosphorylierungsgrad hin untersucht werden. Die Phosphorylierung erlaubt Rückschlüsse auf die Aktivierung und könnte die Ergebnisse dieser Arbeit belegen. Im Melanom-Zellmodell konnte eine reduzierte Konzentration phosphorylierter mTOR und AKT-Moleküle nach Behandlung mit dem Inhibitor NPS2143 nachgewiesen werden ([168](#)). Ob dieser auch für Endometriose-Zellen gilt, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschung.

Zudem sollten die Signalmoleküle JNK und p38 $\alpha$  untersucht werden, da sie bei knochenmetastasierenden Zellen des Nierenzellkarzinoms verstärkt aktiv waren und über Signalwege *downstream* des CaSR die Proliferation und Migration erhöhten ([159](#)). Möglicherweise ist dieser Mechanismus auch für Endometriose-Zellen relevant. Es ist bekannt, dass verschiedene Integrine und besonders das E-Cadherin an der Invasivität von Tumorzellen beteiligt sind ([180](#)). Diese Moleküle sind calciumabhängig und ihre Rolle für die Pathogenese der Endometriose ist noch nicht vollständig verstanden.

## Diskussion

*In vitro* führte die Inhibition von E-Cadherin zu einem invasiven Phänotyp und Karzinome weisen oftmals Mutationen dieser Proteine auf ([180](#)). Daher wäre es auch vor dem Hintergrund einer möglichen Entartung ausgehend von Endometriose-Läsionen interessant, die Rolle der Integrine für die Pathogenese der Endometriose zu untersuchen. Untersuchungen mit Melanom-Zellen zeigten, dass der Inhibitor NPS2143 die Apoptose dieser Zellen induzieren kann ([168](#)). Dass dies auch für Zellen der Endometriose zutrifft, kann anhand der Ergebnisse dieser Arbeit zwar vermutet, aber nicht bestätigt werden. Hier bietet sich ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen.

Offen bleibt, ob therapeutische Konsequenzen aus den gewonnenen Versuchsergebnissen gezogen werden können. Bei verschiedenen Krankheitsbildern kamen in der Vergangenheit Inhibitoren des CaSR zum Einsatz, wobei nur wenige im klinischen Kontext angewendet werden ([138](#)). Es bleibt abzuwarten, ob die Blockade des CaSR die Progression und Dissemination der Endometriose auch *in vivo* verhindern kann. Durch Anwendung von Inhibitoren könnten die Beschwerden der Betroffenen gelindert und die Prognose der Erkrankung verbessert werden. Jedoch gilt es, systemische Auswirkungen einer therapeutischen Inhibitorbehandlung vorher zu untersuchen, um das Nebenwirkungsprofil zu evaluieren.

## 6 Zusammenfassung

Bei der Endometriose handelt es sich um ein benignes Krankheitsbild, welches mit genitalen, extragenitalen oder extraabdominellen Läsionen einhergeht und von welchem nahezu ausschließlich Frauen im reproduktiven Alter betroffen sind. Betroffene haben abhängig von der Lokalisation der Läsionen ein vielschichtiges Beschwerdebild und oftmals einen langen Leidensweg hinter sich, bis die Diagnose erfolgt. Führend sind die Schmerzsymptomatik und der unerfüllte Kinderwunsch. Neben den individuellen Krankheitsfolgen sollten auch die Kosten für Gesellschaft und Gesundheitssystem nicht unbeachtet bleiben, da es sich um enorme finanzielle Belastungen handelt. Es war ein Ziel dieser Arbeit, das Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankung zu vertiefen, um in der Zukunft diagnostische und therapeutische Konsequenzen ableiten zu können. Dabei lag ein besonderes Augenmerk auf dem CaSR, seiner Aktivierung durch Calcium-Ionen und resultierenden Konsequenzen für das funktionelle Zellverhalten von Endometriose-Zellen. Die Blockade des Rezeptors durch seinen Inhibitor NPS2143 sollte die Beobachtungen eindeutig auf den CaSR zurückführen.

In der Endometriose-Zelllinie 12Z gelang der Nachweis des dimeren CaSR-Proteins mittels SDS-PAGE und Western-Blot. Dieses Ergebnis bildete die Grundlage für Versuche zum funktionellen Zellverhalten: Viabilität, Proliferation und Migration wurden unter dem Einfluss von Calcium und eines CaSR-Inhibitors in verschiedenen Konzentrationen beurteilt. Mithilfe des Zellviabilitäts-Assays *AlamarBlue<sup>TM</sup>*-Assay wurde zunächst ein geeignetes Kulturmedium identifiziert, das Einflüsse durch FCS oder Calcium-Ionen minimierte. Anschließend wurde die Viabilität nach Behandlung der Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen von CaCl<sub>2</sub> beurteilt, wobei die Inkubationszeit in einer ersten Versuchsreihe bei 30 Minuten und in einer zweiten Versuchsreihe bei 16,5 h lag. Nach 30 min erhöhte sich die Viabilität nur leicht, deutlich signifikant waren die Unterschiede nach 16,5 h im Konzentrationsbereich 1 mM-7,5 mM (basal befand sich eine Konzentration von 0,3 mM CaCl<sub>2</sub> im Kulturmedium). Es wurde nachgewiesen, dass der CaSR durch erhöhte extrazelluläre Calciumkonzentrationen und damit einhergehender Aktivierung seiner nachgeschalteter Signalwege die Viabilität im Endometriose-Zellmodell positiv beeinflusst. Eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs konnte durch diese Arbeit nicht bewiesen werden. Seine Bedeutung für Viabilität, Proliferation und Migration konnte bereits in anderen Zellmodellen gezeigt werden.

Signifikante Unterschiede in Versuchen zur Zellproliferation, die mit dem BrdU – Proliferations Assay durchgeführt worden waren, weisen eine Beteiligung des CaSR an diesem Zellprozess nach. Bereits nach 30-minütiger Behandlung konnte im physiologischen Konzentrationsbereich 2 mM-2,5 mM, sowie bei 1 mM und 5 mM, eine deutlich gesteigerte Proliferation nachgewiesen werden. Die Zellproliferations-Versuche wurden mit geeigneter

## Zusammenfassung

Konzentration von dem Inhibitor NPS2143 wiederholt. Eine kombinierte Behandlung mit Inhibitor und  $\text{CaCl}_2$  reduzierte die Proliferation signifikant. Ebenso war die Proliferation bei isolierter NPS2143-Zugabe (4,3 bzw. 6,45  $\mu\text{M}$ ) reduziert. Somit konnte bestätigt werden, dass beobachtete Effekte im Proliferationsversuch auf den CaSR zurückgeführt werden können, da seine Blockade inverse Effekte erzeugte. Allgemein ist von einer geringen Restaktivität des Rezeptors, bedingt durch die verbleibende niedrige Calciumkonzentration im Medium oder aktivierende Aminosäuren, auszugehen. Dies bestätigte sich in den Versuchen, in denen isoliert mit NPS2143 behandelt worden war.

Schließlich konnte im Rahmen dieser Arbeit die Beteiligung des aktivierten CaSR an der Migration von Endometriose-Zellen nachgewiesen werden. Dazu wurden Migrationsversuche in der Boyden-Kammer mit dem Chemotaxin Fibronectin durchgeführt. Nach einer Behandlung mit 5 mM  $\text{CaCl}_2$  waren signifikant mehr Zellen migriert als in der Kontrolle. Die Blockade des Rezeptors mit einem Inhibitor konnte auch in diesem Versuch die Beteiligung des CaSR belegen. Die kombinierte Behandlung führte zu einer signifikant verringerten Migration, was durch die komplette Blockade des Rezeptors und damit ausbleibende Aktivierung durch Calcium erklärt werden kann.

Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit erlauben Rückschlüsse auf das Zellverhalten der Endometriose-Zellen im Hinblick auf das aktivierte CaSR-Protein. Um zukünftig diagnostische und therapeutische Konsequenzen ableiten zu können, sollten weiterführende Versuche durchgeführt werden. Als Ansatzpunkte dienen hierbei Cadherine, der Phosphorylierungsgrad von Signalmolekülen *downstream* des CaSR sowie weitere funktionelle Analysen des Zellverhaltens, beispielsweise zur Apoptose. Zukünftige Forschungen haben das Ziel den Leidensdruck der betroffenen Patientinnen zu vermindern, möglicherweise durch die Anwendung von *targeted therapies* ausgehend von Ergebnissen dieser oder thematisch folgender Arbeiten.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Charatsi D, Koukoura O, Ntavela IG, Chintziou F, Gkorila G, Tsagkoulis M, et al. Gastrointestinal and Urinary Tract Endometriosis: A Review on the Commonest Locations of Extrapelvic Endometriosis. *Advances in medicine*. 2018;2018:3461209.
2. Gronbach J. Charakterisierung der epithelialen Drüsen im Endometrium und endometriotischen Foci: Suche nach Ähnlichkeiten und Unterschieden zwischen Endometrium und endometriotischem Gewebe: Dissertation, Gießen, Justus-Liebig-Universität, 2016; 2016.
3. Benagiano G, Brosens I, Lippi D. The history of endometriosis. *Gynecologic and obstetric investigation*. 2014;78(1):1-9.
4. Sampson JA. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *The American journal of pathology*. 1927;3(2):93-110.43.
5. Anglesio MS, Papadopoulos N, Ayhan A, Nazeran TM, Noë M, Horlings HM, et al. Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer. *The New England journal of medicine*. 2017;376(19):1835-48.
6. Makena D, Obura T, Mutiso S, Oindi F. Umbilical endometriosis: a case series. *Journal of medical case reports*. 2020;14(1):142.
7. Della Corte L, Di Filippo C, Gabrielli O, Reppuccia S, La Rosa VL, Ragusa R, et al. The Burden of Endometriosis on Women's Lifespan: A Narrative Overview on Quality of Life and Psychosocial Wellbeing. *International journal of environmental research and public health*. 2020;17(13).
8. Saunders PTK, Whitaker LHR, Horne AW. Endometriosis: Improvements and challenges in diagnosis and symptom management. *Cell Rep Med*. 2024;5(6):101596.
9. Simoens S, Hummelshoj L, D'Hooghe T. Endometriosis: cost estimates and methodological perspective. *Hum Reprod Update*. 2007;13(4):395-404.
10. Rolla E. Endometriosis: advances and controversies in classification, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *F1000Research*. 2019;8.
11. Adilbayeva A, Kunz J. Pathogenesis of Endometriosis and Endometriosis-Associated Cancers. *International journal of molecular sciences*. 2024;25(14).
12. Hudelist G, Fritzer N, Thomas A, Niehues C, Oppelt P, Haas D, et al. Diagnostic delay for endometriosis in Austria and Germany: causes and possible consequences. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2012;27(12):3412-6.
13. Seear K. The etiquette of endometriosis: stigmatisation, menstrual concealment and the diagnostic delay. *Social science & medicine*. 2009;69(8):1220-7.

14. Ballard K, Lowton K, Wright J. What's the delay? A qualitative study of women's experiences of reaching a diagnosis of endometriosis. *Fertility and sterility*. 2006;86(5):1296-301.
15. Thiel PS, Bougie O, Pudwell J, Shellenberger J, Velez MP, Murji A. Endometriosis and mental health: a population-based cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2024;230(6):649.e1-.e19.
16. Oppelt P, Chavtal R, Haas D, Reichert B, Wagner S, Müller A, et al. Costs of in-patient treatment for endometriosis in Germany 2006: an analysis based on the G-DRG-Coding. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2012;28(11):903-5.
17. Simoens S, Dunselman G, Dirksen C, Hummelshoj L, Bokor A, Brandes I, et al. The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Human Reproduction*. 2012;27(5):1292-9.
18. Soliman AM, Yang H, Du EX, Kelley C, Winkel C. The direct and indirect costs associated with endometriosis: a systematic literature review. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2016;31(4):712-22.
19. Heinze NR, Götz T, Rohloff N, Schaller L, Spelsberg R, Schäfer SD. Self-reported Costs of Endometriosis Patients in Germany. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2024;84(12):1143-9.
20. Gerbino A, Colella M. The Different Facets of Extracellular Calcium Sensors: Old and New Concepts in Calcium-Sensing Receptor Signalling and Pharmacology. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(4).
21. Saidak Z, Boudot C, Abdoune R, Petit L, Brazier M, Mentaverri R, et al. Extracellular calcium promotes the migration of breast cancer cells through the activation of the calcium sensing receptor. *Experimental cell research*. 2009;315(12):2072-80.
22. Barnard ME, Farland LV, Yan B, Wang J, Trabert B, Doherty JA, et al. Endometriosis Typology and Ovarian Cancer Risk. *Jama*. 2024;332(6):482-9.
23. Geng Y, Mosyak L, Kurinov I, Zuo H, Sturchler E, Cheng TC, et al. Structural mechanism of ligand activation in human calcium-sensing receptor. *eLife*. 2016;5.
24. Sobel JA, Waridel P, Gori I, Quadroni M, Canny GO. Proteome-Wide Effect of 17- $\beta$ -Estradiol and Lipoxin A4 in an Endometriotic Epithelial Cell Line. *Frontiers in endocrinology*. 2015;6:192.
25. Macer ML, Taylor HS. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. 2012;39(4):535-49.
26. Allaire C, Bedaiwy MA, Yong PJ. Diagnosis and management of endometriosis. *Cmaj*. 2023;195(10):E363-E71.

27. Fukunaga M. Paratesticular endometriosis in a man with a prolonged hormonal therapy for prostatic carcinoma. *Pathology-Research and Practice*. 2012;208(1):59-61.
28. Pinkert TC, Catlow CE, Straus R. Endometriosis of the urinary bladder in a man with prostatic carcinoma. *Cancer*. 1979;43(4):1562-7.
29. Simsek G, Bulus H. An unusual cause of inguinal hernia in a male patient: endometriosis. *Gut Liver*. 2012;6(2):284-5.
30. Jabr FI, Mani V. An unusual cause of abdominal pain in a male patient: Endometriosis. *Avicenna Journal of Medicine*. 2014;4(04):99-101.
31. Keyhan S, Hughes C, Price T, Muasher S. An Update on Surgical versus Expectant Management of Ovarian Endometriomas in Infertile Women. *BioMed research international*. 2015;2015:204792.
32. Schmeisser JO, Krause T, Lober R, Köhler G. [Correlation between endometriosis and fallopian tube patency in sterility patients especially after microsurgical sterility operations]. *Zentralblatt für Gynäkologie*. 1996;118(7):397-400.
33. Abbas S, Ihle P, Köster I, Schubert I. Prevalence and incidence of diagnosed endometriosis and risk of endometriosis in patients with endometriosis-related symptoms: findings from a statutory health insurance-based cohort in Germany. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2012;160(1):79-83.
34. Starzinski-powitz A, Zeitvogel A, Schreiner A, Baumann R. In Search of Pathogenic Mechanisms in Endometriosis: The Challenge for Molecular Cell Biology. *Current Molecular Medicine*. 2001;1(6):655-64.
35. (DGGG) DGfGuGeV. S2k-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Endometriose (Internet). Version 5.0. Stand 01.04.2025. Zitiert am 18.06.2025. DOI: 015-045. URL: <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/015-0452025>.
36. Vannuccini S, Petraglia F. Recent advances in understanding and managing adenomyosis. *F1000Research*. 2019;8.
37. Cockerham AZ. Adenomyosis: a challenge in clinical gynecology. *Journal of Midwifery & Women's Health*. 2012;57(3):212-20.
38. Kołodziej A, Krajewski W, Dołowy Ł, Hirnle L. Urinary Tract Endometriosis. *Urology journal*. 2015;12(4):2213-7.
39. Koninckx PR, Ussia A, Adamyan L, Wattiez A, Donnez J. Deep endometriosis: definition, diagnosis, and treatment. *Fertility and sterility*. 2012;98(3):564-71.
40. Gordts S, Koninckx P, Brosens I. Pathogenesis of deep endometriosis. *Fertility and sterility*. 2017;108(6):872-85.e1.
41. Laganà AS, Vitale SG, Trovato MA, Palmara VI, Rapisarda AM, Granese R, et al. Full-Thickness Excision versus Shaving by Laparoscopy for Intestinal Deep Infiltrating

- Endometriosis: Rationale and Potential Treatment Options. *BioMed research international*. 2016;2016:3617179.
42. Tosti C, Pinzauti S, Santulli P, Chapron C, Petraglia F. Pathogenetic mechanisms of deep infiltrating endometriosis. *Reproductive Sciences*. 2015;22(9):1053-9.
  43. Wang Y, Nicholes K, Shih IM. The Origin and Pathogenesis of Endometriosis. *Annu Rev Pathol*. 2020;15:71-95.
  44. Knabben L, Imboden S, Fellmann B, Nirgianakis K, Kuhn A, Mueller MD. Urinary tract endometriosis in patients with deep infiltrating endometriosis: prevalence, symptoms, management, and proposal for a new clinical classification. *Fertility and sterility*. 2015;103(1):147-52.
  45. Redwine DB. Diaphragmatic endometriosis: diagnosis, surgical management, and long-term results of treatment. *Fertility and sterility*. 2002;77(2):288-96.
  46. Victory R, Diamond MP, Johns DA. Villar's nodule: a case report and systematic literature review of endometriosis externa of the umbilicus. *Journal of minimally invasive gynecology*. 2007;14(1):23-32.
  47. Bektaş H, Bilsel Y, Sari YS, Ersöz F, Koç O, Deniz M, et al. Abdominal wall endometrioma; a 10-year experience and brief review of the literature. *The Journal of surgical research*. 2010;164(1):e77-81.
  48. Schuster MW, Wheeler TL, 2nd, Richter HE. Endometriosis after laparoscopic supracervical hysterectomy with uterine morcellation: a case control study. *Journal of minimally invasive gynecology*. 2012;19(2):183-7.
  49. Koninckx PR, Fernandes R, Ussia A, Schindler L, Wattiez A, Al-Suwaidi S, et al. Pathogenesis Based Diagnosis and Treatment of Endometriosis. *Frontiers in endocrinology*. 2021;12:745548.
  50. Patel BG, Rudnicki M, Yu J, Shu Y, Taylor RN. Progesterone resistance in endometriosis: origins, consequences and interventions. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2017;96(6):623-32.
  51. Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nature reviews Endocrinology*. 2014;10(5):261-75.
  52. Brichant G, Laraki I, Henry L, Munaut C, Nisolle M. New Therapeutics in Endometriosis: A Review of Hormonal, Non-Hormonal, and Non-Coding RNA Treatments. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(19).
  53. Bulun SE, Cheng YH, Pavone ME, Xue Q, Attar E, Trukhacheva E, et al. Estrogen receptor-beta, estrogen receptor-alpha, and progesterone resistance in endometriosis. *Seminars in reproductive medicine*. 2010;28(1):36-43.

54. Han SJ, O'Malley BW. The dynamics of nuclear receptors and nuclear receptor coregulators in the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod Update*. 2014;20(4):467-84.
55. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstetrics and gynecology*. 1984;64(2):151-4.
56. Perricos A, Wenzl R. Recent Advances in Endometriosis Pathophysiology and Pharmacological Treatment. *International journal of molecular sciences*. 2024;25(12).
57. Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Evers JL, Dunselman GA. Pathogenesis of endometriosis. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2004;18(2):233-44.
58. Leyendecker G, Wildt L, Mall G. The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2009;280(4):529-38.
59. Leyendecker G, Kunz G, Noe M, Herbertz M, Mall G. Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra. *Hum Reprod Update*. 1998;4(5):752-62.
60. Leyendecker G, Kunz G, Wildt L, Beil D, Deininger H. Uterine hyperperistalsis and dysperistalsis as dysfunctions of the mechanism of rapid sperm transport in patients with endometriosis and infertility. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1996;11(7):1542-51.
61. Bulletti C, De Ziegler D, Rossi S, Polli V, Massoneau M, Rossi E, et al. Abnormal uterine contractility in nonpregnant women. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1997;828:223-9.
62. Du H, Taylor HS. Stem cells and reproduction. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 2010;22(3):235-41.
63. Suginami H. A reappraisal of the coelomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instances. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;165(1):214-8.
64. Sasson IE, Taylor HS. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1127:106-15.
65. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertility and sterility*. 1997;68(4):585-96.
66. Blanco LP, Salmeri N, Temkin SM, Shanmugam VK, Stratton P. Endometriosis and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2025;24(4):103752.
67. Zeitvogel A, Baumann R, Starzinski-Powitz A. Identification of an invasive, N-cadherin-expressing epithelial cell type in endometriosis using a new cell culture model. *The American journal of pathology*. 2001;159(5):1839-52.

68. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and sterility*. 2012;98(3):511-9.
69. Wiyono T, Dwiningasih SR, Widjiati W. The Impact of Endometriosis on Intracellular Calcium Levels, Cyclic Dependent Kinase 1 (Cdk1) Expression, and Cyclin B Expression in Post-Ovulation Oocytes of Mice Model. *J Reprod Infertil*. 2023;24(4):232-9.
70. Koninckx P, Kennedy S, Barlow D. Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Human Reproduction Update*. 1998;4(5):741-51.
71. Bedaiwy M, Falcone T. Peritoneal fluid environment in endometriosis. *Minerva ginecologica*. 2003;55(4):333-45.
72. Yang Y, Yuan Y, Ma X, Xing F. Ca<sup>2+</sup> channel subunit  $\alpha$ 1D inhibits endometriosis cell apoptosis and mediated by prostaglandin E<sub>2</sub>. *Ginekologia polska*. 2019;90(12):669-74.
73. Samartzis EP, Fink D, Stucki M, Imesch P. Doxycycline reduces MMP-2 activity and inhibits invasion of 12Z epithelial endometriotic cells as well as MMP-2 and -9 activity in primary endometriotic stromal cells in vitro. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2019;17(1):38.
74. Huang HF, Hong LH, Tan Y, Sheng JZ. Matrix metalloproteinase 2 is associated with changes in steroid hormones in the sera and peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertility and sterility*. 2004;81(5):1235-9.
75. Barcena de Arellano ML, Münch S, Arnold J, Helbig S, Schneider A, Mechsner S. Calcium-binding protein expression in peritoneal endometriosis-associated nerve fibres. *European journal of pain (London, England)*. 2013;17(10):1425-37.
76. Maia H, Jr., Haddad C, Casoy J. Combining oral contraceptives with a natural nuclear factor-kappa B inhibitor for the treatment of endometriosis-related pain. *International journal of women's health*. 2013;6:35-9.
77. Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertility and sterility*. 1991;56(1):45-51.
78. Suda K, Nakaoka H, Yoshihara K, Ishiguro T, Tamura R, Mori Y, et al. Clonal Expansion and Diversification of Cancer-Associated Mutations in Endometriosis and Normal Endometrium. *Cell reports*. 2018;24(7):1777-89.
79. Wilbur MA, Shih IM, Segars JH, Fader AN. Cancer Implications for Patients with Endometriosis. *Seminars in reproductive medicine*. 2017;35(1):110-6.
80. Wei M, Cheng Y, Bu H, Zhao Y, Zhao W. Length of Menstrual Cycle and Risk of Endometriosis: A Meta-Analysis of 11 Case-Control Studies. *Medicine*. 2016;95(9):e2922.
81. Liu Y, Zhang W. Association between body mass index and endometriosis risk: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(29):46928-36.

82. Backonja U, Buck Louis GM, Lauver DR. Overall Adiposity, Adipose Tissue Distribution, and Endometriosis: A Systematic Review. *Nursing research*. 2016;65(2):151-66.
83. Koninckx PR, Braet P, Kennedy SH, Barlow DH. Dioxin pollution and endometriosis in Belgium. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1994;9(6):1001-2.
84. Mayani A, Barel S, Soback S, Almagor M. Dioxin concentrations in women with endometriosis. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1997;12(2):373-5.
85. Matias-Guiu X, Stewart CJR. Endometriosis-associated ovarian neoplasia. *Pathology*. 2018;50(2):190-204.
86. Arsalan HM, Mumtaz H, Lagana AS. Biomarkers of endometriosis. *Adv Clin Chem*. 2025;126:73-120.
87. Tuttlies F, Keckstein J, Ulrich U, Possover M, Schweppe KW, Wustlich M, et al. [ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis]. *Zentralblatt fur Gynakologie*. 2005;127(5):275-81.
88. Laganà AS, La Rosa VL, Rapisarda AMC, Valenti G, Sapia F, Chiofalo B, et al. Anxiety and depression in patients with endometriosis: impact and management challenges. *International journal of women's health*. 2017;9:323-30.
89. Takaesu Y, Nishi H, Kojima J, Sasaki T, Nagamitsu Y, Kato R, et al. Dienogest compared with gonadotropin-releasing hormone agonist after conservative surgery for endometriosis. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2016;42(9):1152-8.
90. Coloma JL, Martínez-Zamora MA, Collado A, Gràcia M, Rius M, Quintas L, et al. Prevalence of fibromyalgia among women with deep infiltrating endometriosis. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2019;146(2):157-63.
91. Wu CC, Chung SD, Lin HC. Endometriosis increased the risk of bladder pain syndrome/interstitial cystitis: A population-based study. *Neurourology and urodynamics*. 2018;37(4):1413-8.
92. Vercellini P, Buggio L, Frattaruolo MP, Borghi A, Dridi D, Somigliana E. Medical treatment of endometriosis-related pain. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2018;51:68-91.
93. Ferrero S. Endometriosis related infertility. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2024;95:102504.
94. Pei T, Liu C, Liu T, Xiao L, Luo B, Tan J, et al. miR-194-3p Represses the Progesterone Receptor and Decidualization in Eutopic Endometrium From Women With Endometriosis. *Endocrinology*. 2018;159(7):2554-62.
95. Hjortd Hansen MV, Dalsgaard T, Hartwell D, Skovlund CW, Lidegaard O. Reproductive prognosis in endometriosis. A national cohort study. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2014;93(5):483-9.

96. Lalani S, Choudhry AJ, Firth B, Bacal V, Walker M, Wen SW, et al. Endometriosis and adverse maternal, fetal and neonatal outcomes, a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2018;33(10):1854-65.
97. Ferrero S, Evangelisti G, Barra F. Current and emerging treatment options for endometriosis. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2018;19(10):1109-25.
98. Kok VC, Tsai HJ, Su CF, Lee CK. The Risks for Ovarian, Endometrial, Breast, Colorectal, and Other Cancers in Women With Newly Diagnosed Endometriosis or Adenomyosis: A Population-Based Study. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2015;25(6):968-76.
99. Reis FM, Coutinho LM, Vannuccini S, Batteux F, Chapron C, Petraglia F. Progesterone receptor ligands for the treatment of endometriosis: the mechanisms behind therapeutic success and failure. *Hum Reprod Update*. 2020;26(4):565-85.
100. Angioni S, Nappi L, Pontis A, Sedda F, Luisi S, Mais V, et al. Dienogest. A possible conservative approach in bladder endometriosis. Results of a pilot study. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2015;31(5):406-8.
101. Jensen JT, Schlaff W, Gordon K. Use of combined hormonal contraceptives for the treatment of endometriosis-related pain: a systematic review of the evidence. *Fertility and sterility*. 2018;110(1):137-52.e1.
102. Casper RF. Progestin-only pills may be a better first-line treatment for endometriosis than combined estrogen-progestin contraceptive pills. *Fertility and sterility*. 2017;107(3):533-6.
103. Brown J, Crawford TJ, Datta S, Prentice A. Oral contraceptives for pain associated with endometriosis. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2018;5(5):Cd001019.
104. Fu J, Song H, Zhou M, Zhu H, Wang Y, Chen H, et al. Progesterone receptor modulators for endometriosis. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2017;7(7):Cd009881.
105. Delgado-Rosas F, Gómez R, Ferrero H, Gaytan F, Garcia-Velasco J, Simón C, et al. The effects of ergot and non-ergot-derived dopamine agonists in an experimental mouse model of endometriosis. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2011;142(5):745-55.
106. D'Alterio MN, Saponara S, D'Ancona G, Russo M, Laganà AS, Sorrentino F, et al. Role of surgical treatment in endometriosis. *Minerva obstetrics and gynecology*. 2021;73(3):317-32.
107. Zakhari A, Delpero E, McKeown S, Tomlinson G, Bougie O, Murji A. Endometriosis recurrence following post-operative hormonal suppression: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2021;27(1):96-107.

108. Minelli L, Fanfani F, Fagotti A, Ruffo G, Ceccaroni M, Mereu L, et al. Laparoscopic colorectal resection for bowel endometriosis: feasibility, complications, and clinical outcome. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 2009;144(3):234-9; discussion 9.
109. Matalliotakis M, Matalliotaki C, Goulielmos GN, Patelarou E, Tzardi M, Spandidos DA, et al. Association between ovarian cancer and advanced endometriosis. *Oncology letters*. 2018;15(5):7689-92.
110. Bassiouny D, El-Baz MA, Gamil TM, Shams N, Ismiil N, Dubé V, et al. Endometriosis-associated Ovarian Cancer is a Subset With a More Favorable Outcome and Distinct Clinical-pathologic Characteristics. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2019;38(5):435-42.
111. Karpathiou G, Chauleur C, Corsini T, Venet M, Habougit C, Honeyman F, et al. Seromucinous ovarian tumor A comparison with the rest of ovarian epithelial tumors. *Annals of diagnostic pathology*. 2017;27:28-33.
112. Capiod T, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N. Calcium signalling and cancer cell growth. *Subcell Biochem*. 2007;45:405-27.
113. Leach K, Hannan FM, Josephs TM, Keller AN, Møller TC, Ward DT, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CVIII. Calcium-Sensing Receptor Nomenclature, Pharmacology, and Function. *Pharmacological reviews*. 2020;72(3):558-604.
114. AMBOSS GmbH. Elektrolytstörungen Calcium 2022 [Available from: <https://next.amboss.com/de/article/Hq0K92?q=elektrolytst%C3%B6rung%20calcium#Ze001b68eb977d06113a13aac71840667>].
115. Pidasheva S, Grant M, Canaff L, Ercan O, Kumar U, Hendy GN. Calcium-sensing receptor dimerizes in the endoplasmic reticulum: biochemical and biophysical characterization of CASR mutants retained intracellularly. *Human molecular genetics*. 2006;15(14):2200-9.
116. Diao J, DeBono A, Josephs TM, Bourke JE, Capuano B, Gregory KJ, et al. Therapeutic Opportunities of Targeting Allosteric Binding Sites on the Calcium-Sensing Receptor. *ACS pharmacology & translational science*. 2021;4(2):666-79.
117. Singh N, Promkan M, Liu G, Varani J, Chakrabarty S. Role of calcium sensing receptor (CaSR) in tumorigenesis. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2013;27(3):455-63.
118. Zhang Y, Li M, Zhang F, Lin J, Yuan H, Nian Q. Circulating micronutrients levels and their association with the risk of endometriosis. *Frontiers in Nutrition*. 2024;11:1466126.
119. Deng ZM, Dai FF, Wang RQ, Chen GT, Yang X, Cheng YX. Calcium homeostasis and endometriosis: A Mendelian randomization study. *Heliyon*. 2024;10(15):e35160.

120. Jurkiewicz-Przondziona J, Lemm M, Kwiatkowska-Pamuła A, Ziółko E, Wójtowicz MK. Influence of diet on the risk of developing endometriosis. *Ginekologia polska*. 2017;88(2):96-102.
121. Harris HR, Chavarro JE, Malspeis S, Willett WC, Missmer SA. Dairy-food, calcium, magnesium, and vitamin D intake and endometriosis: a prospective cohort study. *Am J Epidemiol*. 2013;177(5):420-30.
122. Dalal PJ, Muller WA, Sullivan DP. Endothelial cell calcium signaling during barrier function and inflammation. *The American journal of pathology*. 2020;190(3):535-42.
123. Sundararaman SS, van der Vorst EPC. Calcium-Sensing Receptor (CaSR), Its Impact on Inflammation and the Consequences on Cardiovascular Health. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(5).
124. Hung SW, Zhang R, Tan Z, Chung JPW, Zhang T, Wang CC. Pharmaceuticals targeting signaling pathways of endometriosis as potential new medical treatment: A review. *Medicinal research reviews*. 2021;41(4):2489-564.
125. Zhang C, Miller CL, Gorkhali R, Zou J, Huang K, Brown EM, et al. Molecular Basis of the Extracellular Ligands Mediated Signaling by the Calcium Sensing Receptor. *Front Physiol*. 2016;7:441.
126. Janicic N, Soliman E, Pausova Z, Seldin MF, Rivière M, Szpirer J, et al. Mapping of the calcium-sensing receptor gene (CASR) to human chromosome 3q13.3-21 by fluorescence in situ hybridization, and localization to rat chromosome 11 and mouse chromosome 16. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. 1995;6(11):798-801.
127. Nørskov-Lauritsen L, Bräuner-Osborne H. Role of post-translational modifications on structure, function and pharmacology of class C G protein-coupled receptors. *European journal of pharmacology*. 2015;763(Pt B):233-40.
128. Hannan FM, Kallay E, Chang W, Brandi ML, Thakker RV. The calcium-sensing receptor in physiology and in calcitropic and noncalcitropic diseases. *Nature reviews Endocrinology*. 2018;15(1):33-51.
129. Chen X, Wang L, Cui Q, Ding Z, Han L, Kou Y, et al. Structural insights into the activation of human calcium-sensing receptor. *eLife*. 2021;10.
130. Deng X, Xin Y, Miller CL, Hamelberg D, Kirberger M, Moremen KW, et al. Structural Mechanism of Cooperative Regulation of Calcium-Sensing Receptor-Mediated Cellular Signaling. *Current opinion in physiology*. 2020;17:269-77.
131. Keller AN, Kufareva I, Josephs TM, Diao J, Mai VT, Conigrave AD, et al. Identification of Global and Ligand-Specific Calcium Sensing Receptor Activation Mechanisms. *Mol Pharmacol*. 2018;93(6):619-30.

132. Ray K. Calcium-Sensing Receptor: Trafficking, Endocytosis, Recycling, and Importance of Interacting Proteins. *Progress in molecular biology and translational science*. 2015;132:127-50.
133. Hendy GN, Canaff L, Cole DE. The CASR gene: alternative splicing and transcriptional control, and calcium-sensing receptor (CaSR) protein: structure and ligand binding sites. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2013;27(3):285-301.
134. Bai M, Janicic N, Trivedi S, Quinn SJ, Cole DE, Brown EM, et al. Markedly reduced activity of mutant calcium-sensing receptor with an inserted Alu element from a kindred with familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(8):1917-25.
135. Conigrave AD, Ward DT. Calcium-sensing receptor (CaSR): pharmacological properties and signaling pathways. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2013;27(3):315-31.
136. Yarova PL, Stewart AL, Sathish V, Britt RD, Jr., Thompson MA, AP PL, et al. Calcium-sensing receptor antagonists abrogate airway hyperresponsiveness and inflammation in allergic asthma. *Science translational medicine*. 2015;7(284):284ra60.
137. Centeno PP, Herberger A, Mun HC, Tu C, Nemeth EF, Chang W, et al. Phosphate acts directly on the calcium-sensing receptor to stimulate parathyroid hormone secretion. *Nature communications*. 2019;10(1):4693.
138. Nemeth E, Goodman W. Calcimimetic and calcilytic drugs: feats, flops, and futures. *Calcified Tissue International*. 2016;98(4):341-58.
139. Conigrave AD, Lok HC. ACTIVATION OF RENAL CALCIUM AND WATER EXCRETION BY NOVEL PHYSIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL ACTIVATORS OF THE CALCIUM-SENSING RECEPTOR. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 2004;31(5-6):368-71.
140. Schepelmann M, Kupper N, Sladczyk M, Mansfield B, Manhardt T, Piatek K, et al. Stereo-Specific Modulation of the Extracellular Calcium-Sensing Receptor in Colon Cancer Cells. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(18).
141. Nakamura A, Hotsubo T, Kobayashi K, Mochizuki H, Ishizu K, Tajima T. Loss-of-function and gain-of-function mutations of calcium-sensing receptor: functional analysis and the effect of allosteric modulators NPS R-568 and NPS 2143. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(10):E1692-701.
142. Lindberg JS, Culleton B, Wong G, Borah MF, Clark RV, Shapiro WB, et al. Cinacalcet HCl, an oral calcimimetic agent for the treatment of secondary hyperparathyroidism in hemodialysis and peritoneal dialysis: a randomized, double-blind, multicenter study. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2005;16(3):800-7.

143. Boudot C, Saidak Z, Boulanouar AK, Petit L, Gouilleux F, Massy Z, et al. Implication of the calcium sensing receptor and the Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in the extracellular calcium-mediated migration of RAW 264.7 osteoclast precursor cells. *Bone*. 2010;46(5):1416-23.
144. Kelly P, Casey PJ, Meigs TE. Biologic functions of the G12 subfamily of heterotrimeric G proteins: growth, migration, and metastasis. *Biochemistry*. 2007;46(23):6677-87.
145. Brennan SC, Thiem U, Roth S, Aggarwal A, Fetahu I, Tennakoon S, et al. Calcium sensing receptor signalling in physiology and cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833(7):1732-44.
146. Mamillapalli R, Wysolmerski J. The calcium-sensing receptor couples to Galpha(s) and regulates PTHrP and ACTH secretion in pituitary cells. *The Journal of endocrinology*. 2010;204(3):287-97.
147. Kenakin T, Christopoulos A. Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nature reviews Drug discovery*. 2013;12(3):205-16.
148. Baio G, Rescinito G, Rosa F, Pace D, Boccardo S, Basso L, et al. Correlation between Choline Peak at MR Spectroscopy and Calcium-Sensing Receptor Expression Level in Breast Cancer: A Preliminary Clinical Study. *Mol Imaging Biol*. 2015;17(4):548-56.
149. Ritter C, Miller B, Coyne DW, Gupta D, Zheng S, Brown AJ, et al. Paricalcitol and cinacalcet have disparate actions on parathyroid oxyphil cell content in patients with chronic kidney disease. *Kidney international*. 2017;92(5):1217-22.
150. Graca JA, Schepelmann M, Brennan SC, Reens J, Chang W, Yan P, et al. Comparative expression of the extracellular calcium-sensing receptor in the mouse, rat, and human kidney. *American journal of physiology Renal physiology*. 2016;310(6):F518-33.
151. Ruat M, Traiffort E. Roles of the calcium sensing receptor in the central nervous system. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2013;27(3):429-42.
152. Squires PE, Jones PM, Younis MY, Hills CE. The calcium-sensing receptor and  $\beta$ -cell function. *Vitamins and hormones*. 2014;95:249-67.
153. Schepelmann M, Yarova PL, Lopez-Fernandez I, Davies TS, Brennan SC, Edwards PJ, et al. The vascular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor regulates blood vessel tone and blood pressure. *American journal of physiology Cell physiology*. 2016;310(3):C193-204.
154. Ardeshirpour L, Dann P, Pollak M, Wysolmerski J, VanHouten J. The calcium-sensing receptor regulates PTHrP production and calcium transport in the lactating mammary gland. *Bone*. 2006;38(6):787-93.
155. Momen-Heravi F, Masugi Y, Qian ZR, Nishihara R, Liu L, Smith-Warner SA, et al. Tumor expression of calcium sensing receptor and colorectal cancer survival: Results from the

- nurses' health study and health professionals follow-up study. *International journal of cancer*. 2017;141(12):2471-9.
156. Aggarwal A, Prinz-Wohlgenannt M, Tennakoon S, Höbaus J, Boudot C, Mentaverri R, et al. The calcium-sensing receptor: A promising target for prevention of colorectal cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1853(9):2158-67.
157. Hendy GN, Canaff L. Calcium-Sensing Receptor Gene: Regulation of Expression. *Front Physiol*. 2016;7:394.
158. Das S, Clézardin P, Kamel S, Brazier M, Mentaverri R. The CaSR in Pathogenesis of Breast Cancer: A New Target for Early Stage Bone Metastases. *Frontiers in oncology*. 2020;10:69.
159. Joeckel E, Haber T, Prawitt D, Junker K, Hampel C, Thüroff JW, et al. High calcium concentration in bones promotes bone metastasis in renal cell carcinomas expressing calcium-sensing receptor. *Molecular cancer*. 2014;13(1):1-11.
160. Brenner W, Haber T, Junker K, Roos F, Thuroff JW. [Bone metastasis by renal cell carcinoma. Importance of calcium and calcium-sensing receptor]. *Urologe A*. 2015;54(6):839-43.
161. Marquis RW, Lago AM, Callahan JF, Trout REL, Gowen M, DelMar EG, et al. Antagonists of the calcium receptor I. Amino alcohol-based parathyroid hormone secretagogues. *Journal of medicinal chemistry*. 2009;52(13):3982-93.
162. Yarova PL, Huang P, Schepelmann MW, Bruce R, Ecker R, Nica R, et al. Characterization of Negative Allosteric Modulators of the Calcium-Sensing Receptor for Repurposing as a Treatment of Asthma. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2021;376(1):51-63.
163. Lee JW, Park JW, Kwon OK, Lee HJ, Jeong HG, Kim JH, et al. NPS2143 Inhibits MUC5AC and Proinflammatory Mediators in Cigarette Smoke Extract (CSE)-Stimulated Human Airway Epithelial Cells. *Inflammation*. 2017;40(1):184-94.
164. Leach K, Sexton P, Christopoulos A, Conigrave A. Engendering biased signalling from the calcium-sensing receptor for the pharmacotherapy of diverse disorders. *British journal of pharmacology*. 2014;171(5):1142-55.
165. Leach K, Wen A, Cook AE, Sexton PM, Conigrave AD, Christopoulos A. Impact of clinically relevant mutations on the pharmacoregulation and signaling bias of the calcium-sensing receptor by positive and negative allosteric modulators. *Endocrinology*. 2013;154(3):1105-16.
166. Hannan FM, Walls GV, Babinsky VN, Nesbit MA, Kallay E, Hough TA, et al. The calcilytic agent NPS 2143 rectifies hypocalcemia in a mouse model with an activating calcium-sensing receptor (CaSR) mutation: relevance to autosomal dominant hypocalcemia type 1 (ADH1). *Endocrinology*. 2015;156(9):3114-21.

167. Zhang ZL, Li ZR, Li JS, Wang SR. Calcium-sensing receptor antagonist NPS-2143 suppresses proliferation and invasion of gastric cancer cells. *Cancer gene therapy*. 2020;27(7-8):548-57.
168. Wang S, Qiu L, Song H, Dang N. NPS - 2143 (hydrochloride) inhibits melanoma cancer cell proliferation and induces autophagy and apoptosis. *Medecine sciences : M/S*. 2018;34 Focus issue F1:87-93.
169. Xin X, Zeng X, Feng D, Hua T, Liu S, Chi S, et al. The suppressive role of calcium sensing receptor in endometrial cancer. *Sci Rep*. 2018;8(1):1076.
170. JELLINEK DA, CHANG AC, LARSEN MR, WANG X, ROBINSON PJ, REDDEL RR. Stanniocalcin 1 and 2 are secreted as phosphoproteins from human fibrosarcoma cells. *Biochemical Journal*. 2000;350(2):453-61.
171. Yoshiko Y, Aubin JE. Stanniocalcin 1 as a pleiotropic factor in mammals. *Peptides*. 2004;25(10):1663-9.
172. Aghajanova L, Altmäe S, Kasvandik S, Salumets A, Stavreus-Evers A, Giudice LC. Stanniocalcin-1 expression in normal human endometrium and dysregulation in endometriosis. *Fertility and sterility*. 2016;106(3):681-91.e1.
173. Radman DP, McCudden C, James K, Nemeth EM, Wagner GF. Evidence for calcium-sensing receptor mediated stanniocalcin secretion in fish. *Molecular and cellular endocrinology*. 2002;186(1):111-9.
174. Puck TT, Cieciora SJ, Robinson A. Genetics of somatic mammalian cells: III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *The Journal of experimental medicine*. 1958;108(6):945.
175. van der Valk J. Fetal bovine serum—a cell culture dilemma. *Science (New York, NY)*. 2022;375(6577):143-4.
176. Lin A, Agrawal P. Glutamine decomposition in DMEM: effect of pH and serum concentration. *Biotechnology letters*. 1988;10(10):695-8.
177. van der Valk J, Gstraunthaler G. Fetal bovine serum (FBS)—a pain in the dish? *Alternatives to Laboratory Animals*. 2017;45(6):329-32.
178. Baker M. 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. *Nature*. 2016;533(7604).
179. Villarruel C, Aguilar PS, Ponce Dawson S. High rates of calcium-free diffusion in the cytosol of living cells. *Biophys J*. 2021;120(18):3960-72.
180. Starzinski-Powitz A, Handrow-Metzmacher H, Kotzian S. The putative role of cell adhesion molecules in endometriosis: can we learn from tumour metastasis? *Molecular medicine today*. 1999;5(7):304-9.
181. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*. 2002;12(1):9-18.

## Literaturverzeichnis

182. Farber JL. The role of calcium in lethal cell injury. *Chemical research in toxicology*. 1990;3(6):503-8.
183. Kass G, Orrenius S. Calcium signaling and cytotoxicity. *Environmental Health Perspectives*. 1999;107(suppl 1):25-35.
184. Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Calcium in cell injury and death. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2006;1:405-34.
185. Farber JL. The role of calcium in cell death. *Life sciences*. 1981;29(13):1289-95.
186. Harman AW, Maxwell MJ. An evaluation of the role of calcium in cell injury. *Annual Review of pharmacology and Toxicology*. 1995;35(1):129-44.
187. Yamamura A, Nayeem MJ, Sato M. Calcilytics inhibit the proliferation and migration of human prostate cancer PC-3 cells. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2019;139(3):254-7.
188. Yin X, Pavone ME, Lu Z, Wei J, Kim JJ. Increased Activation of the PI3K/AKT Pathway Compromises Decidualization of Stromal Cells from Endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012;97(1):E35-E43.
189. Madanes D, Bilotas MA, Bastón JI, Singla JJ, Meresman GF, Barañao RI, et al. PI3K/AKT pathway is altered in the endometriosis patient's endometrium and presents differences according to severity stage. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2020;36(5):436-40.

## 8 Anhang

## 8.1 Werte zu den Abbildungen

Tabelle 15 Werte der Abbildung 11

| Zelllinie | CaSR-Expression | Standardabweichung |
|-----------|-----------------|--------------------|
| 12Z       | 25,59           | 5,98               |

Tabelle 16 Werte der Abbildung 12 A

| Medium                          | Zellviabilität in % | Standardabweichung |
|---------------------------------|---------------------|--------------------|
| Kontrolle DMEMF12               | 100,0               | 0,00               |
| 50 % DMEMF12 50 % DMEM-HAM'sF12 | 96,1                | 13,47              |
| 40 % DMEMF12 60 % DMEM-HAM'sF12 | 78,6                | 9,53               |
| 30 % DMEMF12 70 % DMEM-HAM'sF12 | 77,9                | 17,25              |
| 25 % DMEMF12 75 % DMEM-HAM'sF12 | 60,6                | 6,01               |
| 20 % DMEMF12 80 % DMEM-HAM'sF12 | 61,0                | 16,19              |
| 15 % DMEMF12 85 % DMEM-HAM'sF12 | 49,6                | 5,18               |

Tabelle 17 Werte der Abbildung 12 B

| Medium                                  | Zellviabilität in % | Standardabweichung |
|---|---------------------|--------------------|
| Kontrolle DMEMF12 1 % FCS               | 100,0               | 0,00               |
| 50 % DMEMF12 50 % DMEM-HAM'sF12 1 % FCS | 106,0               | 2,83               |
| 40 % DMEMF12 60 % DMEM-HAM'sF12 1 % FCS | 99,8                | 4,19               |
| 30 % DMEMF12 70 % DMEM-HAM'sF12 1 % FCS | 99,5                | 4,05               |
| 25 % DMEMF12 75 % DMEM-HAM'sF12 1 % FCS | 93,2                | 5,52               |
| 20 % DMEMF12 80 % DMEM-HAM'sF12 1 % FCS | 85,4                | 4,62               |
| 15 % DMEMF12 85 % DMEM-HAM'sF12 1 % FCS | 72,4                | 1,68               |

Tabelle 18 Werte der Abbildung 13 A

| Calciumbehandlung        | Zellviabilität in % | Standardabweichung | Behandlungsdauer |
|--------------------------|---------------------|--------------------|------------------|
| Kontrolle                | 100,0               | 0,00               | 30 min           |
| 1 mM CaCl <sub>2</sub>   | 106,4               | 1,60               | 30 min           |
| 2 mM CaCl <sub>2</sub>   | 105,0               | 3,90               | 30 min           |
| 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> | 106,8               | 4,06               | 30 min           |
| 5 mM CaCl <sub>2</sub>   | 104,2               | 5,33               | 30 min           |

| Calciumbehandlung        | Zellviabilität in % | Standard-abweichung | Behandlungsdauer |
|--------------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| 7,5 mM CaCl <sub>2</sub> | 106,3               | 3,93                | 30 min           |
| 10 mM CaCl <sub>2</sub>  | 103,9               | 4,56                | 30 min           |
| 20 mM CaCl <sub>2</sub>  | 88,5                | 3,67                | 30 min           |

Tabelle 19 Werte der Abbildung 13 B

| Calciumbehandlung        | Zellviabilität in % | Standardabweichung | Behandlungsdauer |
|--------------------------|---------------------|--------------------|------------------|
| Kontrolle                | 100,0               | 0,00               | 16,5 h           |
| 1 mM CaCl <sub>2</sub>   | 120,7               | 11,99              | 16,5 h           |
| 2 mM CaCl <sub>2</sub>   | 123,0               | 8,68               | 16,5 h           |
| 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> | 123,1               | 5,43               | 16,5 h           |
| 5 mM CaCl <sub>2</sub>   | 120,6               | 12,13              | 16,5 h           |
| 7,5 mM CaCl <sub>2</sub> | 119,4               | 6,63               | 16,5 h           |
| 10 mM CaCl <sub>2</sub>  | 58,3                | 51,04              | 16,5 h           |
| 20 mM CaCl <sub>2</sub>  | 14,7                | 1,67               | 16,5 h           |

Tabelle 20 Werte der Abbildung 14

| Calcium-behandlung       | Zellproliferation in % | Standard-abweichung | Behandlungsdauer |
|--------------------------|------------------------|---------------------|------------------|
| Kontrolle                | 100,0                  | 0,00                | 30 min           |
| 1 mM CaCl <sub>2</sub>   | 136,5                  | 14,54               | 30 min           |
| 2 mM CaCl <sub>2</sub>   | 131,0                  | 17,98               | 30 min           |
| 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> | 119,1                  | 6,95                | 30 min           |
| 5 mM CaCl <sub>2</sub>   | 131,8                  | 8,28                | 30 min           |
| 7,5 mM CaCl <sub>2</sub> | 125,2                  | 16,97               | 30 min           |
| 10 mM CaCl <sub>2</sub>  | 109,12                 | 28,83               | 30 min           |

Tabelle 21 Werte der Abbildung 15

| Inhibitorbehandlung | Zellviabilität in % | Standardabweichung |
|---------------------|---------------------|--------------------|
| Kontrolle           | 100,0               | 0,00               |
| 1,075 µM            | 102,4               | 1,45               |
| 2,15 µM             | 103,4               | 4,74               |
| 4,3 µM              | 95,6                | 6,09               |
| 6,45 µM             | 93,8                | 5,95               |
| 8,6 µM              | 88,7                | 11,15              |
| 10,75 µM            | 85,7                | 10,13              |

Tabelle 22 Werte der Abbildung 16

| Calcium-/ Inhibitor-behandlung             | Zellproliferation in % | Standardabweichung |
|--|------------------------|--------------------|
| Kontrolle 0,5 %DMSO                        | 100,0                  | 0,00               |
| 2,5 mM CaCl <sub>2</sub>                   | 140,0                  | 7,67               |
| 5 mM CaCl <sub>2</sub>                     | 139,2                  | 4,09               |
| 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> + 4,3 µM NPS-2143 | 82,3                   | 2,34               |

| <b>Calcium-/ Inhibitor-<br/>behandlung</b> | <b>Zellproliferation in %</b> | <b>Standardabweichung</b> |
|--|-------------------------------|---------------------------|
| 5 mM CaCl <sub>2</sub> + 4,3 µM NPS-2143   | 88,1                          | 4,07                      |
| 4,3 µM NPS-2143                            | 95,2                          | 4,30                      |

| <b>Calcium-/ Inhibitor-<br/>behandlung</b> | <b>Zellproliferation in %</b> | <b>Standardabweichung</b> |
|--|-------------------------------|---------------------------|
| 6,45 µM NPS-2143                           | 81,9                          | 6,65                      |

Tabelle 23 Werte der Abbildung 17

| <b>Calcium-/ Inhibitor-<br/>behandlung</b>    | <b>Zellmigration in %</b> | <b>Standardabweichung</b> |
|---|---------------------------|---------------------------|
| Kontrolle 0,5 % DMSO                          | 100,0                     | 0,00                      |
| 5 mM CaCl <sub>2</sub>                        | 144,6                     | 13,79                     |
| 4,3 µM NPS-2143 und 5 mM<br>CaCl <sub>2</sub> | 82,2                      | 8,92                      |
| 4,3 µM NPS-2143                               | 79,9                      | 12,62                     |

