

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

Calcium-sensitiver Rezeptor-induzierte Signaltransduktion in Endometriosezellen

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

Vorgelegt von

Marlene Dana Oechler
aus Saarbrücken

Mainz, 2025

Nutzungsrechte:

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

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Walburgis Brenner

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. phil. nat. Oliver Krämer

Tag der Promotion: 01.09.2025

Für meinen Vater, der mir die Liebe zur Medizin vermachte.

Inhaltsverzeichnis

I.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
II.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
III.	TABELLENVERZEICHNIS	V
1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURDISKUSSION	1
2.1	ENDOMETRIOSE	1
2.1.1	<i>Definition</i>	1
2.1.2	<i>Epidemiologie</i>	1
2.1.3	<i>Einteilung und Klassifikation</i>	2
2.1.4	<i>Symptomatik und Klinik</i>	5
2.1.5	<i>Diagnostik und Therapie</i>	6
2.1.6	<i>Pathogenese und Pathophysiologie</i>	8
2.2	CALCIUM-SENSITIVER REZEPTOR.....	13
2.2.1	<i>Vorkommen und Funktionen des CaSR</i>	13
2.2.2	<i>CaSR als Onkogen oder Tumorsuppressor</i>	13
2.2.3	<i>CaSR und Endometriose</i>	14
2.2.4	<i>Aufbau des Rezeptors</i>	14
2.2.5	<i>Aktivierung des CaSR</i>	15
2.2.6	<i>Hemmung des CaSR</i>	15
2.2.7	<i>Signalwege des CaSR</i>	16
2.2.8	<i>G-Proteine vermittelte Signaltransduktion</i>	16
2.2.9	<i>PI3K/AKT</i>	17
2.2.10	<i>MAP-Kinasen</i>	19
2.3	INTEGRINE.....	22
2.3.1	<i>Integrine und Endometriose</i>	23
2.3.2	<i>Integrine und CaSR</i>	24
3	MATERIAL UND METHODEN	25
3.1	MATERIAL.....	25
3.1.1	<i>Substanzen</i>	25
3.1.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	26
3.1.3	<i>Gebrauchsmaterialien</i>	26
3.1.4	<i>Kit-Systeme</i>	27
3.1.5	<i>Geräte</i>	27
3.1.6	<i>Medien und Puffer</i>	28
3.1.7	<i>Primärantikörper</i>	29

3.1.8	<i>Sekundärantikörper</i>	30
3.1.9	<i>Computerprogramme</i>	30
3.1.10	<i>Kontinuierliche Zelllinien</i>	30
3.2	METHODEN.....	31
3.2.1.	<i>Zellkultur</i>	31
3.2.2.	<i>Proteinanalyse</i>	33
3.2.3.	<i>Statistische Auswertung</i>	38
4	ERGEBNISSE	39
4.1	EINFLUSS VON DMSO AUF UNTERSUCHTE SIGNALWEGE.....	39
4.2	EXPRESSION UND AKTIVITÄT VON AKT.....	41
4.3	EXPRESSION UND AKTIVITÄT VON ERK1/2.....	42
4.4	EXPRESSION UND AKTIVITÄT VON P38.....	43
4.5	EXPRESSION UND AKTIVITÄT VON JNK.....	45
4.6	EXPRESSION UND AKTIVITÄT VON ITGB1.....	47
5	DISKUSSION	49
5.1	EINFLUSS VON DMSO.....	49
5.2	CASR-ABHÄNGIGE AKT-AKTIVIERUNG DURCH CALCIUM.....	50
5.3	CASR-ABHÄNGIGE AKTIVIERUNG VON MAPK DURCH CALCIUM.....	51
5.3.1	<i>ERK1/2</i>	51
5.3.2	<i>p38</i>	52
5.3.3	<i>JNK</i>	52
5.3.4	<i>Zusammenhang zwischen aktivierten MAPK und Proliferation und Migration</i>	53
5.4	EFFEKT VON ALLEINIGER NPS-2143-BEHANDLUNG.....	53
5.5	EINFLUSS DER CALCIUM- UND NPS-2143-BEHANDLUNG AUF DIE GESAMTEXPRESSION.....	54
5.6	EXPRESSION UND AKTIVITÄT VON ITGB1.....	54
5.7	DER CASR IN ENDOMETRIOSE.....	55
5.7.1	<i>Stimulation des CaSR in vivo</i>	55
5.7.2	<i>CaSR als medikamentöses Target</i>	56
5.8	METHODENKRITIK.....	57
5.8.1	<i>Zellmodell 12Z</i>	57
5.8.2	<i>Versuchsaufbau</i>	57
6	ZUSAMMENFASSUNG	59
7	LITERATURVERZEICHNIS	61
8	ANHANG	77
9	DANKSAGUNG	84

I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
APS	Ammoniumpersulfat
ATF1/2	<i>activating transcription factor 1/2</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CaSR	Calcium-sensitiver Rezeptor
Cox-2	Cyclooxygenase 2
cPLA2	zytosolische Phospholipase A2
DAG	Diacylglycerin
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DTT	Dithiothieitol
EAOC	Endometriose-assoziiertes Ovarialkarzinom
EFI	<i>Endometriosis Fertility Index</i>
ER	Östrogenrezeptor
ER-β	Östrogenrezeptor Isoform β
ER-α	Östrogenrezeptor Isoform α
ERK	<i>extracellular-signal-regulated-kinase</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
FOXO	<i>Forkhead-Box O</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	<i>horseradisch peroxidase</i>
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion

IP3	Inositoltriphosphat
ITGB1	Integrin β -1
IVF	<i>In vitro</i> -Fertilisation
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
MAP2K	MAP-Kinase-Kinase
MAP3K	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
MAPK	<i>mitogen-activated-protein-kinase</i>
MK2	<i>Kinase-activated protein kinase 2</i>
MMP	Matrixmetalloproteasen
MNK	<i>MAP Kinase-interaction-protein-kinase</i>
MSK	<i>Mitogen-and-stress-activated-kinase</i>
mTORC1	<i>mammalian Target of Rapamycin complex 1</i>
mTORC2	<i>mammalian Target of Rapamycin complex 2</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NK-Zellen	<i>Natural Killer-Zellen</i>
p-	phospho
P/S	Penicillin und Streptomycin
PDK1	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-Isoform 1
PGE2	Prostaglandin E2
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PLC	Phospholipase C
PR	Progesteronrezeptor
PR-A	Progesteronrezeptor Isoform A
PR-B	Progesteronrezeptor Isoform B
PRAKMSK	<i>p38-regulated/activated-kinase</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
Rpm	<i>Rotations per minute</i>
RSK	Ribosomale S6 Kinasen

RTK	Rezeptor-Tyrosinkinasen
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
sICAM-1	<i>Soluble intercellular adhesion molecule-1</i>
t-	total-
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIE	Tiefinfiltrierende Endometriose
VFT	<i>Venus fly trap</i>

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: PI3K/AKT-Signalweg und seine Funktionen	19
Abbildung 2: MAPK-Kaskade	20
Abbildung 3: Kombinationsmöglichkeiten der α - und β -Ketten der heterodimeren Integrine .	23
Abbildung 4: Expression von p-AKT, p-ERK1/2, p-p38 und p-JNK in 12Z-Zellen in Abhängigkeit von unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen	39
Abbildung 5: Expression von p-AKT, p-ERK1/2, p-p38 und p-JNK in 12Z-Zellen nach Calciumchlorid (CaCl_2)-Behandlung in Abhängigkeit von DMSO	40
Abbildung 6: Expression und Aktivität von AKT (Phosphorylierung an T308) in 12Z-Zellen unter Einfluss von Calciumchlorid (CaCl_2) und NPS-2143 (NPS).....	41
Abbildung 7: Expression und Aktivität von ERK1/2 (Phosphorylierung an Thr202/Tyr204) in 12Z-Zellen unter Einfluss von Calciumchlorid (CaCl_2) und NPS-2143 (NPS)	43
Abbildung 8: Expression und Aktivität von p38 (Phosphorylierung an Thr180/Tyr182) der 12Z-Zellen unter Einfluss von Calciumchlorid (CaCl_2) und NPS-2143 (NPS)	44
Abbildung 9: Expression und Aktivität von JNK (Phosphorylierung an Thr183/Tyr185) in 12Z- Zellen unter Einfluss von Calciumchlorid (CaCl_2) und NPS-2143 (NPS).....	46
Abbildung 10: Expression und Aktivität von ITGB1 (Phosphorylierung an Thr788/Thr789) der 12Z-Zellen unter Einfluss von Calciumchlorid (CaCl_2) und NPS-2143 (NPS)	48

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Substanzen	25
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 3: Gebrauchsmaterialien	26
Tabelle 4: Kit-Systeme	27
Tabelle 5: Geräte.....	27
Tabelle 6: Medien und Puffer	28
Tabelle 7: Primärantikörper p: phospho-/phosphospezifisch t: total/gesamt	29
Tabelle 8: Sekundärantikörper	30
Tabelle 9: Computerprogramme	30
Tabelle 10: Kontinuierliche Zelllinien	30
Tabelle 11: Behandlung der Zellen mit CaCl ₂ und/oder NPS-2143	33
Tabelle 12: Pipettierschema SDS-PAGE für 2 Gele	34
Tabelle 13: Verwendete Proteinmenge in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper.....	35
Tabelle 14: Ansätze der Primärantikörper und Sekundärantikörper	37

1 Einleitung

Endometriose ist eine sehr häufige benigne Erkrankung, die ca. 10% der Frauen im gebärfähigen Alter betrifft (1, 2). Endometrium-ähnliche Zellen bilden vor allem im kleinen Becken Endometrioseläsionen. Die Erkrankung kann mit einer Vielzahl von Symptomen einhergehen, allen voran können Schmerzen und Infertilität die Lebensqualität der Betroffenen drastisch einschränken (3). Chirurgische und/oder hormonelle Therapien können die Erkrankung zwar symptomatisch behandeln, Rezidive sind aber häufig und eine kausale Therapie gibt es nicht (4, 5). Auch durch bestmögliche verfügbare Therapien kann Betroffenen zum Teil nur unzureichend geholfen werden – ein Zustand, der dringend verbessert werden sollte (6, 7).

Der Mangel an kausalen Therapien lässt sich zu einem großen Teil durch das unvollständige Verständnis der Ätiopathologie der Erkrankung erklären (5). Die Forschung zur Endometriose ist zwar in den letzten Jahren intensiviert worden, sodass viele Erkenntnisse gewonnen werden konnten, es zeigte sich aber auch: Es handelt sich um ein sehr komplexes Krankheitsbild, bei dem noch viele Fragen unbeantwortet bleiben.

In dieser Arbeit soll ein Rezeptor untersucht werden, über den im Kontext der Endometriose noch nicht publiziert wurde: der Calcium-sensitive Rezeptor (CaSR). Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe zeigten allerdings, dass über die Stimulation des CaSR mit Calcium *in vitro* die Proliferation und Migration der Endometriosezellen 12Z gefördert wird (8).

Um dies besser zu verstehen, soll in dieser Arbeit die dem CaSR nachgeschaltete Signaltransduktion in der Endometriose-Zelllinie 12Z untersucht werden. Dazu sollen 12Z-Zellen zunächst mit Calcium und/oder dem CaSR-Inhibitor NPS-2143 behandelt werden und schließlich die Expression sowie das Aktivitätsniveau der Kinasen AKT, ERK1/2, p38 sowie JNK im Western-Blot analysiert werden. Ebenfalls soll ein wichtiges Integrin - Integrin $\beta 1$ - im Kontext des CaSR untersucht werden. Integrine sind für die Migration von Zellen wichtige Adhäsionsmoleküle (9). Auch für Integrin $\beta 1$ soll die Möglichkeit der CaSR-abhängigen Expressions- oder Aktivitätssteigerung im Western-Blot überprüft werden.

Die Forschung an molekularen Mechanismen der Pathophysiologie der Endometriose ist unerlässlich, um in Zukunft Zielstrukturen für Medikamente finden und wirksame Therapien entwickeln zu können. Diese Arbeit soll dazu beitragen ein weiteres Puzzleteil der komplexen Pathophysiologie der Endometriose zu verstehen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Endometriose

2.1.1 Definition

Die Endometriose ist eine gutartige gynäkologische Erkrankung, bei der Endometrium-ähnliches Gewebe (endometriodes Epithel sowie Stroma) außerhalb der Gebärmutter vorliegt (1).

2.1.2 Epidemiologie

Endometriose ist eine der häufigsten benignen gynäkologischen Erkrankungen, die ca. 10% der Frauen im gebärfähigen Alter betrifft (2, 10). Häufig wird ein Altersgipfel der Inzidenz von 35-44 Jahren angegeben, der auf die erste Analyse des Erkrankungsalters von Endometriose von 1970-1979 von Houston et al. in Rochester, USA, zurück geht (11). Spätere Studien ermittelten allerdings einen deutlich früheren Altersgipfel der Erstdiagnose bei 25-29 Jahren (12) bzw. bei 25-34 Jahren (13). Es handelt sich mangels kausaler Therapie um eine chronische Erkrankung (14). Mit Erreichen der Menopause geht die hormonabhängige Erkrankung häufig zurück, sie kann aber auch fortbestehen oder wieder auftreten (15, 16). Die Prävalenz der Endometriose bei postmenopausalen Frauen liegt bei 2-5% (17). Klinisch relevant sind auch die Prävalenzen in verschiedenen anderen Patientengruppen: Bei Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch sind bis zu 50% von Endometriose betroffen (18). Unter Jugendlichen mit chronischen Unterleibsschmerzen sind 25% bis 38,3% an Endometriose erkrankt (19), sogar bis zu 75%, wenn eine medikamentöse Therapie nicht erfolgreich war (10). Die Erkrankung betrifft fast nur Frauen. In der Literatur sind nur einige seltene Endometriosefälle bei männlichen Patienten (Cis-Männer) beschrieben: nach Hormontherapie bei Prostatakarzinom (20, 21) oder nach Leistenhernienoperation (22, 23). Eine weitere Patientengruppe stellen Trans-Männer dar. Es gibt bislang noch wenige Untersuchungen hierzu, Ferrando et. al zum Beispiel konnten aber zeigen, dass die Inzidenz der Endometriose in diesem Patientenkollektiv deutlich überdurchschnittlich ist: bei 26,9% der Patienten wurden bei geschlechtsangleichender laparoskopischen Hysterektomie eine Endometriose gefunden. Möglicherweise stellt eine vorangegangene Hormontherapie einen Risikofaktor dar (24). Allerdings liegt hier mutmaßlich auch eine Verzerrung vor: Die Durchführung einer Laparoskopie an sich erhöht die Wahrscheinlichkeit eine (womöglich asymptomatische) Endometriose zu diagnostizieren.

Bekannt ist außerdem eine familiäre Häufung der Erkrankung. Ist eine Verwandte ersten Grades an Endometriose erkrankt, führt dies zu einem 7-fach erhöhtem Erkrankungsrisiko

(25). Zwillingsstudien zeigen eine hohe Konkordanz innerhalb von Zwillingspaaren, wobei monozygote Zwillinge eine höhere Konkordanz zeigen als dizygote Zwillinge (26, 27).

Eindeutige feststellbare Risikofaktoren für die Erkrankung sind eine frühe Menarche, kurze Menstruationszyklen sowie ein niedriger Body-Mass-Index. Pluriparität ist ein protektiver Faktor (10). Wahrscheinlich spielen hier auch hormonelle Faktoren eine wichtige Rolle. Auch weit zurückliegende Umstände beeinflussen das Endometrioserisiko: ein niedriges Geburtsgewicht sowie Frühgeburtlichkeit sind ebenfalls mit einem erhöhten Endometrioserisiko assoziiert (28).

Die Angaben zur Prävalenzen in der Literatur variieren stark (ca. 2-20%) und insgesamt ist die korrekte Erfassung der Epidemiologie schwierig. Gründe hierfür sind die schwierige Diagnosestellung, bedingt durch die unspezifische Symptomatik der Erkrankung und die Notwendigkeit von invasiver Diagnostik (10) sowie die anhaltenden Tabuisierung und die mangelhafte Aufklärung rund um das Thema Menstruation und Endometriose, was u. a. zur Bagatellisierung von Schmerzen führt (29). Dies verzögert nicht nur die Diagnosestellung, sondern kann sie auch ganz verhindern, sodass auch von vielen unerkannten Fällen ausgegangen wird. Auch das Vorkommen von asymptomatischen Betroffenen führt dazu, dass die tatsächliche Prävalenz vermutlich höher liegt als angenommen (3).

Es sei anzumerken, dass viele Datenerhebungen mehrheitlich auf der Untersuchung von kaukasischen Frauen basieren oder aber keine ethnische Zugehörigkeit erfasst wurde (30). Die Endometriose galt lange als Erkrankung der weißen Frau, sodass beispielsweise das Vorkommen von Endometriose bei schwarzen Frauen stark unterschätzt wurde, was zu großen Nachteilen in der Behandlung führte (31). Neuere Untersuchungen zeigen, dass schwarze und hispanische Frauen möglicher tatsächlich etwas seltener betroffen sind als kaukasische Frauen, asiatische Frauen dafür etwas häufiger (32). Insgesamt sind Angaben zu ethnien-spezifischen Prävalenzen aber kritisch zu sehen, da häufig methodische Fehler und Verzerrungen die Aussagekraft der Ergebnisse mindern (30). Ethnizität sollte keine weitere Hürde in der Diagnosestellung und Behandlung darstellen.

2.1.3 Einteilung und Klassifikation

Die Endometriose kann anhand ihrer Lokalisation eingeteilt werden in

- ◇ *endometriosis genitalis interna*: Endometriose innerhalb der Tuben, Endometriose im Myometrium des Uterus = Adenomyosis,
- ◇ *endometriosis genitalis externa*: Endometriose an den weiblichen Geschlechtsorganen: an den Tuben, den Ovarien, den Sakrouterinligamenten, im Douglasraum, an der Vagina, der Vulva, dem Perineum, der Beckenwand und

- ◇ *endometriosis extragenitalis*: Endometriose außerhalb der weiblichen Geschlechtsorgane: an Appendix vermiformis, am Zwerchfell, am Nabel, in Narben, auch in entfernten Organen wie Lunge oder Gehirn (33).

Diese vor allem im deutschsprachigen Raum verwendete Einteilung verliert allerdings zunehmend an Bedeutung, da diese lediglich sehr grobe Einteilung nach Lokalisation nur eine begrenzte Aussagekraft und klinische Relevanz besitzt. An dieser Stelle sei zur Begriffsklärung erwähnt, dass auch die Definition der Adenomyosis uteri im Wandel ist. Lange wurde die Adenomyosis als Endometriose definiert, die im Myometrium des Uterus lokalisiert ist (Endometriosis genitalis interna) (34). Mittlerweile gilt die Adenomyosis allerdings zunehmend als eigenständiges Krankheitsbild, das aber Parallelen zur Endometriose aufweist (35). U. a. durch eine Störung der Junktionalzone zwischen Endo- und Myometrium kommt es bei der Adenomyosis zum lokal begrenzten oder diffusen Einwachsen von Endometriumgewebe (bestehend aus Drüsen sowie Stroma) in das Myometrium. Dieser Wandel in der Nomenklatur wird auch in der neuen Version des Internationalen Klassifikationssystems für Krankheiten (ICD-11) sichtbar, auch hier wird die Adenomyosis nun getrennt von der Endometriose aufgeführt.

Viel relevanter ist die Einteilung in die drei verschiedene Endometrioseentitäten, die klinisch sehr unterschiedlich imponieren und Unterschiede in Pathogenese, Diagnostik und Therapie aufweisen: die peritoneale Endometriose, die ovarielle Endometriose und die tiefinfiltrierende Endometriose (5, 36). Diese unterschiedlichen Typen können gleichzeitig vorliegen, müssen es aber nicht. (36). Die peritoneale Endometriose kann als rote, schwarze oder weiße Läsionen am Peritoneum vorliegen. Rote Läsionen entsprechen einer frischen, stark vaskularisierten Entwicklungsstufe, im weiteren Verlauf imponieren sie zunehmend dunkler bis schwarz und mit fortschreitender Fibrosierung und zunehmender Inaktivität schließlich weiß (36). Bis zu 50% der Endometriosepatientinnen weisen peritoneale Läsionen auf (37), bis zu 80% aller Endometrioseläsionen insgesamt sind peritonealer Natur (5). Die ovarielle Endometriose liegt als sog. Endometriome (Synonyme: Endometriosezysten, Schokoladenzysten) am Ovar vor, die von Endometrium ausgekleidet werden und mit altem Blut gefüllt sind, das als dickliche, bräunliche Flüssigkeit flüssiger Schokolade ähnelt. Sie entstehen häufig über einen längeren Zeitraum durch das zyklische Einbluten ins Zysteninnere. Endometriome kommen bei bis zu 10% aller Endometriosepatientinnen vor, bei bis zu 50% der Patientinnen mit Fertilitätsproblemen (36). Die tief infiltrierende Endometriose (TIE) zeichnet sich durch invasives Wachstum in diverse andere Gewebe aus. Häufige Lokalisationen sind das *spatium rectovaginale* (Raum zwischen Rektum und Vagina) und das Rektosigmoideum. Zur TIE werden auch die seltenen extrapelvinen (z. B. in der Niere) oder extraabdominellen Läsionen (z. B. in der Lunge) gezählt. 15-30% der Endometriosepatientinnen haben eine TIE (37).

Insgesamt ist am häufigsten das pelvine Peritoneum betroffen, gefolgt von den Ovarien, den Sakrouterinligamenten, der Rectovaginalregion, dem Rektosigmoid sowie der Harnblase (4). Es konnte festgestellt werden, dass Endometrioseläsionen häufiger im linken (ca. 65%) als im rechten Unterbauch vorkommen. Als Grund dafür wird angenommen, dass es linksseitig durch das Hindernis des Colon sigmoideums weniger Zirkulation der Peritonealflüssigkeit stattfindet und die Implantation von ektopen Zellen dadurch erleichtert wird (38).

Es gibt unterschiedliche Versuche, die Endometriose in ihrer Ausprägung zu klassifizieren. Drei Klassifikationen haben sich durchgesetzt: der rASRM-Score, die Enzian-Klassifikation und der *Endometriosis-Fertility-Index* (39). Der sog. rASRM-Score der *American Society of Reproductive Medicine* basiert auf einer intraoperative Einteilung des Schweregrades der Endometriose in Stadien I-IV (minimal, gering, mäßig, schwer) nach makroskopischen Aspekten ermöglicht. Berücksichtigt wird allerdings nur Endometriose am Peritoneum, den Tuben und den Ovarien sowie Adhäsionen an Tuben und Ovarien. Aus Lokalisation, Eindringtiefe und Größe der Läsionen wird ein Punktwert ermittelt, der einem Stadium zugeordnet wird. Je höher der Punktwert, desto schwerer ist die Endometriose ausgeprägt (40). Nachteil dieser Klassifikation ist, dass die tiefinfiltrierende Endometriose nicht abgebildet wird (39). Um diese Lücke zu schließen wurde die Enzian-Klassifikation entwickelt, eine Klassifikation speziell für die tiefinfiltrierende Endometriose (41). Die 2021 eingeführte Erneuerung der Enzian-Klassifikation „#Enzian-Klassifikation“ ermöglicht nun eine umfassende Klassifizierung aller Endometrioseläsionen (peritoneal, ovariell, tiefinfiltrierend), Adhäsionen und Organbeteiligungen durch invasive Diagnostik (Laparoskopie/Laparotomie) und/oder nicht-invasiver Diagnostik (Ultraschall/MRT), sodass das Befallsmuster genau dokumentiert werden kann (42). Die umfassende und reproduzierbare #Enzian-Klassifikation hat den rASRM-Score in der klinischen Praxis weitestgehend abgelöst und soll laut aktueller Leitlinie zu Diagnostik und Therapie der Endometriose bei allen Patientinnen mit (Verdacht auf) Endometriose angewendet werden. Der rASRM-Score spielt allerdings für die Forschung weiterhin eine Rolle, um Vergleichbarkeit zwischen aktuellen und früheren Studien herzustellen (4). Der Vollständigkeit halber soll auch die AAGL-Klassifikation der *American Association of Gynecologic Laparoscopists* Erwähnung finden, die aber ebenfalls der #Enzian-Klassifikation unterlegen ist, insbesondere hinsichtlich der Reproduzierbarkeit (4, 43). RASRM-Score, AAGL-Klassifikation und auch die aktualisierte #Enzian-Klassifikation berücksichtigen allerdings nicht anamnestische Angaben zu Beschwerden (insbesondere Schmerzen) und zur Sterilität. Diese sind für die individuelle Einordnung der Krankheitsschwere aber äußerst relevant (39), insbesondere dadurch, dass makroskopische Krankheitsschwere und Ausmaß der Beschwerden nicht immer korrelieren (44). Wünschenswert wäre daher die Entwicklung und Anwendung eines umfassenderen Scores, um die Belastung durch die Endometrioseerkrankung adäquat abzubilden.

Abschließend sei noch der in Kinderwunschzentren verwendete *endometriosis fertility index* (EFI) erwähnt. Er wurde konzipiert, um die Wahrscheinlichkeit abzuschätzen, dass eine Patientin mit Endometriose innerhalb von 36 Monaten schwanger wird. Dabei wird der rASRM-Score miteinbezogen, aber auch die Adnexfunktion und anamnestische Angaben (Alter, Schwangerschaftsanamnese und Dauer bestehender Sterilität) (45).

2.1.4 Symptomatik und Klinik

Endometriose wird häufig als das Chamäleon der Gynäkologie bezeichnet, da sich die Erkrankung so unterschiedlich und vielseitig darstellen kann. Im Vordergrund stehen häufig chronische Unterleibsschmerzen bzw. eine starke Dysmenorrhoe sowie Infertilität bzw. Subfertilität (46).

Schmerzen können zyklisch oder azyklisch auftreten. Zyklische Beschwerden erklären sich durch die Hormonabhängigkeit der Erkrankung. Häufig liegt eine schwere Dysmenorrhoe vor, wobei die Beschwerden meist schon einige Tage vor der Menstruation beginnen und dann mit Abklingen der Menstruation rückläufig sind. Erklärt wird dies dadurch, dass die Endometrioseläsion wie das normale Endometrium auf die zyklischen Hormonveränderungen reagieren (33, 47). Schmerzlokalisierung, -charakter und -intensität können sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. Mittlerweile ist bekannt, dass unterschiedliche Endometrioseentitäten sich auch hinsichtlich ihrer Schmerzhaftigkeit unterscheiden: peritoneale Endometrioseläsionen sind in ca. 50% der Fälle schmerzhaft; die ovarielle zystische Endometriose wird häufig als schmerzintensiver als die peritoneale Endometriose beschrieben und ist in ca. 80% der Fälle schmerzhaft. Die TIE gilt als am stärksten schmerzhaft, 95% der Betroffenen leiden an Schmerzen (48). Je nach Befallsmuster der Endometriose kommt es neben der Dysmenorrhoe und den chronischen Unterleibsbeschwerden zu Dysurie, Dyschezie und Dyspareunie. Grundsätzlich korreliert die Schwere der Symptomatik aber nicht zwingend mit der Befundausdehnung. Gründe hierfür werden zunehmend in genetisch oder epigenetischen Unterschieden der klonalen Läsionen vermutet (48, 49).

Unter starken Schmerzen kann es als vegetative Reaktion auch zu Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoen und Kreislaufproblemen kommen (46). Oft kommen weitere unspezifischen Symptome wie Rückenschmerzen, Kopfschmerzen, Fatigue, und gastrointestinale Beschwerden wie Stuhlunregelmäßigkeiten, Diarrhoe, Verstopfung und starke zyklische Blähungen als sog. „*Endo-Belly*“ hinzu (33, 50). Häufig handelt es sich um ein komplexes Schmerzsyndrom, das durch die wiederholten und andauernden Schmerzen - begünstigt auch durch insuffiziente Schmerztherapie - über einen längeren Zeitraum entsteht (46). Zentralnervöse Sensitivierungsmechanismen spielen hier eine wichtige Rolle. Es kann im Verlauf zu Hyperalgesie und sekundärer Beckenbodenverspannung kommen, sodass sich die Beschwerden weiter steigern, tendenziell zunehmend als azyklische Beschwerden (50).

Neben den Schmerzen ist auch die Infertilität bzw. Subfertilität Leitsymptom der Erkrankung und Ursache eines hohen Leidensdrucks. Wie genau die Subfertilität zustande kommt, ist nicht abschließend geklärt und wird als komplexes multifaktorielles Geschehen betrachtet (51, 52). Als wichtige Faktoren werden u. a. Adhäsionen im kleinen Becken und Störung der Tubendurchgängigkeit beschrieben. Insbesondere die TIE kann anatomische Veränderungen bedingen, die die Fertilität mindern (53). Die ovarielle Reserve, einer der wichtigsten prognostischen Faktoren der Reproduktionsmedizin, kann durch Endometriome selbst oder ihre chirurgische Entfernung reduziert sein (51). Veränderungen des eutopen Endometriums können die Nidation erschweren (52). Hinzu kommen immunologische, inflammatorische und hormonelle Faktoren (3). Auch die Dyspareunie hat einen relevanten Einfluss, da sie die sexuelle Aktivität der Frauen massiv einschränken kann und dadurch eine natürliche Konzeption zusätzlich erschwert wird (51).

Nicht selten entscheiden sich Betroffene mit Kinderwunsch für eine assistierte Reproduktion, wobei die *in vitro*-Fertilisation (IVF) bzw. intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI), je nach Spermienqualität, die besten Ergebnisse zeigt (52). Eine Schwangerschaft bei Endometrioseerkrankung geht mit einigen erhöhten Risiken einher. So liegt ein erhöhtes Abortrisiko vor, ein erhöhtes Risiko für Frühgeburtlichkeit, erhöhte Risiken für Pathologien der Plazenta sowie für Gestationsdiabetes (4).

Häufig liegen neben der Endometriose auch psychiatrische Komorbiditäten vor, mit denen die Patientinnen zu kämpfen haben. Insbesondere Depressionen kommen häufig vor (54). Je schwerer die Erkrankung und je schwerer insbesondere die Schmerzsymptomatik, desto höher ist das Risiko an einer Depression zu erkranken. Je jünger die Patientin bei Beginn der Dyspareunie, desto wahrscheinlicher wird eine Depression. Auch ein unerfüllter Kinderwunsch sowie das Vorliegen einer Dyschezie erhöht das Depressionsrisiko (55). Diese Korrelationen sind nicht verwunderlich. Es ist von anderen chronischen Erkrankungen bekannt, dass eine krankheitsbedingte Minderung der Lebensqualität sowie Einschränkungen im Alltag die Entstehung von Depressionen begünstigen (56). Neben Depressionen können auch Angststörungen als Komorbidität auftreten (54).

2.1.5 Diagnostik und Therapie

Bei Verdacht auf Endometriose sollte eine strukturierte Anamneseerhebung erfolgen, idealerweise mit Hilfe von speziellen Fragebögen, um die vielfältigen Symptome in Gänze zu erfassen (34, 50). Wichtig ist eine gründliche gynäkologische Untersuchung, auch um Differentialdiagnosen auszuschließen (33). Im hinteren Scheidengewölbe kann eine TIE ertastet werden (48), häufig ist die gynäkologische Untersuchung allerdings völlig unauffällig (47). Mit der transvaginalen Sonographie transvaginale Ultraschalluntersuchung können Endometriome gut dargestellt werden (48), ggf. könnte eine Obliteration des Douglasraumes

sowie eine Organinfiltration z. B. des Darmes bei TIE sichtbar werden. Insbesondere bei Verdacht auf ovarielle Endometriose und TIE sollte ein Harnstau ausgeschlossen werden, der durch Kompression oder Infiltration des Ureters entstehen kann (4). Die Sonographie kann Auskunft über das Ausmaß der ovariellen und tiefinfiltrierenden Endometriose geben, peritoneale Endometriose kann aber kaum detektiert werden. Gleiches gilt für die MRT. Der Stellenwert und die Zuverlässigkeit der Bildgebung werden kontrovers diskutiert. Klar ist aber beispielsweise, dass die MRT zur Ausbreitungsdiagnostik präoperativ nützlich sein kann, um zum Beispiel die Beteiligung des Darmes abzuschätzen (4, 48). Die eigentliche Sicherung der Verdachtsdiagnose Endometriose ist allerdings nur per Laparoskopie und intraoperativer Probenentnahmen möglich (4). Im histologischen Präparat müssen endometriales Stroma sowie Epithelzellen nachgewiesen werden (47). Ob eine operative Diagnosesicherung (und gleichzeitige Therapie, s. u.) angezeigt ist, soll individuell abgewogen werden (4).

Durch die Notwendigkeit der invasiven Diagnostik dauert es in Deutschland im Schnitt mitunter 10 Jahre bis die Diagnose gestellt wird (4). Leider gibt es aktuell keine etablierten Biomarker, die eine zuverlässige, nicht-invasive Diagnostik ermöglichen (5). Daher bleibt die Laparoskopie ein essentieller Bestandteil der Diagnostik und ermöglicht auch gleichzeitig einen therapeutischen Ansatz: die operative Therapie der Endometriose (47). Dabei werden sichtbare Endometrioseläsionen exzidiert oder koaguliert. Für Endometriome sowie die TIE gilt die chirurgische Entfernung als beste Behandlungsstrategie (5). Ob die radikale chirurgische Entfernung von peritonealen Läsionen ausreichend wirkungsvoll ist, wird kontrovers diskutiert (5, 36).

Eine hormonelle Therapie sollte an die operative Sanierung angeschlossen oder als primäre konservative Therapie bei Verdacht auf Endometriose eingesetzt werden. Als Erstlinientherapie wird der Einsatz eines Gestagens empfohlen (4). In Deutschland ist einzig das Gestagen Dienogest speziell für die Therapie der Endometriose zugelassen. Als Zweitlinientherapie kommen auch kombinierte orale Kontrazeptiva, andere Gestagene (auch in lokaler Applikation) und GnRH-Analoga zum Einsatz (33). Ziel der hormonellen Therapie ist stets die therapeutische Amenorrhoe, wodurch sich die zyklus- und menstruationsabhängigen Beschwerden bessern (50). Dadurch sind Hormontherapien häufig effektiv in der Behandlung von Schmerzen. Es bleibt allerdings unklar, inwieweit die Rezidivrate tatsächlich gesenkt werden kann. Hormonelle Therapie werden allerdings nicht selten wegen diversen Nebenwirkungen abgebrochen (5). Bei Kinderwunsch sollte keine hormonelle Therapie durchgeführt werden (3). Führt die konservative hormonelle Therapie bei Verdacht auf Endometriose nicht zu adäquater Besserung sollte eine Laparoskopie zur definitiven Diagnosesicherung und operativen Therapie durchzuführen (50).

Bei der Endometriose handelt es sich um ein komplexes Krankheitsbild, das häufig eine komplexe längerfristige Therapie benötigt. Sowohl die operative als auch die hormonelle Therapie gehen mit häufigen Rezidiven einher (5, 50). Eine multimodale Schmerztherapie hat einen wichtigen Stellenwert und sollte individuell erfolgen. Zur Anwendung kommen u. a. Entspannungstechniken, Wärmeanwendungen und Akupunktur sowie nicht-hormonelle medikamentöse Optionen: NSAIDs (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*), Novaminsulfon, Magnesium, Butylscopolamin und Mönchspfeffer (46, 50). Eine ausreichende Schmerztherapie kann der Chronifizierung der Schmerzen vorbeugen (46). Eine interdisziplinäre Behandlung mit Physiotherapeuten, Osteopathen und Psychologen ist oft angezeigt. Eine antientzündliche Ernährung kann die Beschwerden reduzieren, allerdings ist hier die Evidenz eher schwach (50).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Behandlungsmöglichkeiten häufig unzufriedenstellend sind. Es gibt bis dato keine kausale Therapie, Rezidive sind häufig und Prävention ist nicht möglich. Ursache dessen ist unter anderem, dass die Krankheit weiterhin insuffizient verstanden ist und ein hoher Forschungsbedarf besteht. Entstehungstheorien der Erkrankung und bekannte wichtige Aspekte der Pathophysiologie sollen nun erläutert werden.

2.1.6 Pathogenese und Pathophysiologie

2.1.6.1 Theorien der Pathogenese

Die populärste dieser Theorien ist die Transplantationstheorie nach Sampson (57, 58), nach der durch retrograde Menstruation Endometriumzellen in die Bauchhöhle gelangen, am Peritoneum adhären und Endometrioseläsionen bilden. Bei etwa 90% aller Frauen kommt es zur retrograden Menstruation, bei der durch Kontraktion des Uterus die Menstruation nicht nur anterograd durch die Cervix in die Vagina transportiert wird, sondern auch retrograd durch die Tuben in die Bauchhöhle (59). Dieser Prozess ist grundsätzlich als physiologisch zu betrachten. Es müssen andere Faktoren hinzukommen, damit es zur Entstehung der Endometriose kommt. Unter anderem wird vermutet, dass die in die Bauchhöhle geschwemmten Endometriumzellen, die später Endometrioseläsionen bilden, vorbestehende genetische oder epigenetische Veränderungen aufweisen. In eutopem Endometrium von Endometriosepatientinnen lassen sich diese Veränderungen nachweisen (60). Wird die Transplantationstheorie weitergeführt, kann sie auch das Vorkommen von extraabdominaler Endometriose erklären. Durch hämatogene oder lymphogene Verschleppung von Endometriose, die entsprechend der Theorie nach Sampson entstanden ist, können sich Endometrioseläsionen im ganzen Körper, wie etwa in Lunge oder ZNS, bilden (1, 61).

Die Transplantationstheorie auf Basis der retrograden Menstruation allein kann nicht alle Endometrioseerkrankungen ausreichend erklärend. So sind in der Literatur *Casereports* zu finden, die das Vorkommen von Endometriose bei Patientinnen mit Mayer-Rokitansky-Küster-

Hauser-Syndrom beschreiben (62, 63). Es handelt sich um Patientinnen mit kongenitaler Aplasie der oberen Vagina und des Uterus inklusive des Endometriums. Daher besteht bei diesen Patientinnen eine primäre Amenorrhoe und folglich kann niemals eine retrograde Menstruation stattfinden (64). Auch das seltene Vorkommen von Endometriose bei Männern legt nahe, dass es weitere Mechanismen geben muss, wie Endometriosezellen an den Läsionsort gelangen oder am Läsionsort entstehen können.

Einen Erklärungsversuch bietet u. a. die Zölometaplasietheorie, nach der Endometriosezellen durch Metaplasie aus Mesothel entstehen. Grundlage dieser Theorie ist der gemeinsame embryologische Ursprung von Mesothel und den Müller-Gängen, aus denen der Uterus mit seinem Endometrium hervorgeht: Das Zölomepithel (65). Laut der Stammzelltheorie könnten Progenitorzellen aus dem Knochenmark oder anderen Geweben, die auf hämatogenem oder lymphogenen Weg an den Läsionsort gelangen, Ursprung der Endometriose sein (66).

Es besteht aber ein Konsens, dass die Endometriose am wahrscheinlichsten in den allermeisten Fällen ihren Ursprung im eutopen Endometrium des Uterus hat und retrograde Menstruation und die nachfolgende Implantation eine entscheidende Rolle spielt (67). Eindeutig dafür spricht die Tatsache, dass eutopes Endometrium bei Endometriosepatientinnen diverse genetische oder epigenetische Veränderungen aufweist, die sich mit denen in Endometrioseläsionen decken. Es wird davon ausgegangen, dass diese Veränderungen zu großen Teilen angeboren sind und im Verlauf weitere Veränderungen dazukommen, die kumulativ die Erkrankung auslösen können. Diese weiteren Veränderungen werden u. a. durch die abnorme Umgebung in der Peritonealhöhle, durch inflammatorische, immunologische oder hormonelle Prozesse ausgelöst. Jede Endometrioseläsion hat stets ihren eigenen klonalen Ursprung. Es wird vermutet, dass unterschiedliche Mutationsprofile und epigenetische Veränderungen unterschiedliche Läsionstypen (peritoneal, ovariell, tiefinfiltrierend) (mit-)bedingen können. (49, 58, 67)

Die wichtige Rolle genetischer Aspekte wurden auch durch Zwillingsstudien bestätigt. Sie konnten ermitteln, dass der genetisch bedingte Anteil der Erkrankung ca. 50% beträgt (26, 27, 49), was als angeborene Prädisposition verstanden werden kann. Daher wurde intensiv nach betroffenen Genen gesucht. Es ist nicht möglich einzelne auslösende Gene zu definieren, die zur Erkrankungsprädisposition führen, vielmehr handelt es sich um einen kumulativen Effekt diverser Mutationen (49).

2.1.6.2 Wichtige Aspekte der Pathophysiologie der Endometriose

Ein entscheidender und häufig genannter pathophysiologischer Aspekt ist die Hormonabhängigkeit der Endometriose, genauer gesagt die Östradiolabhängigkeit. Zum einen werden in Endometriosezellen Östrogenrezeptoren (Estradiolrezeptoren (ER)), vor allem die

β -Isoform (ER- β), überexprimiert. ER- β ist in Endometriosezellen bis zu 100-fach stärker exprimiert als in gesundem Endometrium (68), Frauen mit Endometriose scheinen aber auch in ihrem eutopen Endometrium eine ER- β -Dominanz aufzuweisen (69). Eine hohe Expression von ER- β unterdrückt dabei die Expression von ER- α (70). Über ER- β hat Östradiol eine proliferationsfördernde Wirkung auf die Endometrioseläsionen, wie ER- β -*Knockdown*-Versuche an kultivierten Endometrioseprimärzellen zeigten. Hier führte der *Knockdown* zu einer stark verringerten Proliferation der Zellen. Zum anderen kommt es durch die Endometriose selbst zu lokal erhöhten Östradiolkonzentrationen. In normalem Endometrium gibt es nur eine geringe Eigensynthese von Steroidhormonen, in Endometriose allerdings kommt es durch eine erhöhte Aromataseaktivität zu einer erhöhten Östradiol (E2)-Produktion, auch in Kombination mit einer verringerten Inaktivierung durch die 17 β -Hydroxysteroid-Hydrogenase-2 (71). Natürlich wirken auch die systemisch zirkulierenden Steroidhormone des weiblichen Zyklus auf die Endometrioseläsionen – bei Frauen mit Endometriose ist das Östradiol im Serum häufig erhöht (1).

Zudem liegt bei Endometriose eine Progesteronresistenz vor. Diese ist u. a. in der Überexpression vom Progesteronrezeptor Typ A (PR-A) zu Ungunsten des Typ Bs (PR-B) begründet. PR-B ist die aktivere Form des Rezeptors, sodass eine PR-A-Dominanz zu einer verminderten Progesteronwirkung führt (72). Progesteron bewirkt über Glykodelin die Expression von 17 β -Hydroxysteroid-Hydrogenase-2, dem Enzym, das E2 in weniger aktives E1 (Östron) umwandelt und so zu einer verringerten Estradiolwirkung führt. In Endometrioseläsionen wird allerdings Glykodelin weniger exprimiert und in Kombination mit der geringeren Progesteronwirkung (durch den hohen Anteil an PR-A) kommt es so zu erhöhtem Östradiol (67, 71).

Auch die Inflammation ist ein wichtiger Bestandteil der Erkrankung der Endometriose, allerdings ist weiterhin nicht geklärt, ob Inflammation Ursache oder Folge der Endometriose ist, oder beides. Verschiedene proinflammatorische Zytokine, wie TNF-alpha, IL-6, IL-8, IL-16, sind in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen erhöht. Auch in Endometrioseläsionen selbst (im Vergleich zu gesundem Gewebe) und in eutopen Endometrium von Endometriosepatientinnen (im Vergleich zu Endometrium von Gesunden) sind proinflammatorische Zytokine erhöht (71, 73, 74). In den Endometrioseläsionen kommt es zur Überexpression der Cyclooxygenase-2 (Cox-2) im Vergleich zu gesundem Endometrium. Cox-2 führt u. a. zu einer erhöhten Prostaglandin E2 (PGE2)-Produktion (75). PGE2 fördert die Steroidogenese, was auch zur vermehrten Östradiolsynthese führt; Östradiol wiederum stimuliert über ER- β die Cox-2-Expression. Hormonelle Mechanismen und Inflammation sind also eng miteinander verschaltet (71). Eine wichtige Rolle in der Regulation der Inflammation kommt auch dem Transkriptionsfaktor *nuclear factor*- κ B (NF- κ B) zu. Dieser

ist in Endometrioseläsionen stark aktiv. Aktiviert von Tumornekrosefaktor TNF- α , Interleukin IL- β 1, Östradiol, oxidativem Stress oder nicht-kodierender RNA bewirkt er eine erhöhte Transkription von weiteren proinflammatorischen Chemo- und Zytokinen (Interleukine IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , *Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted RANTES*, *macrophage migration inhibitory factor* MIF) und steigert so die Entzündungsaktivität (76). Progesteron hingegen hemmt die NF- κ B-vermittelte Produktion von proinflammatorischen Chemo- und Zytokinen. Die in Endometriose bestehende Progesteronresistenz wirkt also auch proinflammatorisch (77, 78). NF- κ B hat viele weitere Funktionen, wie die Induktion der Transkription von Adhäsionsmolekülen. Die Hemmung dieser Transkription führt zur verringerten Adhäsionsfähigkeit der Endometriosezellen. Auch für die Invasivität von Endometriosezellen ist NF- κ B von Bedeutung, u. a. wird die Transkription von Matrixmetalloproteasen induziert, die extrazelluläre Matrix degradieren können (76, 78).

Gelangt ektopes Endometrium in die Peritonealhöhle, wird es normalerweise von Immunzellen beseitigt. Man geht davon aus, dass hier bei Betroffenen eine gewisse Immundysfunktion vorliegt. Vermutlich ist u. a. die Funktion von Makrophagen- und *Natural Killer*-Zellen (NK-Zellen) gestört (71). Für die Dysfunktion des Immunsystems spricht auch die Assoziation mit Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematodes und rheumatoider Arthritis sowie mit Erkrankungen des atopischen Formenkreises (67). Die Endometriosezellen selbst sind aber auch zu einer gewissen Immunflucht befähigt. Sie produzieren beispielsweise den löslichen Faktor *Soluble intercellular adhesion molecule-1* (sICAM-1), der sie vor der Lyse durch NK-Zellen schützt (71).

Um Endometrioseläsion zu bilden, müssen die Endometriumzellen am Peritoneum adhären. Womöglich weist das Peritoneum vorbestehende Schädigungen oder Veränderungen auf, die die Adhäsion erleichtern (67). Wichtig für die primäre Adhäsion ist die Bindung von CD44 (Hyaluronsäurerezeptor) an Hyaluronsäure der extrazellulären Matrix (EZM). Die Fibronectin-Rezeptoren (Integrine) α 4 β 1 und α 5 β 1 sind in Endometriosezellen deutlich stärker exprimiert als in eutopem Endometrium, was darauf hindeutet, dass diese Integrine für die Adhäsion besonders relevant sein könnten (79). Zudem ist eine Überexpression verschiedener Matrixmetalloproteasen (MMPs) bekannt, sowie ein Mangel an *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs), was das Durchdringen der EZM und damit die Invasion der Endometriosezellen ermöglicht. Auch hier spielen hormonelle Faktoren eine Rolle: MMPs sind unter Östrogeneinfluss hyperaktiv während die TIMP-Aktivität durch Progesteron reguliert wird und diese durch Progesteronresistenz hypoaktiv sind (71).

2.1.6.3 Endometriose und Malignome

Es stellt sich die Frage, ob Endometriose mit ihren Mutationen und ihrer möglichen Invasivität mit einem erhöhten Malignomrisiko verbunden ist. Tatsächlich ist ein erhöhtes Risiko für

Schilddrüsenkarzinome und Non-Hodgkin-Lymphome bekannt, die genauen Gründe dafür aber ungeklärt. Für das Endometriumkarzinom und das Mammakarzinom liegt möglicherweise eine geringe Risikoerhöhung vor. Für das kolorektale Karzinom sowie das maligne Melanom zeigt sich keine Risikoerhöhung. Das Risiko für das Cervixkarzinom scheint erniedrigt, was vermutlich an der frühen Detektion von zervikalen Dysplasien bei Endometriosepatientinnen liegt (80, 81). Bekannt ist allerdings eine eindeutige Risikoerhöhung für das Ovarialkarzinom. Das Vorliegen einer Endometriose geht mit einer Risikoverdopplung für das Ovarialkarzinom einher (71). Das höchste Risiko geht von ovarieller Endometriose aus, diese kann das Ovarialkarzinomrisiko sogar verfünffachen (71). Es wird von Endometriose-assoziierten Ovarialkarzinomen (EAOC) gesprochen. Die Endometriose und das Ovarialkarzinom teilen einige Risikofaktoren wie die frühe Menarche und geringe Parität, was eine mögliche Ursache der Koexistenz beider Erkrankungen sein könnte (81). Das EAOC unterscheidet sich aber von der Gesamtheit der Ovarialkarzinome. Unter EAOC ist der klarzellige Subtyp mehr als 3-mal häufiger anzutreffen als in der Gesamtheit der Ovarialkarzinome. Auch der Anteil der endometroiden Ovarialkarzinome ist in der Gruppe der EAOC erhöht (81, 82). Das Erkrankungsalter ist bei EAOC deutlich geringer und der Tumormarker CA-125 ist deutlich seltener erhöht (82). Es gibt eine Überschneidung von Mutationen der EAOC, der Mutationen von Endometriosezellen sowie der Mutation in eutopem Endometrium. Diese Mutationen betreffen u. a. KRAS, ARID1A und PIK3CA (83, 84). Dieser Sachverhalt führte zu der Theorie, dass es eine Abfolge in der Entstehung geben könnte: Endometriumzellen bilden extraterin Endometrioseläsionen, die wiederum das Potential besitzen zu entarten und Endometriose-assoziierte Karzinome zu bilden (85). Diese Mutationen liegen aber auch in TIE-Läsionen vor, wo sich in aller Regel kein Karzinom bildet. Dies wirft die Frage auf welche zusätzlichen Faktoren und Umstände insbesondere am Ovar die Entartung begünstigen (83). Teil der Erklärung könnten die hohen Östrogenkonzentrationen im Ovar sein. Das Enzym CYP11B1, das in Endometriosezellen sehr aktiv ist, kann Östradiol in 4-OH-Östradiol umwandeln, was weiter in 4-OH-Östradiol-Chinon umgewandelt wird. 4-OH-Östradiol-Chinon kann über Alkylierung und Oxidation DNA-Schäden verursachen (71).

Dank zunehmend intensiver Forschung häufen sich die Erkenntnisse über die Erkrankung der Endometriose, insbesondere im molekularen Bereich. Ziel der Forschung ist es auch Pathomechanismen der Erkrankung zu finden, die sich als Ansatzpunkt für eine sog. *targeted therapy* eignen. Daher gibt es Forschungsbemühungen unterschiedlichste zelluläre Mechanismen besser zu verstehen. Neben genetischen und epigenetischen Fragestellungen werden u. a. auch Stoffwechselprozesse und Signaltransduktion untersucht. Ein Rezeptor und dessen Funktionen und Signaltransduktion, der im Kontext der Endometriose noch sehr unerforscht ist, ist der Calcium-sensitive Rezeptor. Auf diesen soll nun eingegangen werden.

2.2 Calcium-sensitiver Rezeptor

2.2.1 Vorkommen und Funktionen des CaSR

Der Calcium-sensitive Rezeptor wurde erstmal 1993 von Brown et al. in Nebenschilddrüsenzellen des Rindes nachgewiesen (86). In der Nebenschilddrüse ist der Rezeptor von essentieller Bedeutung für die Regulation des Parathormons und damit für die Regulation des extrazellulären Calciumspiegels (87). Eine weitere wichtige Rolle in der Calciumhomöostase spielt der CaSR in der Niere über die Regulation der Calciumsekretion in den Harn. Mutationen des CaSR können zu hypo- oder hypercalciämischen Erkrankungen führen, z. B. zu der familiären hypercalciurischen Hypercalciämie Typ 1 (87). Neben dem Vorkommen in an der Calciumhomöostase beteiligten Organen (calcitrope Funktionen des Rezeptors) kommt der Rezeptor auch in diversen anderen Geweben vor (non-calcitrope Funktionen) (88). In glatten Muskelzellen der Gefäßwände fördert der CaSR ihre Proliferation und Kontraktilität, was eine Einflussnahme auf den Blutdruck ermöglicht (89, 90). Im ZNS konnte der CaSR an diversen Lokalisationen nachgewiesen werden; stark exprimiert wird er z. B. im Hypothalamus. Es ist bekannt, dass Calcium für viele Funktionen im ZNS essenziell ist. Zunehmend kommt ans Licht, dass auch der CaSR als Sensor für extrazelluläres Calcium in vielen Prozessen eine Rolle spielt, z. B. in der Regulation neuronalen Wachstums und neuronaler Migration (91). Auch im Gastrointestinaltrakt kommt der CaSR in diversen Zellen vor: in Parietalzellen des Magens bewirkt er bei Aktivierung eine verstärkte Protonensekretion (92, 93), in G-Zellen eine verstärkte Gastrinsekretion (93). Im Colon spielt er beispielsweise eine Rolle in der Barrierefunktion des Epithels (94) und kann bei Aktivierung die Flüssigkeitssekretion hemmen (95). Es könnten unzählige weitere Lokalisationen und Funktionen des ubiquitär exprimierten Rezeptors aufgezählt werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der CaSR bei sehr vielen zellulären Prozessen eine regulierende Rolle einnimmt, bei Hormonsekretion, Genexpression, inflammatorischen Prozessen, Proliferation, Differenzierung oder Apoptose (96). Auch bei diversen malignen Geschehen spielt er eine Rolle (88).

2.2.2 CaSR als Onkogen oder Tumorsuppressor

Der CaSR kann je nach Tumorentität als Onkogen oder als Tumorsuppressor wirken (96). Diese konträre Wirkung erklärt sich u. a. durch unterschiedliche beteiligte G-Proteine, verschiedene Adapterproteine, Mutationen des Rezeptors oder unterschiedliche Ligandenbindung. Je nach (Tumor-)Zelle kann das Expressionsmuster des Rezeptors variieren (96, 97). Während der CaSR in der gesunden Mamma die Laktation fördert, kann er im Mammakarzinom ein Onkogen sein. Dabei ist er auch in der Pathogenese von Knochenmetastasen beteiligt (98). Auch beim Adenokarzinom der Lunge spielt der CaSR eine Rolle als Onkogen bei der Entstehung von Knochenmetastasen über die verstärkte Expression

von NF- κ B und dem Parathormon-verwandte Peptid PTHrP und die dadurch angeregte Differenzierung der Osteoklasten (99). In *in vitro*-Versuchen an Adenokarzinomzellen des Endometriumkarzinom zeigte sich der CaSR als Tumorsuppressor. Eine erhöhte Expression des Rezeptors geht mit einer höheren Apoptoserate einher, während ein Knockdown des Rezeptors zu erhöhter Invasivität führte (100). Auch bei Neuroblastomen und Colonkarzinomen scheint der CaSR ein Tumorsuppressor zu sein, wobei undifferenzierte Tumoren dieser Entitäten häufig mit einem Expressionsverlust des CaSR einhergehen (96).

2.2.3 CaSR und Endometriose

Die Rolle des CaSR im Kontext der Endometriose ist bislang weitestgehend ungeklärt. In vorherigen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnten die Expression des CaSR in der Zelllinie 12Z nachwiesen werden (8). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der CaSR an der Proliferation und Migration der 12Z-Zellen beteiligt ist. Während eine Calciumbehandlung (2,5 bzw. 5 mM für 30 min) zu einer gesteigerten Zellproliferation führte, konnte die Kombinationsbehandlung mit dem Inhibitor des CaSR NPS-2143 (4,3 μ M, 1 h; Calciumzugabe nach 30 min) diesen Effekt wieder aufheben. Dies zeigt, dass die erhöhte Proliferation durch die Calciumbehandlung vom CaSR abhängig ist. Ebenso konnte durch Calciumbehandlung (5 mM, 30 min) eine gesteigerte Migrationsfähigkeit der 12Z-Zellen beobachtet werden, die ebenfalls durch die Kombinationsbehandlung mit NPS-2143 (4,3 μ M, 1 h, Calciumzugabe nach 30 min) wieder aufgehoben werden konnte. Dies beweist, dass auch die Calcium-induzierte Migration der 12Z-Zellen über den CaSR vermittelt wird. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sowohl Proliferation als auch Migration durch alleinige NPS-2143 Behandlung leicht reduziert waren. Dem zugrunde liegt vermutlich eine geringe Aktivität des CaSR durch Stimulation durch Calcium im Calcium-reduzierten Medium oder andere Liganden wie Aminosäuren, die durch den CaSR-Inhibitor gehemmt wurde. Diese Ergebnisse bieten Anlass die Rolle des CaSR in Endometriose genauer zu untersuchen.

2.2.4 Aufbau des Rezeptors

Der membranständige Calcium-sensitive Rezeptor wird auf Chromosom 3 an Locus q13.33 q21.1 kodiert und besteht aus 1078 Aminosäuren (101, 102). Es handelt sich um einen homodimeren Rezeptor der Klasse C der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (101). Diese Rezeptorklasse zeichnet sich durch große extrazelluläre Domänen aus, so auch der CaSR. (103). Seine extrazelluläre Domäne besteht aus zwei venusfliegen-artigen Lappen (*venus fly trap (VFT)*) und der sog. cysteinreichen Region, die an die Transmembrandomäne gebunden ist (102). Wie alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist der CaSR ein heptahelikaler Rezeptor, insbesondere seine Transmembrandomäne besteht aus sieben α -Helices (103). Intrazellulär befindet sich der C-terminale Schwanz, der bei

Konformationsänderung des Rezeptors mit den ebenfalls zu der intrazellulären Domäne gehörenden G-Proteinen interagieren kann (103).

2.2.5 Aktivierung des CaSR

Zwischen den beiden Lappen eines jeden Monomers der extrazellulären Domäne liegen die Bindungsstellen des Rezeptors, an die verschiedene Liganden binden können. Wichtigster Ligand und Namensgeber des Rezeptors ist das ionisierte Calcium. Bindet ein Ligand an der Bindungsstelle, kommt es wie beim Schließen einer Venusfliegenfalle zu einer Konformationsänderung der Lappen (102). Es wird auch davon gesprochen, dass der Rezeptor durch Bindung eines Liganden vom offenen Zustand in einen geschlossenen Zustand übergeht (101). Die cysteinreiche Region gibt das Signal in Form einer Konformationsänderung von der VFT an die Transmembrandomäne weiter (97). Die Konformationsänderung setzt sich bis nach intrazellulär fort, sodass der C-terminale Schwanz mit den G-Proteinen interagiert und intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst werden (102).

Aktiviert werden kann der CaSR neben ionisiertem Calcium auch von weiteren orthosterischen Agonisten. Dazu gehören weitere anorganischen Kationen wie Mg^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , und Sr^{2+} und organische Kationen wie Polyarginin (102). Auch durch synthetische Calcimimetika wie NPS-R568 kann der Rezeptor aktiviert werden (102). Durch allosterische Modulatoren kann der Rezeptor positiv beeinflusst werden, in dem die Sensibilität für Liganden erhöht wird. Zu den allosterischen Modulatoren des CaSR gehören z. B. L-Aminosäuren wie L-Phenylalanin oder L-Tryptophan, Peptide wie Glutathion oder das Medikament Cinacalcet, das bei Hyperparathyreoidismus eingesetzt werden kann (103, 104).

2.2.6 Hemmung des CaSR

Durch synthetische Antagonisten wie NPS-2143 oder NPS-89636 kann der CaSR hingegen selektiv gehemmt werden (103). Diese Wirkstoffe werden auch als Calcilytika bezeichnet (97). Auf den in dieser Arbeit verwendeten Inhibitor NPS-2143 soll an dieser Stelle besonders eingegangen werden:

NPS-2143 (Synonym: SB-262470A) ist das erste Calcilytikum, das identifiziert wurde (105). Es inhibiert selektiv den CaSR, auch in höheren Konzentrationen werden keine anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptor inhibiert (106). Er bindet an der 7. Helix der Transmembrandomäne und bewirkt dadurch als allosterischer Inhibitor eine Konformationsänderung innerhalb der Transmembrandomäne, was vermutlich die Interaktion mit den intrazellulären G-Proteinen erschwert (107, 108). Es konnte gezeigt werden, dass die intravenöse Applikation bei Mäusen zu einem Parathormonanstieg führt, was wiederum zur Bereitstellung von Calcium aus dem Knochen und durch verstärkte renale Rückresorption zu einem transienten Anstieg des Serumcalciums führt (105, 106). NPS-2143 ist im Hinblick auf seine

Bioverfügbarkeit prinzipiell auch zur oralen Applikation geeignet, was bislang allerdings ebenfalls erst im Tiermodell zu Anwendung kam (105). Auf Grund der vorübergehenden anabolen Wirkung des Parathormons auf den Knochen war NPS-2143 neben anderen Calcilytika neuer Hoffnungsträger in der Osteoporosetherapie – allerdings bislang wenig erfolgreich (109). Mögliche neue Einsatzgebiete werden diskutiert, zum Beispiel in der Therapie von Asthma (110). Etabliert und verbreitet ist allerdings die Anwendung des Inhibitors zur Untersuchung des CaSR *in vitro* (111).

2.2.7 Signalwege des CaSR

Die nachgeschalteten Signalwege des CaSR sind sehr vielfältig und unterscheiden sich je nach gebundenem Liganden und dem Gewebe, in dem der Rezeptor exprimiert wird (105). Welcher Signalweg angestoßen wird, hängt hier auch davon ab welche G-Proteine beteiligt sind (97). Grundsätzlich kommen hauptsächlich drei heterotrimere G-Proteine vor: $G_{q/11}$, $G_{i/o}$ and $G_{12/13}$. In manchen Zellen, z. B. in Mammakarzinom- oder Kolonkarzinomzellen, kommt auch G_s vor (103).

2.2.8 G-Proteine vermittelte Signaltransduktion

Die G-Proteine bestehen aus den drei Untereinheiten α , β und γ . Die α -Untereinheit besitzt eine Bindungsstelle für Guanosindiphosphat (GDP) bzw. Guanosintriphosphat (GTP), was dem G-Protein seinen Namen verliehen hat. Im inaktiven Zustand des Rezeptors ist GDP gebunden. Bei Aktivierung wird GDP durch GTP ersetzt und es kommt zum Lösen des G-Proteins vom Rezeptor sowie zur Spaltung in eine α -Untereinheit sowie einen β - γ -Komplex. Beide verbleiben membrangebunden. Es können unterschiedliche Typen der α -Untereinheit beteiligt sein, die dann unterschiedliche Wirkung auf ihre Zielproteine entfalten (102, 112):

$G_{q/11}$: Über $G_{q/11}$ wird die Phospholipase C aktiviert. Diese spaltet PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) in IP₃ (Inositoltriphosphat) und DAG (Diacylglycerin), die als *second messenger* das Signal weitergeben. IP₃, ein hydrophiles Molekül, verbleibt im Zytosol und diffundiert zum glatten endoplasmatischen Retikulum, wo es an Calciumkanäle bindet. Es kommt zum Öffnen der Calciumkanäle und zum Ausstrom von Calcium vom glatten endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol. DAG, ein lipophiles Molekül, verbleibt in der Zellmembran. Dort aktiviert es die Proteinkinase C, die durch die Phosphorylierung weiterer Proteine vielseitige Funktionen wahrnimmt. Calciumabhängige Isoformen der Proteinkinase C werden auch durch die intrazelluläre Calciumerhöhung nach IP₃-Wirkung stimuliert (102, 112, 113).

G_s : Über $G_{\alpha s}$ wird die Adenylatcyclase stimuliert, sodass die intrazelluläre cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP)-Konzentration erhöht wird. cAMP ist ein Regulator diverser intrazellulärer Enzyme. Am bekanntesten ist die Aktivierung der Proteinkinase A, die ihre

Substrate durch Phosphorylierung aktiviert. Beispielsweise wird auch CREB (*cAMP response element-binding protein*) durch die Proteinkinase A phosphoryliert, welches an sog. cAMP-responsive Elemente der DNA bindet und die Transkription von Genen fördert (112).

$G_{i/o}$: $G_{i/o}$ -vermittelt kommt es zur Hemmung der Adenylatcyclase und zur Senkung des cAMP-Spiegels. Damit bleibt die Aktivierung der Proteinkinase A aus, was Einfluss auf die Aktivität ihrer Substrate nimmt (114).

$G_{12/13}$: Über $G_{12/13}$ kann die Aktivierung von monomeren G-Proteinen (kleinen G-Proteinen) wie RhoA erfolgen, die eine wichtige Rolle in der Regulation des Zytoskletts spielen und so z. B. die zelluläre Migration oder Adhäsion beeinflussen (97).

Nicht nur die α -Untereinheit, sondern auch der β - γ -Komplex hat eine Funktion in der Signaltransmission des Rezeptors. Die β - γ -Einheit kann u. a. auch auf die Adenylatcyclase und die Phospholipase C (PLC) wirken (114). Die β - γ -Einheit des $G_{i/o}$ -Proteins beispielsweise kann nach Aktivierung des CaSR das kleine G-Protein RAS aktivieren (115). Eine weitere wichtige Funktion des β - γ -Komplexes ist die Rezeptordesensitivierung. Die GTP-Hydrolyse-Aktivität der α -Untereinheit reicht nicht aus, um den Rezeptor vollständig zu deaktivieren. An der β - γ -Einheit können G-Protein-rezeptorspezifische Kinasen binden, die Serin- und Threoninreste der intrazellulären Rezeptordomäne phosphorylieren können. Diese Phosphorylierung ermöglicht erst die Bindung von Arrestin, was die G-Protein-Interaktion blockiert. Dadurch wird der Rezeptor in einen refraktären Zustand gebracht, was seine Daueraktivierung verhindert (114).

Die nachgeschalteten Signalwege des CaSR sind sehr umfangreich, komplex sowie variabel. Zunehmend verwendet wird der Begriff *biased signaling*, der die funktionelle Selektivität des Rezeptors beschreibt. Unterschiedliche Liganden bringen den Rezeptor in unterschiedliche Konformationszustände, was unterschiedliche Präferenzen in der Aktivierung ihrer *downstream*-Signalwege bedingt. Verschiedene Liganden können in unterschiedlichen Zellen die gleiche Reizantwort auslösen und gleiche Liganden können in unterschiedlichen Zellen verschiedene Signalwege aktivieren (115, 116).

Auf Grund der Komplexität der CaSR-vermittelten Signaltransmission soll vereinfachend der Fokus auf den in dieser Arbeit untersuchten Signalwegen liegen.

2.2.9 PI3K/AKT

2.2.9.1 Aktivierung von PI3K/AKT

Der PI3K/AKT-Signalweg kann grundsätzlich auf unterschiedlichste Weise aktiviert werden. So können Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) von aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinasen, über aktivierte G-Protein-gekoppelten Rezeptoren oder auch von konstitutiv aktiviertem RAS

aktiviert werden (117). Auch der G-Protein-gekoppelte Rezeptor CaSR kann den PI3K/AKT Signalweg aktivieren, was in diversen Zellen nachgewiesen wurde (89, 118–120). Die stimulierte PI3K wandelt membranständiges Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) um (117). *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN) ist Antagonist dieser Reaktion und somit ein Inhibitor der AKT-Aktivierung. PIP₃ aktiviert Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-Isoform 1 (PDK1) und mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*), die die Phosphorylierung von AKT, auch Proteinkinase B genannt, an Thyrosin 308 (durch PDK1) und Serin 473 (durch mTORC2) und damit die Aktivierung von AKT bewirken (*Abbildung 1*) (121).

2.2.9.2 Funktionen und Downstreaming von AKT

Die Serin-Threonin-Kinase AKT beeinflusst viele zelluläre Vorgänge in komplexer Art und Weise über die Phosphorylierung zahlreicher Substrate (*Abbildung 1*). Beispielsweise über die Phosphorylierung bzw. Bindung von pro-apoptotischen Proteinen der Bcl2-Familie wie BAD und BAX, führt AKT zur Hemmung der Apoptose (122). AKT aktiviert *mammalian Target of Rapamycin complex 1* (mTORC1), ein wichtiger Komplex in der Regulation des Zellwachstums und Zellstoffwechsels. Er stimuliert u. a. über Transkriptionsfaktoren die Protein- und Lipidsynthese (122, 123). Außerdem phosphoryliert AKT Forkhead-Box O (FOXO), das unphosphoryliert Apoptose begünstigt und die Zellteilung hemmt; Akt hemmt also über die Phosphorylierung von FOXO die Apoptose und steigert die Zellteilung (122). AKT hemmt zusätzlich die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK β), was ebenfalls zu erhöhter Proliferation und Zellwachstum führt (*Abbildung 1*) (117). Die AKT-Aktivierung kann ebenfalls Migration und Angiogenese fördern und Stoffwechselprozesse sowie Immunprozesse regulieren (117, 121).

2.2.9.3 PI3K/AKT in Tumoren und in Endometriose

In Tumorzellen ist der PI3K/AKT-Signalweg häufig konstitutiv überaktiv, z. B. durch Loss-of-function-Mutationen von PTEN, sodass es zur verminderten Apoptose und erhöhtem Wachstum und Proliferation kommt (121). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass in Endometriose-assoziierten Ovarialkarzinom der PI3K/AKT-Signalweg regelhaft mutiert ist – im Gegensatz dazu ist dies beispielsweise im nicht-Endometriose-assoziierten *high-grade* serösen Ovarialkarzinom nur sehr selten der Fall. So weisen 40% der Endometriose-assoziierten klarzelliger Ovarialkarzinome einen Expressionsverlust von PTEN auf, während *high-grade* seröse Ovarialkarzinome in nur 5% der Fälle überhaupt eine Mutation des PI3K/AKT-Signalweges aufweisen (124). Und auch in Endometrioseepithelzellen wurde ein PTEN-Verlust nachgewiesen (125). Sowohl in Endometrioseläsionen als auch eutopem Endometrium von Endometriose-Patientinnen konnte eine erhöhte Aktivität von AKT festgestellt werden (126).

Die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges über den CaSR ist bisher noch nicht in Endometriosezellen beschrieben. Diese Möglichkeit soll in dieser Arbeit überprüft werden.

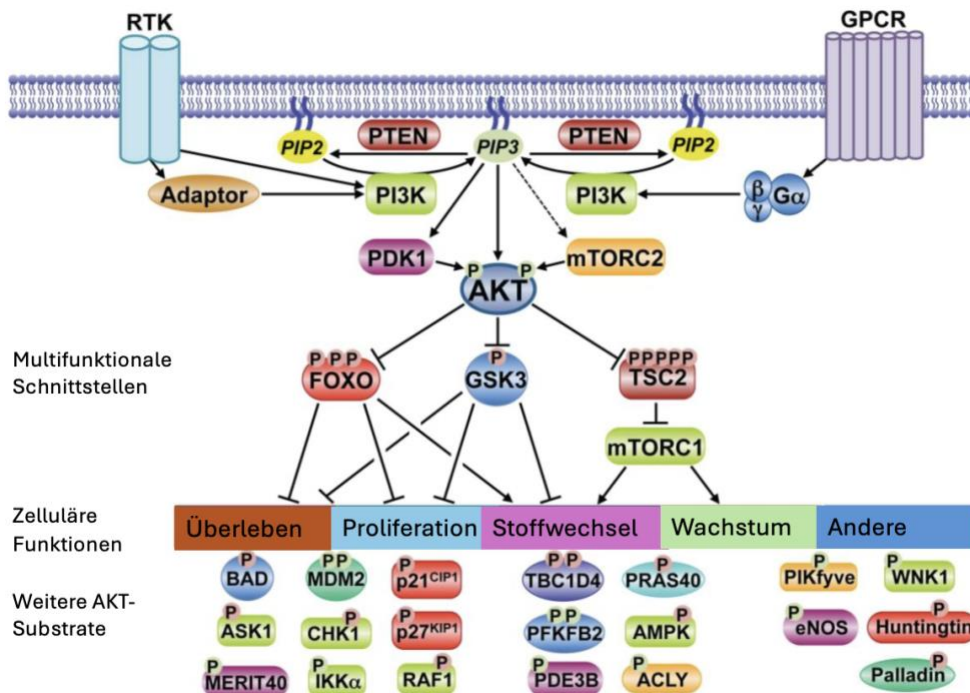


Abbildung 1: PI3K/AKT-Signalweg und seine Funktionen

Dargestellt ist die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges über Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Verdeutlicht werden die vielseitigen Funktionen von AKT in Überleben, Proliferation, Stoffwechsel, Wachstum und anderen zellulären Mechanismen. Dargestellt ist außerdem eine Auswahl der zahlreichen Substrate von AKT. Modifiziert nach Manning et al. (2018)

2.2.10 MAP-Kinasen

Mitogen-aktivierte-Proteinkinasen (MAPK)-Signalwege kommen ubiquitär in allen Zellen des Menschen vor und spielen eine essenzielle Rolle in der Regulation von Zellteilung, Zellproliferation und Zelldifferenzierung.

2.2.10.1 Aktivierung der MAPK-Kaskade

Die evolutionär konservierten MAPK-Signalwege bestehen aus hintereinander geschalteten Proteinkinasen, die nacheinander phosphoryliert werden. Wird die MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K) aktiviert, phosphoryliert sie die MAP-Kinase-Kinase (MAP2K), die wiederum die MAP-Kinase (MAPK) phosphoryliert. Diese wirkt dann auf weitere Substrate. MAP3K, MAP2K und MAPK bezeichnet jeweils eine Gruppe an verschiedenen Kinasen. Die vier MAPK sind ERK1/2-MAPK, ERK5-MAPK, p38-MAPK sowie JNK-MAPK (Abbildung 2) (127).

Die Aktivierung der MAPK/ERK1/2-Kaskade erfolgt klassischerweise über Rezeptor-Tyrosinkinase, die das kleine G-Protein RAS aktivieren. RAS aktiviert dann RAF (RAS

aktivierbarer Faktor). Alternativ kann AKT ebenfalls RAF phosphorylieren und damit aktivieren. RAF entspricht einer MAP3K, die dann MEK (MAP2K) aktiviert, die wiederum ERK1/2 aktiviert (114). Die Aktivierung der MAPK p38 erfolgt hauptsächlich über die MAP2Ks MKK3 und MKK6, auch MKK4 kann an der Aktivierung beteiligt sein (128). Es können unterschiedliche MAP3Ks für die Aktivierung zuständig sein; bekannt sind u. a. TAK1, ASK1/MAPKKK5 und MEK4 (128). Auch eine mögliche Aktivierung der MAPK-Kaskade über Vertreter der G-Protein-Familie RHO ist beschrieben. So können die kleinen G-Proteine RAC-1 und CDC42 über MEKK1 oder MLK-1 die Aktivierung von MAP3Ks bewirken, die in der Aktivierung von p38 münden (128). P38 und JNK werden häufig koaktiviert, was vermutlich an der großen Überschneidung ihrer vorgeschalteten MAP3Ks liegt (128). Die Aktivierung der MAPK JNK erfolgt über die MAP2Ks MKK4 und MKK7, die ihrerseits von unterschiedlichen vorgeschalteten MAP3K aktiviert werden (127). Die MAPK-Signalwege sind u. a. auch mit dem PI3K/AKT Signalweg verschaltet. Es kommt zur Kommunikation auf verschiedenen Ebenen der Signalkaskaden, sodass die zelluläre Antwort auf einen Reiz noch feiner abgestimmt werden kann (129).

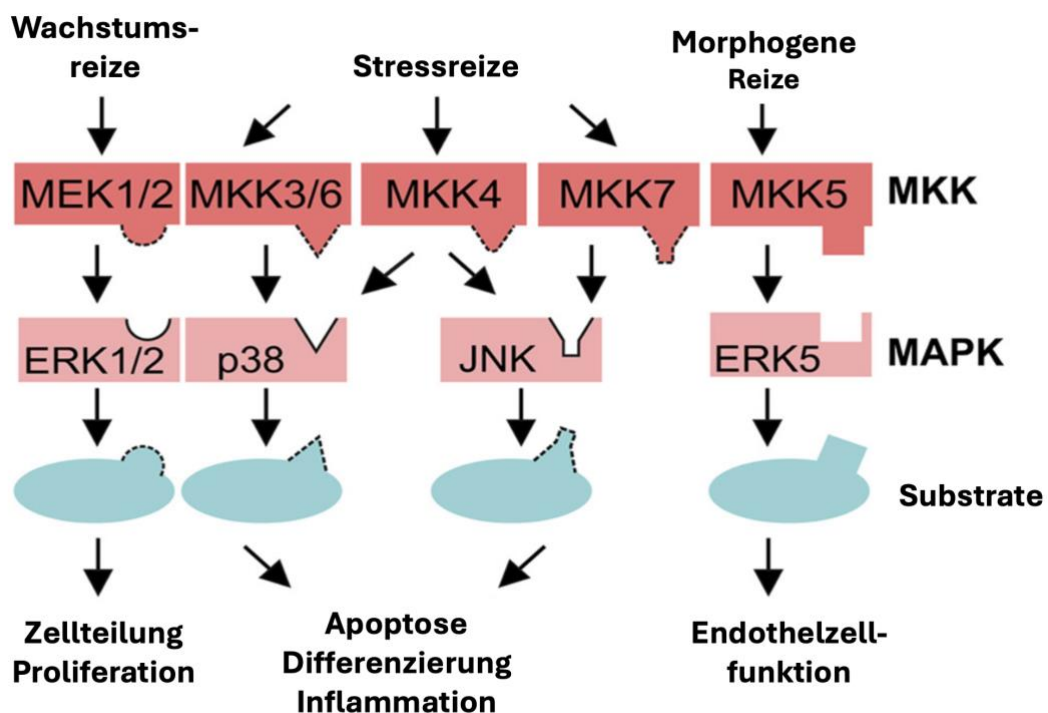


Abbildung 2: MAPK-Kaskade

Dargestellt sind die Abläufe der MAPK-Kaskade in menschlichen Zellen. Wachstumsreize, Stressreize und morphogene Reize (während der Embryogenese) führen über Zwischenschritte zur Aktivierung von MKK (=MAP2K), die spezifisch MAPK aktivieren und über unterschiedliche Substrate verschiedene Auswirkungen auf die Zelle haben. Modifiziert nach Ma und Nicolet (2023).

Auch über den CaSR ist eine Aktivierung der MAPK-Signalwege über unterschiedliche Mechanismen möglich (97). Die Aktivierung von ERK1/2 über den CaSR ist sowohl über $G_{q/11}$

al auch über $G_{i/o}$ möglich (115). Sowohl RAS als auch PKC sind *downstream* involviert und auch PI3K kann an der MAPK-Aktivierung beteiligt sein (130). Ebenso kann eine β -Arrestin-Rekrutierung MAPK stimulieren (115). Neben der Aktivierung von ERK1/2 ist auch die Aktivierung von p38 über den CaSR möglich. Beschrieben wird vor allem die Aktivierung der Kinase-Kaskade über $G_{q/11}/PLC/PKC$. Dies gilt auch für JNK (131). In dieser Arbeit soll die Aktivierung der MAPK über den CaSR im Kontext der Endometriose analysiert werden.

2.2.10.2 Funktionen und Downstreaming der MAPK

Die MAPK ERK1/2 besteht aus zwei Subtypen (ERK 1 und ERK 2), die auf Grund ihrer Ähnlichkeit meist zusammengefasst betrachtet werden (132). Als Serin-Threonin-Kinase phosphoryliert ERK1/2 über 250 Substrate *downstream* sowie *upstream* im Sinne eines negativen Feedbacks. Der ERK1/2-Signalweg stellt eine zentrale Regulationseinheit für wesentliche zelluläre Prozesse dar, dazu gehören Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose sowie Migration (133). ERK1/2 phosphoryliert zum einen Zielsubstrate im Zytoplasma wie ribosomale S6-Kinasen (RSKs), *Mitogen-and-stress-activated-kinases* (MSKs) oder die zytosolische Phospholipase A2 (cPLA2). Zum anderen kann aktiviertes ERK1/2 in den Zellkern translozieren, Transkriptionsfaktoren wie c-FOS, ELK-1 oder SP-1 aktivieren (132, 133) und so Zellproliferation und Zelldifferenzierung fördern sowie Apoptose hemmen (134). Die ERK1/2-Aktivierung kann über diverse Mechanismen ebenfalls die Migration fördern: indem sie über RSKs, die die Motilität erhöhen, die Bildung von Zellausläufern vermittelt; über den *wave 2 regulatory complex 2* die Aktin-Polymerisierung fördert oder die Transkription von Integrinen und MMPs induziert (134, 135).

Die MAPK p38 liegt in vier unterschiedlichen Isoformen vor: p38 α , p38 β , p38 δ und p38 γ . Die Isoformen weisen eine ca. 60%ige Sequenzhomologie auf und unterscheiden sich hinsichtlich ihres Vorkommens je nach Zelltyp sowie ihrer *downstream*-Funktionen. Allerdings gibt es hier auch viele Überschneidungen, sodass zusammengefasst häufig nur von p38 die Rede ist (136, 137). Die Funktionen von p38 betreffen die Zellproliferation oder Apoptose, Zelldifferenzierung und Immunantwort unter Stressbedingungen. Dass der gleiche Signalweg sowohl Proliferation als auch Apoptose fördern kann und Migration fördern oder hemmen kann, klingt zunächst widersprüchlich, lässt sich aber dadurch erklären, dass unterschiedliche Reize und Reizmuster in unterschiedlichen Kontexten eine unterschiedliche Reizantwort hervorrufen können (136). Wie ERK phosphoryliert p38 eine Vielzahl an Substraten sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern. Im Zytoplasma phosphoryliert es weitere Proteinkinasen, wie *MAP Kinase-activated protein kinase 2* (MK2), *MAP Kinase-interaction-protein-kinase* (MNK), *p38-regulated/activated-kinase* (PRAK/MSK) und MSKs oder andere Substrate wie cPLA2 (138). MK2 beispielsweise kann über die Phosphorylierung von HSP27, einem Hitzeschockprotein, den Umbau von Aktinfilamenten fördern oder über die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren CREB oder *activating transcription factor* (ATF1) die Expression

bestimmter Gene beeinflussen (136, 139). p38 kann auch nach Translokation in den Nucleus direkt Transkriptionsfaktoren wie ATF1 und 2, *SRF accessory protein 1*, CHOP oder p53 aktivieren (138).

Die MAPK JNK, auch c-Jun NH₂-terminale Kinase genannt, ist eine in ihrer Funktion der MAPK p38 ähnliche Kinase. Beide reagieren u. a. auf Stresssignale, wie UV-Strahlung, Oxidativer Stress, Entzündungsmediatoren, wie Zytokine, Hitzeschock oder osmotischen Stress, weswegen sie auch Stress-Kinasen genannt werden (137, 140). Wie p38 kann JNK Einfluss auf die Zellproliferation, Apoptose, Zelldifferenzierung, Migration und Immunantwort nehmen und damit wesentliche zelluläre Mechanismen regulieren (140). Auch JNK phosphoryliert zahlreiche Substrate im Cytoplasma oder Transkriptionsfaktoren im Zellkern. Dazu gehören zytoplasmatische Substrate wie cPLA2 oder zytoskelettale Proteine wie Cofilin oder α -Actinin, über die Zelladhäsion und Migration beeinflusst werden können. Ein wichtiges Target von JNK ist der Transkriptionsfaktor c-JUN, der wiederum den Transkriptionsfaktorkomplex *activator protein 1* (AP-1) aktiviert. AP-1 reguliert die Expression von diversen Genen, die die oben genannten unterschiedlichen zellulären Prozesse beeinflussen (141, 142).

Abschließend soll die Rolle der Integrine, im Besonderen Integrin β 1, im Kontext der Endometriose und des CaSR erläutert werden, welches neben den Signalwegen PI3K/AKT und MAPK Gegenstand dieser Arbeit ist.

2.3 Integrine

Integrine sind eine große Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen, die das Binden von Zellen an der EZM bzw. anderen Zellen sowie die Signaltransduktion der EZM an die Zelle ermöglichen. Es handelt sich um heterodimere Transmembranrezeptoren, die aus einer alpha- sowie einer Betakette bestehen. Durch unterschiedliche Kombinationen verschiedener Alpha- und Beta-Ketten ergeben sich 18 unterschiedliche Heterodimere (Abbildung 2), deren Vorkommen je nach Gewebe variiert (9, 143).

Integrine binden an Liganden der EZM wie Kollagen, Fibronectin oder Laminin sowie an Liganden der Zelloberflächen und bilden so einen Kontakt zwischen dem Inneren der Zelle und ihrer Umwelt. Auf zytosolischer Seite sind Integrine über Adapterproteine wie Vinculin oder Talin an Bestandteile des Zytoskeletts wie Aktin oder alpha-Aktinin gebunden (9). Integrine vermitteln bidirektional zwischen Zellinnerem und extrazellulärem Milieu. Einerseits wird durch das Binden an Bestandteilen der EZM das Verhalten und die Form der Zelle beeinflusst, andererseits kann durch intrazelluläre Signale die Bindung an der EZM von Integrinen induziert sowie die Aktivität der Integrine moduliert werden (114). Die Ligandenbindung führt im Zellinneren u. a. zu einer Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK), die über das kleine

G-Protein RAS z. B. MAPK aktivieren und so das Zellverhalten beeinflussen kann. (144). Auch der PI3K/AKT-Signalweg sowie viele weitere Prozesse können durch Integrin-Ligandenbindung aktiviert werden (145). Durch ihre Interaktion mit der EZM und dem Zytoskelett sind Integrine funktionell äußerst wichtig für Migration, Adhäsion und Invasion der Zelle (143).

Integrine sind vielversprechende Angriffspunkte für medikamentöse Therapien. So werden beispielsweise schon erfolgreich monoklonale Antikörper gegen spezifische Integrine eingesetzt. Natalizumab wird als Anti- $\alpha 4$ -Integrin-Antikörper in der Therapie der Multiplen Sklerose verwendet (146). Bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen kann der $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-spezifische monoklonale Antikörper Vedolizumab eingesetzt werden (147). Integrin-*targeted therapies* sind auch Gegenstand aktueller onkologischer Forschung (144, 148).

Diese Arbeit befasst sich mit Integrin $\beta 1$ (ITGB1). Es ist das am häufigsten vorkommende β -Integrin mit vielen möglichen Kombinationsmöglichkeiten der $\beta 1$ -Kette mit unterschiedlichen α -Ketten ($\alpha 1-11$ sowie αV) (Abbildung 3) (144). An seiner intrazellulären Domäne weist ITGB1 einen sog. *Phospho-Switch* auf. Durch Phosphorylierung an T788/T789 kann die Aktivität des Integrins erhöht werden (149, 150).

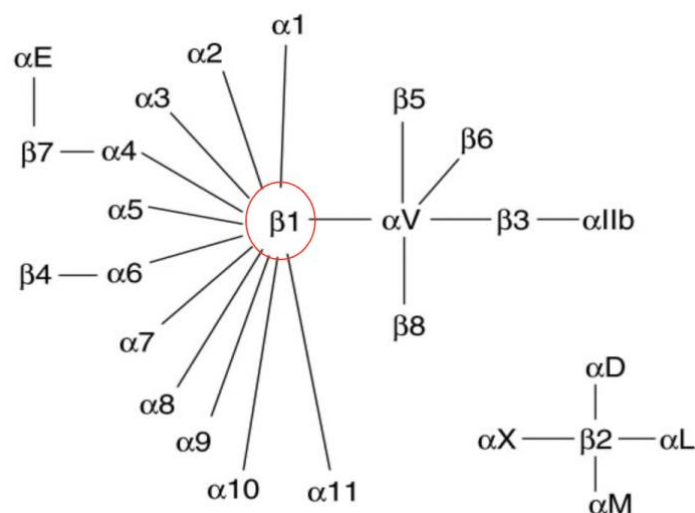


Abbildung 3: Kombinationsmöglichkeiten der α - und β -Ketten der heterodimeren Integrine

Modifiziert nach Takada et al. (2007)

2.3.1 Integrine und Endometriose

Da es sich bei Adhäsion und Migration um entscheidende Prozesse in der Pathogenese der Endometriose handelt, ist es sehr naheliegend, dass auch hier Integrine eine wichtige Rolle

spielen. Es konnte gezeigt werden, dass ITGB1 in ovariellen Endometrioseläsionen im Vergleich zu eutopem Endometrium verstärkt exprimiert wird. Interessanterweise konnte die Expression von ITGB1 durch Östrogenbehandlung zusätzlich gesteigert werden (151). Béliard et al. zeigten, dass insbesondere Integrin $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$ in ektopem Endometrium im Vergleich zu eutopen Endometrium verstärkt exprimiert werden (79). Das Integrin $\alpha v\beta 3$ kann bei Endometriosepatientinnen auch im eutopen Endometrium geringer exprimiert sein. Dieser Mangel an $\alpha v\beta 3$ korreliert mit geringeren Schwangerschaftsraten (152).

Tang et al. zeigten, dass das Adapterprotein Talin-1 (Aktivator der Integrine) sowohl in ektopem als auch im eutopem Endometrium von Endometriosepatientinnen im Vergleich zu gesunden Patientinnen verstärkt exprimiert wird. Die Herabregulation von Talin-1 in kultivierten Stromazellen führte zu verminderter Adhäsion, Invasion und Migration sowie zu einer verminderten Expression von Integrin $\beta 3$ (153). Choi et al. konnten zeigen, dass der *transforming growth factor* TGF- $\beta 1$ bewirkt, dass Endometriumzellen über die Integrine αv , $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ verstärkt an Mesothelzellen adhären – ein wichtiger Vorgang in der Entstehung von Endometriose (154).

Insgesamt häufen sich die Belege, dass die Erkrankung der Endometriose mit einer Dysregulation verschiedener Integrine vergesellschaftet ist und Integrine durch ihre entscheidende Funktion in der Adhäsion und Migration in der Pathogenese der Endometriose eine wichtige Rolle zukommt. Viele Fragen blieben allerdings weiterhin ungeklärt.

2.3.2 Integrine und CaSR

In Schilddrüsenkarzinomzellen konnte der Integrin-Inhibitor GRGDSP die durch den allosterischen Aktivator des CaSR NPS-R-568 induzierte gesteigerte Adhäsion und Migration zu einem großen Teil wieder aufheben. Dies zeigt, dass die über den CaSR vermittelte Adhäsion und Migration in diesem Fall zu einem großen Teil von Integrienen abhängt bzw. diese dabei eine wichtige Rolle spielen (145). Alqudah et al. konnten zeigen, dass die Behandlung von Mammakarzinomzellen mit dem CaSR-Inhibitor NPS-2143 (10 μ M, 48 h) mit einer reduzierten Expression von ITGB1 einhergeht. Dies bedeutet, dass über den CaSR auch die Expression von ITGB1 moduliert werden kann (155). Tharmalingam et. al beschrieben, dass der CaSR mit Integrienen funktionelle Komplexe bildet (156). Der mögliche Einfluss des CaSR auf ITGB1 in Endometriosezellen soll in dieser Arbeit erörtert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Substanzen

Tabelle 1: Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
Ampuwa Spüllösung (Aqua dest.)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
APS, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	Fresenius Kabi, Bad Homburg
BenchMark XP	Invitrogen, USA
BSA	Sigma-Aldrich, USA
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe
DMEM -HAM's F12	Bioconcept, Schweiz
DMEM/F12	Thermo Fisher Scientific, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, USA
DPBS	Thermo Fisher Scientific, USA
Enhanced Luminol Reagent	PerkinElmer Inc., USA
Ethanol absolute (99,8%)	AppliChem, Darmstadt
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, USA
Fetales Kälber-Serum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, USA
Glutamax	Thermo Fisher Scientific, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, USA
HEPES solution	Sigma-Aldrich, USA
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
MagicMark XP	Invitrogen, USA
NaOH	Merck, Darmstadt
NPS-2143 (CaSR-Inhibitor)	Tocris Bioscience, UK
Oxidizing Reagent	PerkinElmer Inc., USA
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma-Aldrich, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, USA
ROTI®-Block 10x Konzentrat	Carl Roth, Karlsruhe
ROTI®-Blot A 10x Konzentrat	Carl Roth, Karlsruhe

ROTI®-Blot K 10x Konzentrat	Carl Roth, Karlsruhe
ROTIPHORESE® 10x SDS-PAGE	Carl Roth, Karlsruhe
Sammelpuffer	Carl Roth, Karlsruhe
SDS-Lösung (10 %)	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Sigma-Aldrich, USA
Trenngelpuffer	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Triton® X 100	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich, USA
Tween20	Carl Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Aluminiumfolie	Paclan, Mönchengladbach
Einweghandschuhe Nitril	JOZA, MedNet, Münster
Einwegpipetten Cellstar®, serologisch (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
Pasteurpipetten, Glas	VWR® International, USA
Pipettenspitzen FilterTips, TipOne® (0,5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Polypropylenröhrchen (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
Zellkulturflaschen, Cellstar® (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten, Cellstar® (96-Well)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschalen, Cellstar® (100 mm x 20 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

3.1.3 Gebrauchsmaterialien

Tabelle 3: Gebrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Abwurfbehälter	Dahlhausen, Köln

Blotting Roller	Invitrogen, USA
Zellschaber	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht
Medizinischer Abfallbehälter	Infa Lentjes, Herdecke
Pipetten Eppendorf Research (0,5-10 µl, 1-100 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe, Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Pinzetten	Labotec, Wiesbaden
Scheren	Aesculap, Buchbach
Schutzbrille	Uvex, Fürth
Stoppuhr	TFA Dostmann, Wertheim
Transferpette® (0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Brand, Wertheim

3.1.4 Kit-Systeme

Tabelle 4: Kit-Systeme

Bezeichnung	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, USA
Western Lightning Plus-ECL Kit	PerkinElmer Inc., USA

3.1.5 Geräte

Tabelle 5: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Absaughilfe Vacuboy	Vaccubrand, Wertheim
Autoklav	Zirbus, Bad Grund
BIO-RAD Mini PROTEAN Tetra System	BIO-RAD, USA
BIO-RAD Trans-Blot Turbo (Blot-Kammer)	BIO-RAD, USA
CO ₂ -Inkubator Hera Cell 150	Thermo Fisher Scientific, USA
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
Magnet-/Heizrührer	Witeg, Wertheim
Mikroskop, Axiovert 200	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop, Leica DMIL LED	Leica, Schweiz
ProDesk 600 G3 MT Business-PC	HPInc., USA
Rollenschüttler Roller 6 digital	IKA, Staufen
Schüttel- und Mischgerät Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Sicherheitswerkbank Heraeus HeraSafe	Thermo Fisher Scientific, USA
Standard power Pack P25	Biometra, Göttingen
Thermoschüttler pro	Cellmedia GmbH und Co. KG, Zeitz
Thermostat 5320 Block Heater	Eppendorf, Hamburg
UV Lampe	Kendro Laboratory Products, Hanau
Vortex	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad AquaLine AL18	Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifuge 6K15	Sigma, Osterode

3.1.6 Medien und Puffer

Tabelle 6: Medien und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x Puffer C	20 mM Hepes 0,2 M NaCl 0,5 mM MgCl ₂ 0,4 mM EDTA 1 % Triton X-100
10x Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)	26 g Tris-HCl 4,24 g Tris 292,7 g NaCl 1 l Aqua dest.
1x ROTI®-Block	100 ml 10x ROTI®-Block 900 ml Aqua dest.
1x SDS Laufpuffer	100 ml ROTIPHORESE® 10x SDS-PAGE 900 ml Aqua dest.
1x Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20 (TBST)	100 ml 10x TBS 900 ml Aqua dest. 1 ml Tween20
Anodenpuffer	84 ml Aqua dest. 32 ml Ethanol 16 ml ROTI®-Blot A

CaCl ₂ - und FCS-reduziertes Kulturmedium (0,3 mM CaCl ₂ / 1% FCS)	30% DMEM/F12 (+1% P/S, 1% FCS) 70% DMEM-HAM'S F12 (+1% Glutamax, 1% P/S, 1% FCS)
CaCl ₂ -reduziertes/FCS-freies Kulturmedium (0,3 mM CaCl ₂ / 0% FCS)	30% DMEM/F12 (1% P/S) 70% DMEM-HAM'S F12 (1% Glutamax, 1% P/S)
Kathodenpuffer	84 ml Aqua dest. 32 ml Ethanol 16 ml ROTI®-Blot K
Kulturmedium (1,05 mM CaCl ₂ /10 % FCS)	500 ml DMEM/F12 50 ml FCS 5 ml P/S
Ladepuffer (6x)	350 mM Tris-HCl, 34,4 % Glycerol, 10 % SDS, 10 % β-Mercaptoethanol, 0,06 % Bromphenolblau, eingestellt auf einen pH-Wert von 6,8
Lysepuffer	500 µl Puffer C (10x) 50 µl Phosphatase-Inhibitor 50 µl Protease-Inhibitor 50 µl DTT 4350 µl Aqua dest.

3.1.7 Primärantikörper

Tabelle 7: Primärantikörper

p: phospho-/phosphospezifisch t: total/gesamt

Antikörper	Hersteller, Produktnummer	Klon	Organismus	Molekulargewicht des Targets
β-Aktin	Sigma Aldrich, USA A5441	AC-15	Mouse	42 kDa
p-AKT (T308)	Cell Signaling Technology, UK, 13038S	D25E6	Rabbit	60 kDa
t-AKT	Cell Signaling Technology, UK, 9272S	polyklonal	Rabbit	60 kDa
p-ERK1/2 MAPK (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology, UK, 9101S	polyklonal	Rabbit	42 kDa, 44 kDa
t-ERK1/2	Cell Signaling Technology, UK, 9102S	polyklonal	Rabbit	42 kDa, 44 kDa
p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling Technology, UK, 4511S	D3F9	Rabbit	43 kDa
t-p38 MAPK	Cell Signaling Technology, UK, 9212S	polyklonal	Rabbit	40 kDa

p-JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling Technology, UK, 4668S	81E11	Rabbit	46 kDa, 54 kDa
t-JNK	Cell Signaling Technology, UK, 9252S	polyklonal	Rabbit	46 kDa, 54 kDa
p-ITGB1 (Thr788/Thr789)	Invitrogen Thermo Fisher, USA, 44-872G	polyklonal	Rabbit	92 kDa
t-ITGB1	Cell Signaling Technology, UK, 34971	D6S1W	Rabbit	115 kDa, 135 kDa

3.1.8 Sekundärantikörper

Tabelle 8: Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller
Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako, Glostrup Dänemark
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	Dako, Glostrup Dänemark

3.1.9 Computerprogramme

Tabelle 9: Computerprogramme

Bezeichnung	Hersteller
AlphaView SA Version 3.4.0	ProteinSimple, San Jose USA
Microsoft Excel Version 2310	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Powerpoint Version 2310	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Word Version 2310	Microsoft Corporation, USA

3.1.10 Kontinuierliche Zelllinien

Tabelle 10: Kontinuierliche Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung
12Z (immortalisierte epitheliale Endometriosezellen)	Durch SV20-Virus-Infektion immortalisierte Zellen aus einer peritonealen roten Endometrioseläsion einer 37-jährigen Patientin. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Starzinski-Powitz (Goethe-Universität, Frankfurt am Main) (157).

3.2 Methoden

3.2.1. Zellkultur

3.2.1.1. Steriles Arbeiten

Alle Arbeiten an Zellen wurden stets unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt, um Kontaminationen zu verhindern. Die Werkbank wurde vor und nach Gebrauch sorgfältig mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Alle Materialien, die mit Zellen in Kontakt kamen, waren steril verpackte Einmalmaterialien oder wurden vor Benutzung autoklaviert bzw. unter einer UV-Lampe sterilisiert.

3.2.1.2. Kultivierung der Zelllinie 12Z

Die in Kultur befindlichen Zellen wurden stets in einem Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen kultiviert. Als Kulturmedium wurde DMEM/F12 mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) verwendet. Dieses wurde vor Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das Medium enthielt den pH-Indikator Phenolrot. Durch den Zellstoffwechsel und die dadurch resultierende Ansäuerung des Mediums verfärbt sich das rötliche Medium zunächst orange und dann gelblich. Spätestens wenn dieser Farbumschlag (nach ca. 72 Stunden) beobachtet wurde, wurde das Kulturmedium ausgetauscht. Dazu wurde das Medium vorsichtig mit einer Absaughilfe abgesaugt. Anschließend wurde der Zellrasen mit *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS) gewaschen. Nach Entfernen des DPBS wurde frisches Kulturmedium in die Zellkulturflasche gebracht.

Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig kontrolliert. Bei ca. 80%igem Bewuchs des Zellkulturflaschenbodens wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde das alte Medium verworfen und der Zellrasen mit DPBS gewaschen, um Zelltrümmer und Reste des Kulturmediums zu entfernen. Dann wurde der Zellrasen mit Trypsin bedeckt, um die adhärenen Zellen vom Flaschenboden sowie voneinander zu lösen. Die Wirkung von Trypsin wurde nach 1-2 Minuten durch die Zugabe von FCS-haltigem Kulturmedium beendet, um die Zellen vor dem toxischen Effekt des Trypsins zu schützen. Nach Bedarf wurde die Zellsuspension in neue Kulturflaschen aufgeteilt und diese mit Kulturmedium aufgefüllt (auf 5 ml (25 mm²-Kulturflasche) bzw. 12 ml (75 mm²-Kulturflasche)).

3.2.1.3. Kryokonservierung und Rekultivierung

Wenn Zellen nicht weiter in Kultur benötigt wurden, wurden sie kryokonserviert. Zur Kryokonservierung wurde zunächst das bestehende Kulturmedium abgesaugt, um dann den Zellrasen mit DPBS zu waschen und anschließend mit Trypsin zu lösen. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 4 Minuten bei 300 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde in 1 ml Kulturmedium mit 10% DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 1,2 ml Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde in eine Isopropylalkohol-Gefrierdose überführt, darin für 24 Stunden bei -80 °C gelagert und dann in einen Stickstofftank überführt.

Wurden neue Zellen benötigt, wurden Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und rekultiviert. Dafür wurde die Zellsuspension im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, mit 1 ml Kulturmedium verdünnt und 5 Minuten bei 300 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit Kulturmedium resuspendiert. Die Suspension wurde in eine 25 mm²-Zellkulturflasche gebracht, die mit weiteren 4 ml Kulturmedium gefüllt wurde.

3.2.1.4. Behandlung der Zellen

Die Behandlungsbedingungen, speziell Behandlungsdauer und Konzentration von CaCl₂ und NPS-2143, basieren auf der Dissertation von Katharina Nees (8). Die in dieser Arbeit verwendete CaCl₂-Konzentration von 5 mM entspricht etwa der doppelten Gesamtcalcium-Serumkonzentration und bewirkte bei einer 30-minütigen Behandlung der 12Z-Zellen eine erhöhte Zellproliferation sowie Zellmigration. Die verwendete NPS-2143-Konzentration von 4,3 µM entspricht dem 100-fachen des IC₅₀-Wertes. Diese Konzentration erwies sich in der Arbeit von Elisa Vacca an Ovarialkarzinomzellen (nicht veröffentlichte Daten) als ideal, da die Viabilität nach Behandlung mit NPS-2143 im Vergleich zur Kontrolle nur minimal reduziert war. Dies konnte in der Arbeit von Katharina Nees für die 12Z-Zellen bestätigt werden.

Vor der eigentlichen Behandlung der Zellen wurden diese in Zellkulturschalen (100 mm x 20 mm) ausgesät. Pro Schale wurden 2 Millionen Zellen ausgesät. Die Zellzahl wurde mittels *LUNA™ Automated Cell Counter* bestimmt. Nach 2 Tagen waren die Zellen zu ca. 75% konfluent. Dann wurde das bisher verwendete Kulturmedium (1,05 mM Calcium, 10% FCS) durch ein Calcium- und FCS-reduziertes Medium (0,3 mM Calcium, 1% FCS) ersetzt. Das alte Medium wurde abgesaugt, der Zellrasen mit DPBS gewaschen und anschließend das Calcium- und FCS-reduzierte Medium aufgebracht.

Nach 24 Stunden wurde die Behandlung durchgeführt (Tabelle 11). Die für die jeweilige Behandlung verwendete Substanz wurde in Calcium-reduziertem (0,3 mM) und FCS-freiem Kulturmedium gelöst.

Vor der Behandlung wurde das FCS- und Calcium-reduzierte Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen kurz mit DPBS gewaschen. Danach wurde die Behandlungslösung (die jeweilige Substanz in Calcium-reduziertem-/FCS-freiem Medium) aufgebracht (Tabelle 11). Die Kontrollgruppe wurde für 1 Stunde mit 0,05% DMSO behandelt. Dies entspricht der DMSO-Konzentration der NPS-2143-Stammlösung. Die Calciumbehandlung wurde für 30 Minuten mit 5 mM CaCl₂ durchgeführt. Die Kombinationsbehandlung mit CaCl₂ und NPS wurde zunächst für 30 Minuten mit 4,3 µM NPS-2143 durchgeführt, nach 30 Minuten wurde CaCl₂ hinzugefügt,

sodass weitere 30 Minuten zusätzlich mit 5 mM CaCl₂ inkubiert wurde. Die NPS-Behandlung wurde für 1 Stunde mit 4,3 µM NPS-2143 durchgeführt. Für die Dauer der Behandlungen wurden die Zellen weiterhin bei 37 °C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. An die Behandlung wurde die Proteinextraktion unmittelbar angeschlossen.

Tabelle 11: Behandlung der Zellen mit CaCl₂ und/oder NPS-2143

	DMSO für 1h	CaCl₂ für 30 min	NPS-2143 für 1h
Kontrolle	0,05 %	-	-
CaCl₂	-	5 mM	-
CaCl₂ + NPS-2143	-	5 mM	4,3 µM
NPS-2143	-	-	4,3 µM

3.2.2. Proteinanalyse

3.2.2.1. Proteinextraktion

Die Zellen wurden mit 10 ml kaltem DPBS gewaschen. Zum Ernten der Zellen wurden erneut 10 ml kaltes DPBS in die Zellschale gegeben und der Zellrasen mit einem Zellschaber abgelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 4 °C und 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde mit 500 µl Lysepuffer resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und zwischenzeitlich gevortext. Im Anschluss wurde das Lysat für 10 Minuten bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Dafür wurden Aliquots von 30-50 µl in 0,5 ml Reaktionsgefäßen hergestellt, um häufiges Auftauen und die damit verbundene Degradierung der Proteine zu verhindern.

3.2.2.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinextrakte erfolgte mit Hilfe eines BCA-Kitsystems:

In alkalischem Medium erfolgt die Reduktion von zweiwertigen zu einwertigen Kupferionen durch Proteine (sog. Biuret-Reaktion). Die außerdem enthaltene Bicinchoninsäure (BCA) bildet dann blau-violette Komplexe mit den einwertigen Kupferionen. Diese Komplexe absorbieren linear Licht der Wellenlänge 562 nm. Die Extinktion durch diese Komplexe wird dann photometrisch bei 562 nm Wellenlänge im ELISA-Reader gemessen. Die Extinktion bei 562 nm ist dabei proportional zur Proteinmenge in der Lösung. Je höher die Extinktion, desto höher ist also die Proteinkonzentration.

Zum Kalibrieren der Messung wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA angesetzt. Es wurden je 75 µl aus der Verdünnungsreihe bzw. 75 µl der 1:5 verdünnten Probe (15 µl der Probe mit 60 µl destilliertem Wasser (Aqua dest.)) mit 600 µl der im Kitsystem enthaltenen Reaktionslösung (Lösung A und B wurden 50:1 gemischt) und davon 3 Mal 200 µl auf eine 96-Wellplatte aufgetragen. Die 96-Wellplatte wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend die Extinktion bei 562 nm Wellenlänge im ELISA-Reader gemessen. Anhand der Verdünnungsreihe und der daraus gebildeten Standardreihe konnte mit Hilfe von *Excel* die genaue Proteinkonzentration der Proteinextrakte berechnet werden.

3.2.2.3. SDS-PAGE

Die Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld anhand ihres Molekulargewichts. Die Proteine werden durch Aufkochen denaturiert. Das Detergens SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine, sodass alle Proteine negativ geladen sind und in die gleiche Richtung (zum Plus-Pol) wandern. Im elektrischen Feld wandern kleinere Proteine weiter durch das Polyacrylamidgel als größere Proteine, sodass eine Auftrennung nach Molekulargewicht erfolgen kann.

Es wurde ein 10%iges Trenngel sowie ein 4%iges Sammelgel nach folgendem Pipettierschema vorbereitet:

Tabelle 12: Pipettierschema SDS-PAGE für 2 Gele

Substanz	Trenngel (10% Acrylamid)	Sammelgel (4% Acrylamid)
Aqua dest.	3,8 ml	3,4 ml
Acrylamid (30%)	3,4 ml	0,83 ml
Trenngelpuffer	2,6 ml	-
Sammelgelpuffer	-	0,63 ml
SDS (10%)	100 µl	50 µl
APS	100 µl	50 µl
TEMED	4 µl	5 µl

Die Vorrichtung zum Gießen der Gele wurde aufgebaut: zwei Glasscheiben wurden in eine Halterung eingespannt und die so entstandene Gelkammer auf Dichtigkeit überprüft. Die Gele wurden pipettiert (Tabelle 12). Zu beachten war, dass durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) die Polymerisation beginnt und das Gel zügig eingegossen werden muss. Zunächst wurden 4,5 ml Trenngel in

die Gelkammer eingegossen und mit 1 ml Ethanol bedeckt, um die Oberfläche zu glätten und ihre Oxidierung zu vermeiden. Nach 30 Minuten wurde das Ethanol abgegossen und nach einigen Minuten der Verdunstung des verbliebenen Ethanols wurde die Gelkammer mit Sammelgel aufgefüllt. Es wurde ein Plastikamm eingesetzt, durch den die Geltaschen gebildet wurden. Es wurde ein 10er-Kamm für Taschen des Volumens 25 µl bzw. ein 15er-Kamm für Taschen des Volumens 15 µl verwendet. Die vollständige Polymerisation wurde weitere 30 Minuten abgewartet. Die Gele wurden sofort verwendet oder 1-2 Tage bei 7 °C gelagert.

Vor Beginn der SDS-PAGE wurden die Kämmе gezogen, die Gele in die SDS-PAGE-Apparatur eingespannt und die Apparatur mit SDS-Laufpuffer befüllt. Es wurde darauf geachtet, dass auch die Geltaschen vollständig mit SDS-Laufpuffer befüllt sind.

Die Proteinextrakte wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 2-fachem Ladepuffer versetzt. Die Zusammensetzung von Proteinextrakt und Ladepuffer wurde je nach benötigter Proteinmenge (Tabelle 13), Konzentration der Probe und zur Verfügung stehendem Volumen der Geltaschen berechnet. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Anteil des Ladepuffers mindestens 1/6 des Gesamtvolumens beträgt. Das im Ladepuffer enthaltene dichtere Glycerol sichert das Absinken der Probe in die Tasche. Der Ladepuffer stabilisiert den pH-Wert der Proteinproben und enthält den Farbstoff Bromphenolblau, der das Arbeiten mit der Probe durch bessere Sichtbarkeit beim Pipettieren vereinfacht und im Verlauf der SDS-PAGE als Lauffront sichtbar bleibt. β-Mercaptoethanol spaltet die Disulfidbrücken der Proteine.

Tabelle 13: Verwendete Proteinmenge in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper

Verwendeter Antikörper	Verwendete Proteinmenge in µg
p-AKT	20
t-AKT	20
p-p38	30
t-p38	20
p-ERK1/2	20
t-ERK1/2	20
p-JNK	90
t-JNK	50
p-ITGB1	70
t-ITGB1	30

Nachdem die Probenextrakte mit Ladepuffer angesetzt waren, wurden sie entweder bis zur Verwendung am selben Tag auf Eis gelagert oder über Nacht bei -20°C gelagert, am nächsten

Tag auf Eis aufgetaut und dann verwendet. Vor der SDS-PAGE wurden die Proben zunächst für 10 Minuten bei 4°C und 600 rpm geschüttelt, um eine optimale Durchmischung von Protein und Ladepuffer zu erreichen. Dann wurden die Proben für 10 Minuten bei 95°C aufgeköcht und anschließend für 5 Minuten auf Eis gekühlt und kurz zentrifugiert.

Die vorbereiteten Proben wurden dann nach dem gewünschten Schema in die Geltaschen pipettiert. In die erste Tasche eines jeden Gels wurden 3 µl *MagicMark XP* (Proteingrößenmarker, der detektiert werden kann) sowie 5 µl *BenchMark XP* (Proteingrößenmarker, der während der SDS-PAGE sichtbar ist) pipettiert. Nach dem Pipettieren aller Proben wurde erneut der Füllstand des SDS-Laufpuffers sowie die korrekte Polung der elektrischen Kontakte kontrolliert.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst bei 75 V bis die Lauffront das Trenngel erreicht hatte. Dann wurde die Spannung auf 125 V erhöht. Das Gerät wurde abgeschaltet, sobald die Lauffront am Ende des Trenngels angekommen war. Die Glasscheiben wurden vorsichtig ihren Halterungen entnommen.

3.2.2.4. Western-Blot

Beim Western-Blot (*semi dry blot*) wurden die durch die SDS-PAGE nach Molekulargewicht getrennten Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) transferiert. Die Blot-Kammer wurde vorbereitet: die Anodenseite der Apparatur wurde mit Anodenpuffer benetzt und sechs in Anodenpuffer getränkte Filterpapiere auf der Anode platziert. Die Kathodenseite der Apparatur wurde mit Kathodenpuffer benetzt und sechs in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere auf der Kathode platziert. Die PVDF-Membran wurde zugeschnitten, in Ethanol aktiviert, in Aqua dest. gewaschen und schließlich in Anodenpuffer äquilibriert. Das Polyacrylamidgel wurde vorsichtig den Glasscheiben entnommen und auf der PVDF-Membran positioniert. Die PVDF-Membran und das Gel wurden dann zwischen Anode und Kathode bzw. zwischen den getränkten Filterpapieren positioniert und in die Apparatur eingespannt. Das Transferieren der Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran erfolgte bei 25 V für 30 Minuten.

3.2.2.5. Antikörperinkubation

Nachdem die Membranen der Blot-Kammer entnommen worden waren, wurden sie für eine Stunde in 5% BSA- bzw. 5% Milchpulver-Lösung (jeweils analog zur Antikörperlösung) geblockt, um freie Bindungsstellen zu blockieren, sodass das unspezifische Binden der Antikörper auf der Membran in den späteren Schritten minimiert wurde.

Die Verdünnungen der Primärantikörper (Tabelle 14) erfolgte in 50 ml-Reaktionsgefäßen, in die die Membranen nach der Blockierung eingelegt wurden. Dabei war die Oberseite der Membran ins Innere des Reaktionsgefäßes gerichtet. Die Membranen wurden dann in ihren

Antikörper-enthaltenden Reaktionsgefäßen waagrecht auf einem Rollenschüttler bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Tabelle 14: Ansätze der Primärantikörper und Sekundärantikörper

5% BSA-Lösung = 5% BSA in 1x TBST

5% Milchpulver-Lösung = 5% Milchpulver in 1x TBST

Primärantikörper	Sekundärantikörper
p-AKT 1:1000 in 5% BSA-Lösung	Anti-Rabbit 1:2000 in 5% BSA-Lösung
t-AKT 1:1000 in 5% BSA-Lösung	Anti-Rabbit 1:2000 in 5% BSA-Lösung
p-p38 1:1000 in 5% BSA-Lösung	Anti-Rabbit 1:2000 in 5% BSA-Lösung
t-p38 1:1000 in 5% BSA-Lösung	Anti-Rabbit 1:2000 in 5% BSA-Lösung
p-ERK1/2 1:1000 in 5% BSA-Lösung	Anti-Rabbit 1:2000 in 5% BSA-Lösung
t-ERK1/2 1:1000 in 5% BSA-Lösung	Anti-Rabbit 1:2000 in 5% BSA-Lösung
p-JNK 1:500 in 5% BSA-Lösung	Anti-Rabbit 1:3000 in 5% BSA-Lösung
t-JNK 1:500 in 5% BSA-Lösung	Anti-Rabbit 1:2000 in 5% BSA-Lösung
p-ITGB1 1:500 in 5% Milchpulverlösung	Anti-Rabbit 1:3000 in 5% Milchpulver-Lösung
t-ITGB1 1:1000 in 5% BSA-Lösung	Anti-Rabbit 1:2000 in 5% BSA-Lösung
β-Aktin 1:2000 in ROTI®-Block	Anti-Mouse 1:2000 in ROTI®-Block

Lösungen der phosphospezifischen Primärantikörper wurden bis zu 3-mal verwendet, eine Ausnahme stellte p-JNK dar: dieser Antikörper konnte auf Grund seiner hohen Empfindlichkeit nur einmal verwendet werden. Alle anderen Antikörper wurden bis zu 5-mal verwendet. Die Antikörperlösungen wurden dafür nach Benutzung bei -20 °C gelagert und vor erneuter Benutzung langsam auf Eis aufgetaut.

Am nächsten Tag wurden die Membranen mit 1x TBST gewaschen: dreimalig 5 Minuten, wenn mit einem phosphospezifischen Antikörper inkubiert wurde; dreimalig 10 Minuten bei nicht-phosphospezifischen Antikörpern. Danach folgte die Inkubation des sekundären Antikörpers (Tabelle 14) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Es folgte wieder ein dreimaliger Waschschrift mit 1x TBST.

Als Ladekontrollen wurde β-Aktin verwendet. Nach der Antikörperdetektion (s. u.) wurden zunächst die an der Membran gebundenen Antikörper entfernt (*Stripping*). Dafür wurden die Membranen in drei Schritten gewaschen: 5 Minuten in Aqua dest., 20 Minuten in NaOH (0,2 M), 5 Minuten in Aqua dest. Die Membranen wurden für 1 Stunde in ROTI®-Block bei Raumtemperatur auf der Schüttelplatte geblockt und anschließend über Nacht bei 4 °C auf dem Rollenschüttler in 1:2000 in ROTI®-Block verdünntem Anti-β-Aktin-Antikörper inkubiert.

Als sekundärer Antikörper wurde 1:2000 verdünnter Anti-Mouse-Antikörper konjugiert mit HRP in ROTI®-Block verwendet.

3.2.1.1 Antikörperdetektion

Die Membranen wurden mit einer 1:1 gemischten Lösung aus Luminolreagenz und Oxidationsmittel aus dem Chemilumineszenz *Western Lightning Plus-ECL Kit* für 1 Minute in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei transparente Folien gelegt. Luftblasen und überschüssige Flüssigkeit wurden mit Hilfe eines Papiertuchs herausgedrückt.

Die Membranen wurden in den *FluorChem E Detektor* eingelegt und die Belichtung gestartet. Das Gerät legt die Belichtungsdauer in Abhängigkeit von der Signalintensität automatisch fest. In der Regel lag diese zwischen 40 Sekunden und 5 Minuten.

Am sekundären Antikörper ist HRP (*horseradish peroxidase*) gebunden, mit dem das Luminolreagenz zu aktiviertem Luminol oxidiert, wobei Licht emittiert wird. Dieses Lichtsignal wird vom Gerät detektiert. Die Intensität des Lichtsignals spiegelt also die Menge des gesuchten Proteins auf der Membran wider.

Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit dem Programm *AlphaView SA*. Die Normalisierung der Signalintensität der Banden des gesuchten Proteins erfolgte durch die Verrechnung mit Signalintensität der zugehörigen Bande der Ladekontrolle. Die Intensität der Bande der Kontrollgruppe wurde als 100% definiert, die Intensitäten der anderen Banden wurden im Verhältnis dazu angegeben.

3.2.3. Statistische Auswertung

Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Als Programm zur statistischen Auswertung wurde Microsoft Excel verwendet. Zur Berechnung der Signifikanz wurde ein *student's t-test* durchgeführt, wobei eine statistische Signifikanz bei einem p-Wert <0,05 angenommen wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von DMSO auf untersuchte Signalwege

In den ab 4.2. dargestellten Versuchen wurden die Zellen als Kontrolle entsprechend der DMSO-Konzentration der NPS-2143-Behandlung mit 0,05% DMSO behandelt. Es wurde zunächst durch SDS-PAGE und Western-Blot überprüft, ob DMSO einen Einfluss auf die Expression von p-AKT, p-ERK1/2, p-p38 und p-JNK hat. Hierbei zeigten sich keine relevanten Unterschiede in der Expression von p-AKT, p-ERK1/2, p-p38 und p-JNK nach Behandlung mit 0,05% sowie 0,5% DMSO im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 3). Ebenso zeigten sich keine relevanten Unterschiede in der Expression von p-AKT, p-ERK1/2, p-p38 und p-JNK nach alleiniger Calciumbehandlung und Calciumbehandlung mit 0,5% DMSO (Abbildung 4).

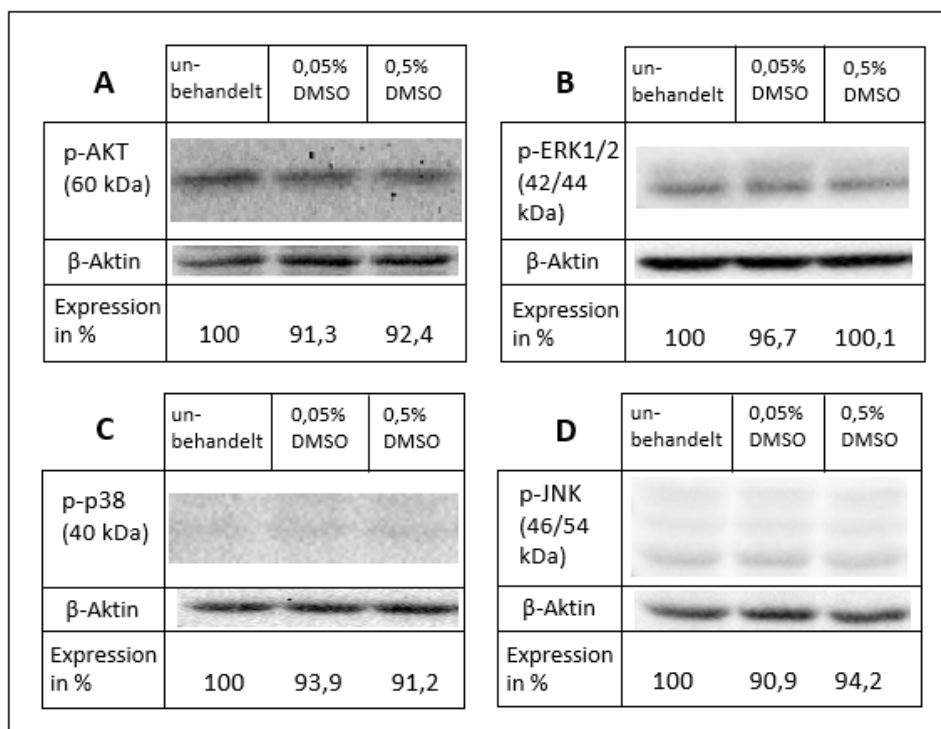


Abbildung 4: Expression von p-AKT, p-ERK1/2, p-p38 und p-JNK in 12Z-Zellen in Abhängigkeit von unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen

Untersucht wurde die Expression von p-AKT, p-ERK1/2, p-p38 und p-JNK in 12Z-Zellen durch SDS-PAGE und Western-Blot nach 30-minütiger Behandlung mit 0,05% und 0,5% DMSO im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, die als 100% definiert wurde. Es wurde auf die Ladekontrolle β-Aktin (Anti-β-Aktin 1:2000 in ROTI®-Block sowie HRP-konjugierter Anti-Mouse-Antikörper 1:2000 in ROTI®-Block) normiert. Alle weiteren Antikörper wurden in 5% BSA in 1x TBST verdünnt. Es wurde ein 10%iges Polyacrylamidgel verwendet.

A: 20 µg Protein, Anti-p-AKT-Antikörper 1:1000, HRP-konjugierter Anti-Rabbit-Antikörper 1:2000. **B:** 20 µg Protein, Anti-p-ERK1/2-Antikörper 1:1000, HRP-konjugierter Anti-Rabbit-Antikörper 1:2000. **C:** 30 µg Protein. Anti-p-p38-Antikörper 1:1000, HRP-konjugierter Anti-Rabbit-Antikörper 1:2000. **D:** 70 µg Protein, Anti-p-JNK-Antikörper 1:500, HRP-konjugierter Anti-Rabbit-Antikörper 1:3000.

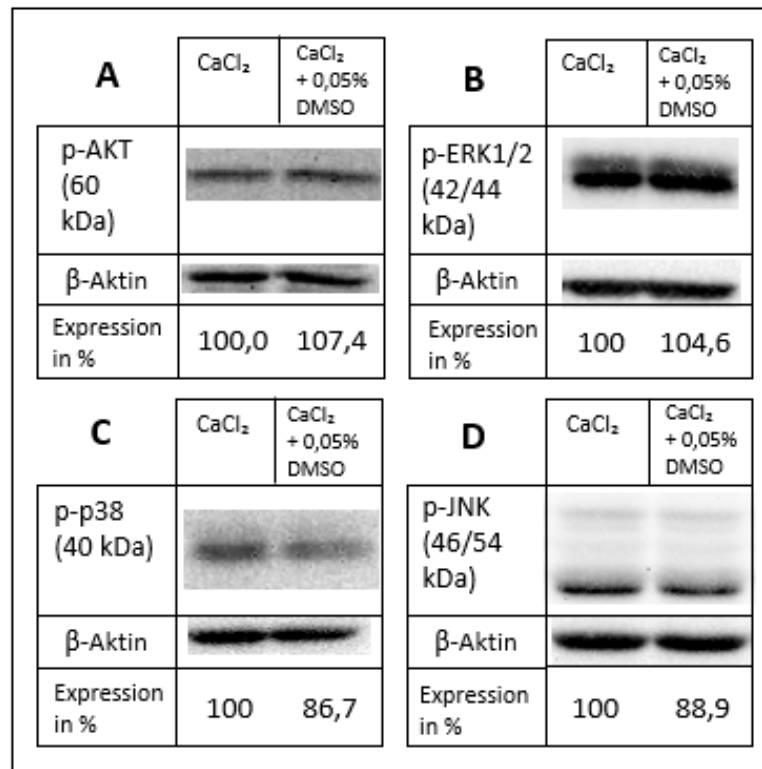


Abbildung 5: Expression von p-AKT, p-ERK1/2, p-p38 und p-JNK in 12Z-Zellen nach Calciumchlorid (CaCl₂)-Behandlung in Abhängigkeit von DMSO

Untersucht wurde die Expression von p-AKT, p-ERK1/2, p-p38 und p-JNK in 12Z-Zellen durch SDS-PAGE und Western-Blot nach 30-minütiger Behandlung mit 5 mM CaCl₂ und 5 mM CaCl₂ mit 0,05% DMSO. Es wurde auf die Ladekontrolle β-Aktin (Anti-β-Aktin 1:2000 in ROTI®-Block sowie HRP-konjugierter Anti-Mouse-Antikörper 1:2000 in ROTI®-Block) normiert und die Expression nach alleiniger Calciumbehandlung als 100% definiert. Alle weiteren Antikörper wurden in 5% BSA in 1x TBST verdünnt. Es wurde ein 10%iges Polyacrylamidgel verwendet.

A: 20 µg Protein, Anti-p-AKT-Antikörper 1:1000, HRP-konjugierter Anti-Rabbit-Antikörper 1:2000. **B:** 20 µg Protein, Anti-p-ERK1/2-Antikörper 1:1000, HRP-konjugierter Anti-Rabbit-Antikörper 1:2000. **C:** 30 µg Protein. Anti-p-p38-Antikörper 1:1000, HRP-konjugierter Anti-Rabbit-Antikörper 1:2000. **D:** 70 µg Protein, Anti-p-JNK-Antikörper 1:500, HRP-konjugierter Anti-Rabbit-Antikörper 1:3000.

4.2 Expression und Aktivität von AKT

Die 12Z-Zellen zeigten nach Calciumbehandlung eine signifikante Aktivitätssteigerung ($p=0,046$) von AKT (Phosphorylierung an T308) auf Proteinebene auf 454% (Abbildung 5). Die zusätzliche Behandlung mit dem Inhibitor des CaSR NPS-2143 hob diesen Effekt vollständig wieder auf (107%). Das Aktivitätsniveau von AKT nach alleiniger NPS-2143-Behandlung entsprach dem Aktivitätsniveau der Kontrolle. Die Expression von total-AKT (t-AKT) blieb auch unter Behandlung mit Calcium und/oder NPS-2143 etwa konstant.

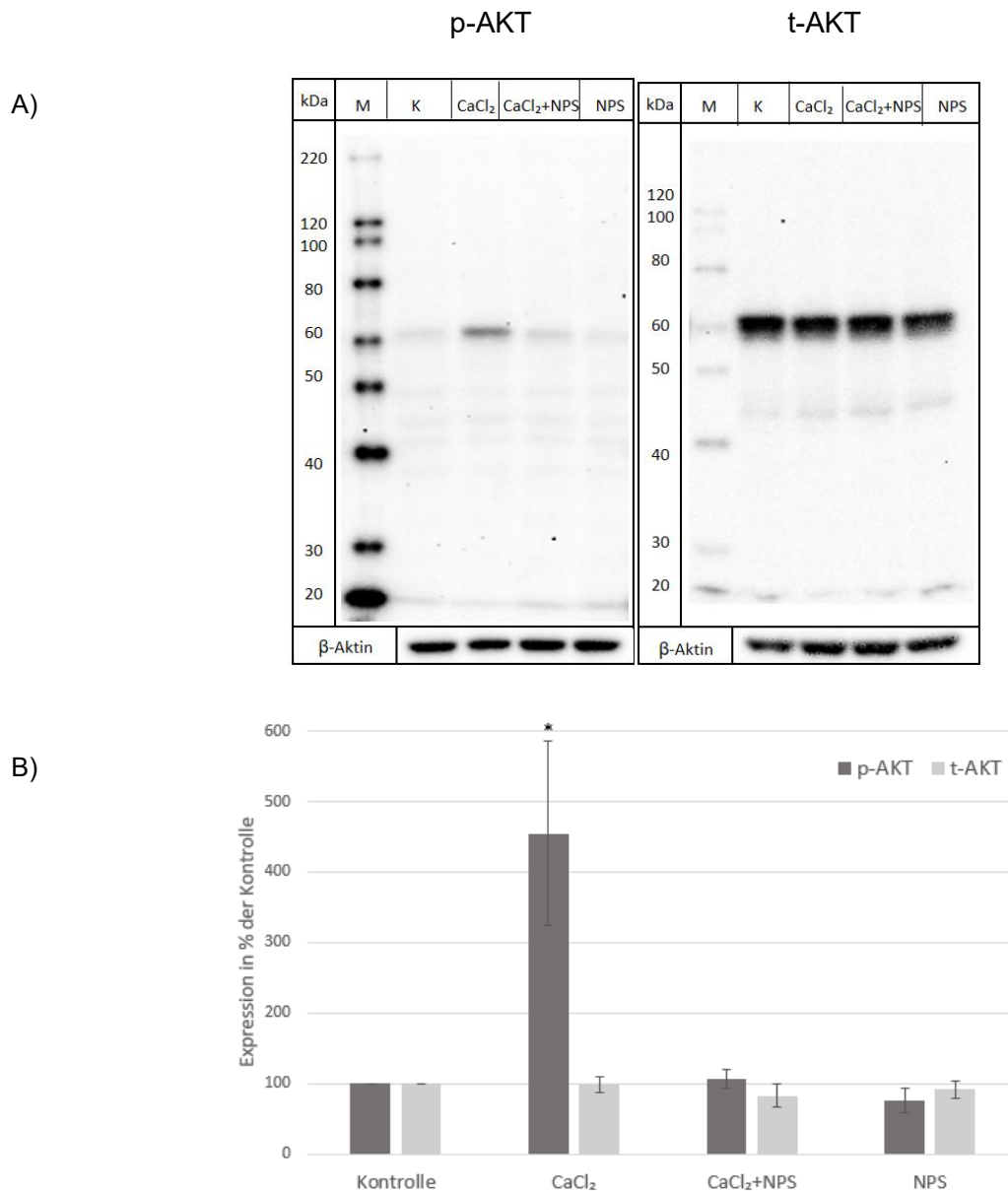


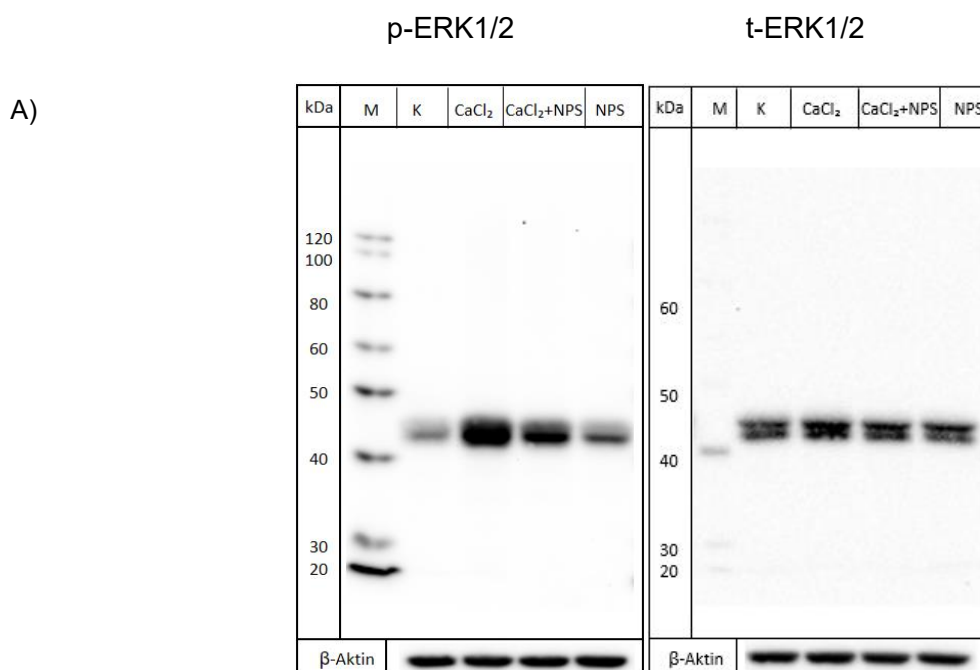
Abbildung 6: Expression und Aktivität von AKT (Phosphorylierung an T308) in 12Z-Zellen unter Einfluss von Calciumchlorid (CaCl₂) und NPS-2143 (NPS)

Untersucht wurde die Expression von total-AKT (t-AKT) und p-AKT in 12Z-Zellen im Western-Blot nach Auftrennung durch SDS-PAGE nach 5 mM CaCl₂-Behandlung (30 min), 5 mM CaCl₂

(30 min)- und 4,3 μ M NPS-2143 (1 h)-Kombinationsbehandlung und 4,3 μ M NPS-2143-Behandlung (1 h) im Vergleich zur Kontrolle (K). Für die SDS-PAGE wurden pro Tasche eines 10%igem-Polyacrylamidgels 20 μ g Protein aufgetragen. **A)** Als Primärantikörper wurde Anti-p-AKT-Antikörper sowie Anti-t-AKT-Antikörper 1:1000 in 5% BSA in 1x TBST verwendet, als Sekundärantikörper HRP-konjugierter Anti-Rabbit-Antikörper 1:2000 in 5% BSA in 1x TBST. Als Ladekontrolle wurde Anti- β -Aktin 1:2000 in ROTI[®]-Block sowie HRP-konjugierter Anti-Mouse-Antikörper 1:2000 in ROTI[®]-Block verwendet. Das Molekulargewicht des Zielproteins in kDa wurde anhand eines Proteinstandard-Markers (M) visualisiert. **B)** Die ermittelten Expressionen wurden auf die Ladekontrolle β -Aktin normiert und in Bezug auf die Kontrolle in % angegeben. Angegeben sind die Mittelwerte als Balken sowie die Standardabweichungen als Fehlerbalken aus drei unabhängigen Versuchen. Das Signifikanzniveau wurde mit Hilfe eines Student's t-Tests berechnet und $p < 0,05$ mit (*) als signifikant angegeben.

4.3 Expression und Aktivität von ERK1/2

Die 12Z-Zellen zeigten nach Calciumbehandlung eine signifikante Aktivitätssteigerung ($p=0,036$) von ERK1/2 (Phosphorylierung an Thr202/Tyr204) auf Proteinebene um 282% (Abbildung 6). Die zusätzliche Behandlung mit dem Inhibitor des CaSR, NPS-2143 halbierte diesen Effekt (194% im Vergleich zur Kontrolle, $p=0,048$). Dieser Effekt von NPS-2143 war im Vergleich zur reinen Calciumbehandlung nicht signifikant ($p=0,0555$). Das Aktivitätsniveau von ERK1/2 nach alleiniger NPS-2143-Behandlung entsprach etwa dem Aktivitätsniveau der Kontrolle (108%). Die Expression von total-ERK1/2 (t-ERK1/2) blieb auch unter Behandlung mit Calcium und/oder NPS-2143 etwa konstant.



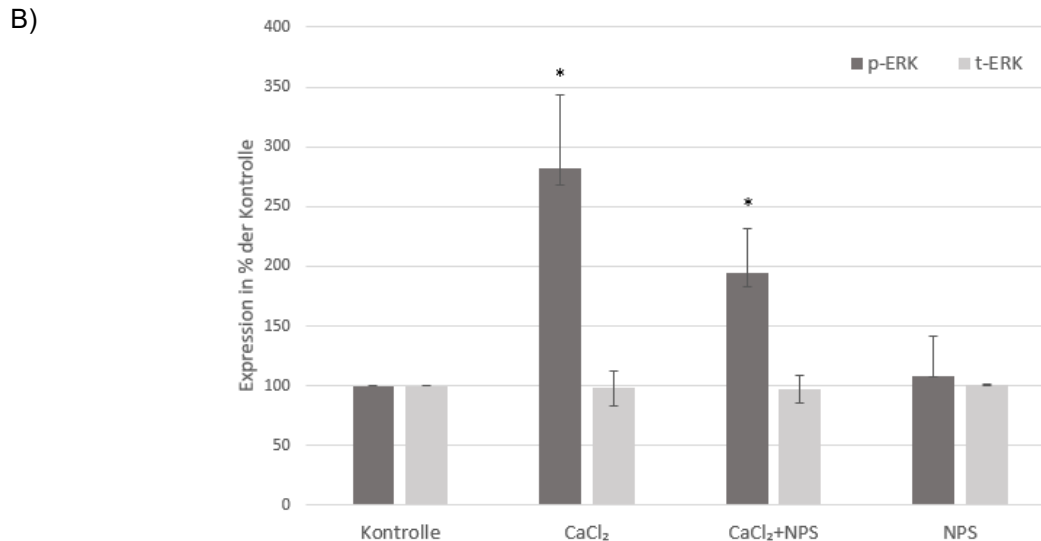


Abbildung 7: Expression und Aktivität von ERK1/2 (Phosphorylierung an Thr202/Tyr204) in 12Z-Zellen unter Einfluss von Calciumchlorid (CaCl₂) und NPS-2143 (NPS)

Untersucht wurde die Expression von total-ERK1/2 (t-ERK1/2) und p-ERK1/2 in 12Z-Zellen im Western-Blot nach Auftrennung durch SDS-PAGE nach 5 mM CaCl₂-Behandlung (30 min), 5 mM CaCl₂ (30 min)- und 4,3 μM NPS-2143 (1 h)-Kombinationsbehandlung und 4,3 μM NPS-2143-Behandlung (1 h) im Vergleich zur Kontrolle (K). Für die SDS-PAGE wurden pro Tasche eines 10%igem-Polyacrylamidgels 20 μg Protein aufgetragen. **A)** Als Primärantikörper wurde Anti-p-ERK-Antikörper sowie Anti-t-ERK-Antikörper 1:1000 in 5% BSA in 1x TBST verwendet, als Sekundärantikörper HRP-konjugierter Anti-Rabbit-Antikörper 1:2000 in 5% BSA in 1x TBST. Als Ladekontrolle wurde Anti-β-Aktin 1:2000 in ROTI®-Block sowie HRP-konjugierter Anti-Mouse-Antikörper 1:2000 in ROTI®-Block verwendet. Das Molekulargewicht des Zielproteins in kDa wurde anhand eines Proteinstandard-Markers (M) visualisiert. **B)** Die ermittelten Expressionen wurden auf die Ladekontrolle β-Aktin normiert und in Bezug auf die Kontrolle (K) in % angegeben. Angegeben sind die Mittelwerte als Balken sowie die Standardabweichungen als Fehlerbalken aus drei unabhängigen Versuchen. Das Signifikanzniveau wurde mit Hilfe eines Student's t-Tests berechnet und p < 0,05 mit (*) als signifikant angegeben.

4.4 Expression und Aktivität von p38

Die 12Z-Zellen zeigten nach Calciumbehandlung eine Steigerung des Aktivitätsniveaus von p38 (Phosphorylierung an Thr180/Tyr182) auf Proteinebene, jedoch ohne Signifikanz (p=0,237) mit hoher Standardabweichung von 191,5 %. (Abbildung 7). Die zusätzliche Behandlung mit dem Inhibitor des CaSR NPS-2143 hob diesen Effekt im Mittel wieder auf, allerdings ebenfalls mit breiter Streuung. Das Aktivitätsniveau von p38 nach alleiniger NPS-

2143-Behandlung war im Mittel leicht erniedrigt (77,8%) im Vergleich zum Aktivitätsniveau der Kontrolle, allerdings mit großen Abweichungen ohne Signifikanz ($p=0,402$). Die Expression von total-p38 (t-p38) blieb auch unter Behandlung mit Calcium und/oder NPS-2143 etwa konstant.

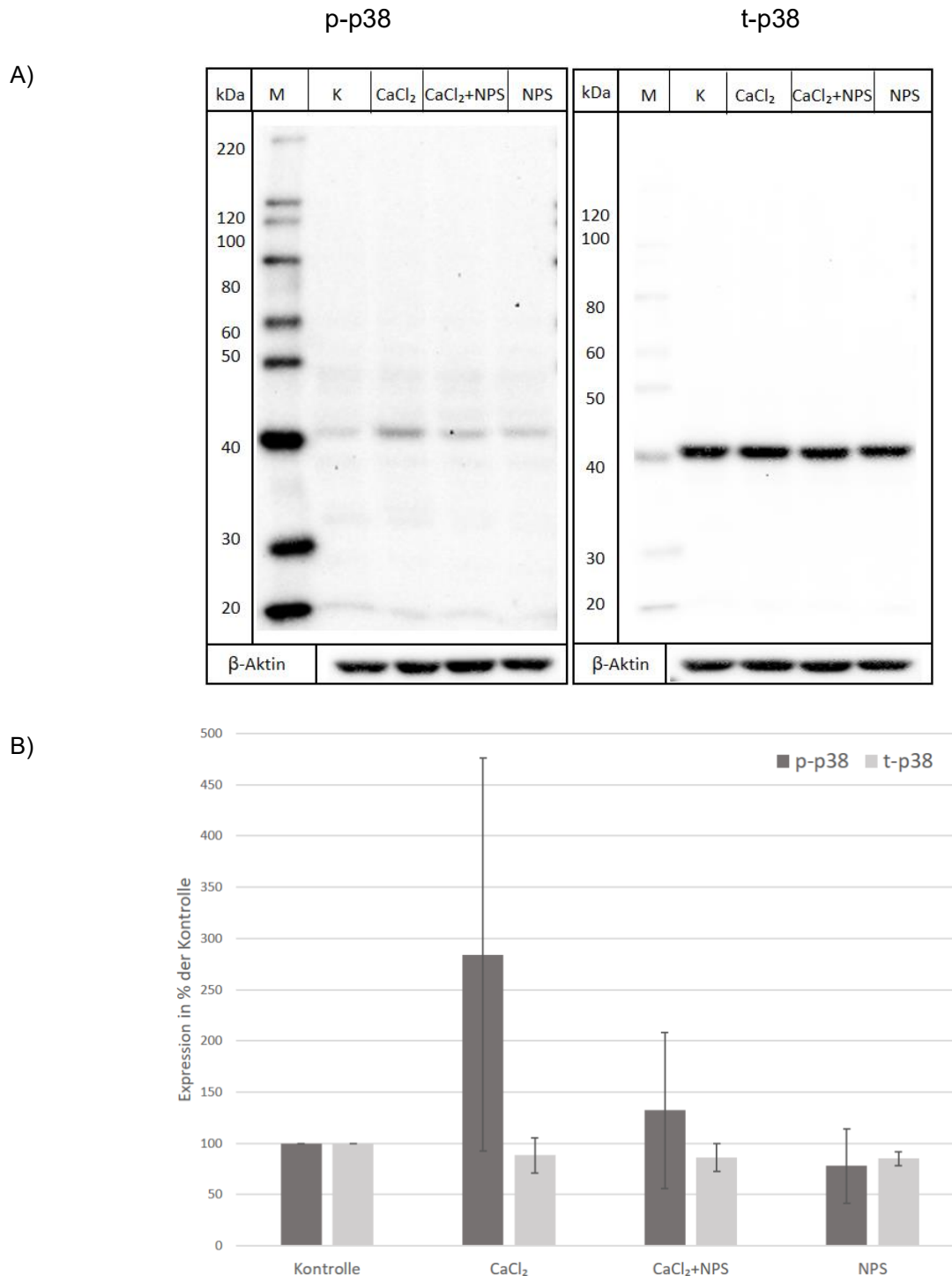


Abbildung 8: Expression und Aktivität von p38 (Phosphorylierung an Thr180/Tyr182) der 12Z-Zellen unter Einfluss von Calciumchlorid (CaCl₂) und NPS-2143 (NPS)

Untersucht wurde die Expression von total-p38 (t-p38) und p-p38 in 12Z-Zellen im Western-Blot nach Auftrennung durch SDS-PAGE nach 5 mM CaCl₂-Behandlung (30 min), 5 mM CaCl₂ (30 min)- und 4,3 μM NPS-2143 (1 h)-Kombinationsbehandlung und 4,3 μM NPS-2143-Behandlung (1 h) im Vergleich zur Kontrolle (K). Für die SDS-PAGE wurden pro Tasche eines 10%igem-Polyacrylamidgels 30 μg Protein zur Untersuchung von p-p38 bzw. 20 μg zur Untersuchung von t-p38 aufgetragen. **A)** Als Primärantikörper wurde Anti-p-p38-Antikörper sowie Anti-t-p38-Antikörper 1:1000 in 5% BSA in 1x TBST verwendet, als Sekundärantikörper HRP-konjugierter Anti-Rabbit-Antikörper 1:2000 in 5% BSA in 1x TBST. Als Ladekontrolle wurde Anti-β-Aktin 1:2000 in ROTI®-Block sowie HRP-konjugierter Anti-Mouse-Antikörper 1:2000 in ROTI®-Block verwendet. Das Molekulargewicht des Zielproteins in kDa wurde anhand eines Proteinstandard-Markers (M) visualisiert. **B)** Die ermittelten Expressionen wurden auf die Ladekontrolle β-Aktin normiert und in Bezug auf die Kontrolle (K) in % angegeben. Angegeben sind die Mittelwerte als Balken sowie die Standardabweichungen als Fehlerbalken aus drei unabhängigen Versuchen. Das Signifikanzniveau wurde mit Hilfe eines Student's t-Tests berechnet.

4.5 Expression und Aktivität von JNK

Die 12Z-Zellen zeigten nach Calciumbehandlung eine signifikante Aktivitätssteigerung ($p=0,0009$) von JNK (Phosphorylierung an Thr183/Tyr185) auf Proteinebene auf etwa 200% (Abbildung 8). Die zusätzliche Behandlung mit dem Inhibitor des CaSR, NPS-2143, hob diesen Effekt wieder auf. Das Aktivitätsniveau von JNK nach alleiniger NPS-2143-Behandlung entsprach in etwa dem Aktivitätsniveau der Kontrolle. Die Expression von total-JNK (t-JNK) blieb auch unter Behandlung mit Calcium und/oder NPS-2143 etwa konstant.

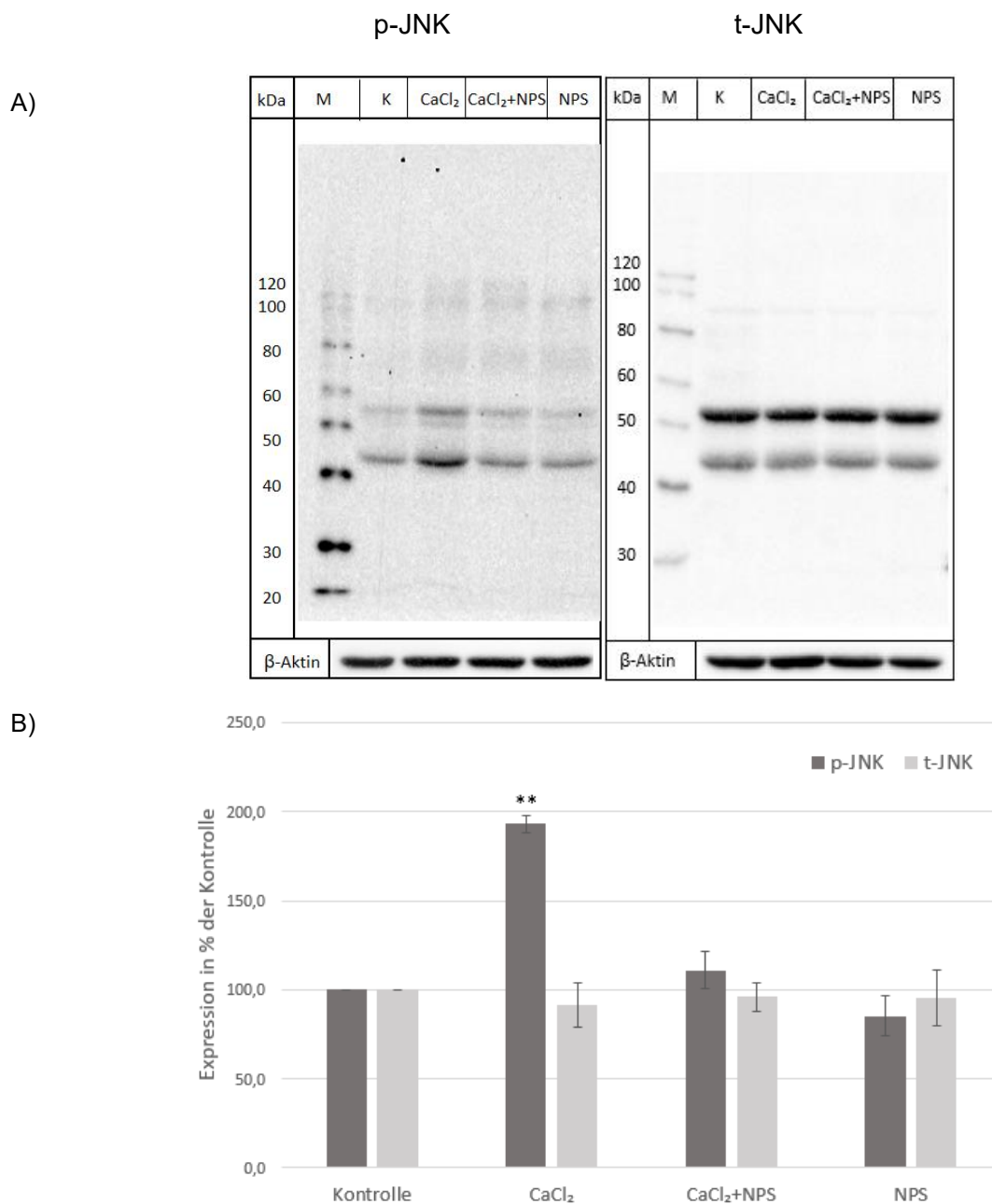


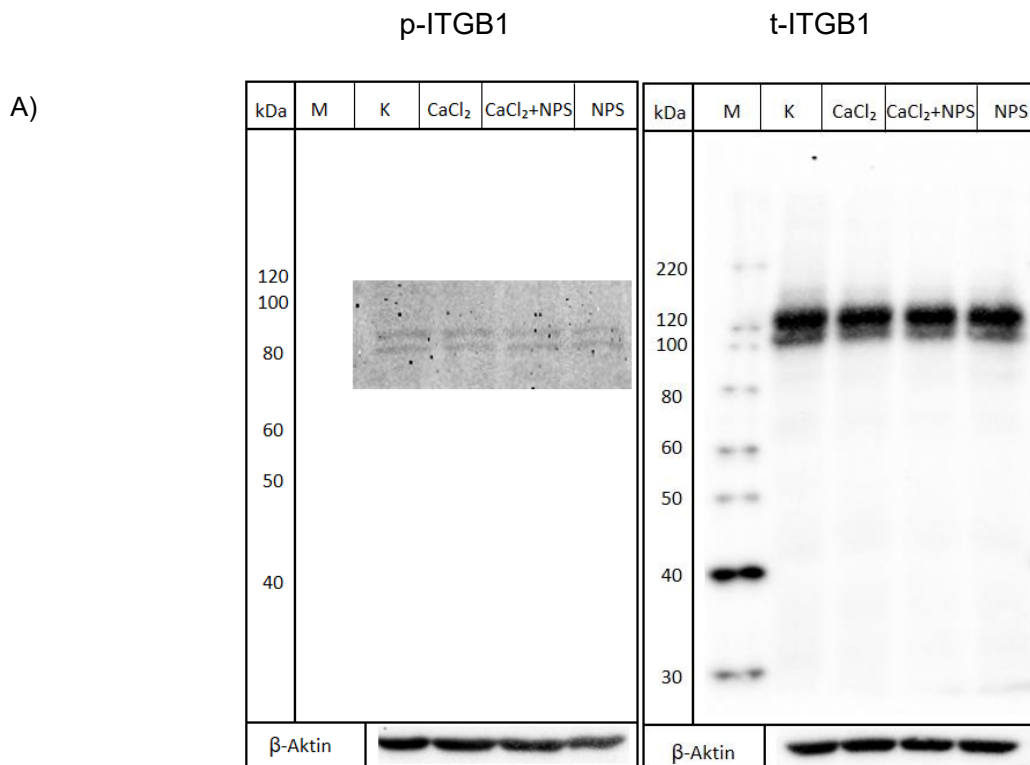
Abbildung 9: Expression und Aktivität von JNK (Phosphorylierung an Thr183/Tyr185) in 12Z-Zellen unter Einfluss von Calciumchlorid (CaCl₂) und NPS-2143 (NPS)

Untersucht wurde die Expression von total-JNK (t-JNK) und p-JNK in 12Z-Zellen im Western-Blot nach Auftrennung durch SDS-PAGE nach 5 mM CaCl₂-Behandlung (30 min), 5 mM CaCl₂ (30 min)- und 4,3 μM NPS-2143 (1 h)-Kombinationsbehandlung und 4,3 μM NPS-2143-Behandlung (1 h) im Vergleich zur Kontrolle (K). Für die SDS-PAGE wurden pro Tasche eines 10%igem-Polyacrylamidgels 90 μg Protein zu Untersuchung von p-JNK bzw. 70 μg Protein zur Untersuchung von t-JNK aufgetragen. **A)** Es wurde Anti-p-JNK-Antikörper 1:500 in 5% BSA in 1x TBST (Sekundärantikörper HRP-konjugierter Anti-Rabbit-Antikörper 1:3000 in 5% BSA in 1x TBST) sowie Anti-t-JNK-Antikörper 1:500 in 5% BSA in 1x TBST verwendet (Sekundärantikörper HRP-konjugierter Anti-Rabbit-Antikörper 1:2000 in 5% BSA in 1x TBST).

Als Ladekontrolle wurde Anti- β -Aktin 1:2000 in ROTI[®]-Block sowie HRP-konjugierter Anti-Mouse-Antikörper 1:2000 in ROTI[®]-Block verwendet. Das Molekulargewicht des Zielproteins in kDa wurde anhand eines Proteinstandard-Markers (M) visualisiert. **B)** Die ermittelten Expressionen wurden auf die Ladekontrolle β -Aktin normiert und in Bezug auf die Kontrolle (K) in % angegeben. Angegeben sind die Mittelwerte als Balken sowie die Standardabweichungen als Fehlerbalken aus drei unabhängigen Versuchen. Das Signifikanzniveau wurde mit Hilfe eines Student's t-Tests berechnet und $p < 0,005$ mit (**) als signifikant angegeben.

4.6 Expression und Aktivität von ITGB1

Die 12Z-Zellen zeigten nach Calciumbehandlung keine Steigerung des Aktivitätsniveaus von ITGB1 (Phosphorylierung an Thr788/Thr789) auf Proteinebene und ebenso keine relevante Änderung des Aktivitätsniveaus unter Behandlung mit Calcium und NPS-2143 oder alleiniger NPS-2143-Behandlung (Abbildung 9). Die Expression von total-ITGB1 (t-ITGB1) war nach allen Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle leicht erniedrigt, wobei die Erniedrigung nach Calciumbehandlung ($p=0,0008$) sowie nach Calcium- und NPS-Kombinationsbehandlung ($p=0,025$) signifikant war.



B)

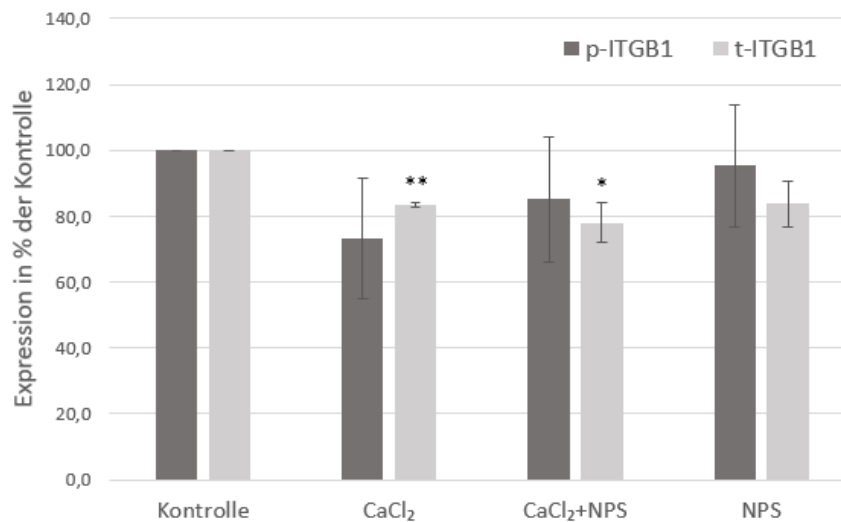


Abbildung 10: Expression und Aktivität von ITGB1 (Phosphorylierung an Thr788/Thr789) der 12Z-Zellen unter Einfluss von Calciumchlorid (CaCl₂) und NPS-2143 (NPS)

Untersucht wurde die Expression von total-ITGB1 (t-ITGB1) und p-ITGB1 in 12Z-Zellen im Western-Blot nach Auftrennung durch SDS-PAGE nach 5 mM CaCl₂-Behandlung (30 min), 5 mM CaCl₂(30 min)- und 4,3 μM NPS-2143 (1 h)-Kombinationsbehandlung und 4,3 μM NPS-2143-Behandlung (1 h) im Vergleich zur Kontrolle (K). Für die SDS-PAGE wurden pro Tasche eines 10%igem-Polyacrylamidgels 70 μg Protein zur Analyse von p-ITGB1 bzw. 30 μg Protein zur Analyse von t-ITGB1 aufgetragen. **A)** Als Primärantikörper wurde Anti-p-ITGB1-Antikörper 1:500 in 5% Milchpulver in 1x TBST verwendet (Sekundärantikörper HRP-konjugierter Anti-Rabbit-Antikörper 1:3000 in 5% Milchpulver in 1x TBST) bzw. Anti-t-ITGB1-Antikörper 1:1000 in 5% BSA in 1x TBST (Sekundärantikörper HRP-konjugierter Anti-Rabbit-Antikörper 1:2000 in 5% BSA in 1x TBST) Als Ladekontrolle wurde Anti-β-Aktin 1:2000 in ROTI®-Block sowie HRP-konjugierter Anti-Mouse-Antikörper 1:2000 in ROTI®-Block verwendet. Das Molekulargewicht des Zielproteins in kDa wurde anhand eines Proteinstandard-Markers (M) visualisiert. Aus technischen Gründen musste die zur Analyse von p-ITGB1 verwendete Membran bei der Detektion großzügig abgedeckt werden, da sonst die Detektion durch starke unspezifische Signale und das starke Signal des Markers vorzeitig beendet wurde. **B)** Die ermittelten Expressionen wurden auf die Ladekontrolle β-Aktin normiert und in Bezug auf die Kontrolle (K) in % angegeben. Angegeben sind die Mittelwerte als Balken sowie die Standardabweichungen als Fehlerbalken aus drei unabhängigen Versuchen. Das Signifikanzniveau wurde mit Hilfe eines Student's t-Tests berechnet und bei p<0,05 mit (*) bzw. p<0,005 mit (**) als signifikant angegeben.

5 Diskussion

5.1 Einfluss von DMSO

Der CaSR-Inhibitor NPS-2143 wurde in dem verbreiteten Lösungsmittel DMSO gelöst. DMSO-Konzentrationen unter 0,5% gelten zwar allgemein als unproblematisch hinsichtlich ihrer Zytotoxizität, allerdings gibt es für die verwendete 12Z-Zelllinie diesbezüglich bislang keine Belege. Aber nicht nur die mögliche Toxizität ist zu beachten: Untersuchungen zeigen außerdem, dass DMSO Zellüberleben, Apoptose und Migration beeinflussen kann. Beispielsweise konnte niedrig konzentriertes DMSO in Mausversuchen an diabetischen Wunden durch angeregte Proliferation und Migration die Wundheilung verbessern. Dieser Effekt wird AKT-abhängig vermittelt (158). Es ist also von großer Relevanz den Einfluss von DMSO auf die in den 12Z-Zellen untersuchten Signalmoleküle AKT, ERK1/2, p38 und JNK zu untersuchen.

Die Expression der aktivierten Signalmoleküle einer unbehandelten Kontrolle wurde mit der Expression nach DMSO-Applikation verglichen. Getestet wurde DMSO in einer Konzentration von 0,05%, entsprechend der DMSO-Konzentration der geplanten 4,3 μ M NPS-2143-Behandlung, sowie von 0,5% entsprechend der vermuteten Toxizitätsgrenze von DMSO. Für DMSO in beiden Konzentrationen konnte keine relevante Veränderung im Aktivitätsniveau von AKT, ERK1/2, p38 und JNK beobachtet werden. Zudem wurde getestet, ob es einen Unterschied in den entsprechenden Aktivitätsniveaus zwischen reiner Calciumbehandlung und Calciumbehandlung mit 0,05% DMSO gibt. Dies war nicht der Fall.

Die Verwendung von DMSO als Lösungsmittel für NPS-2143 konnte also als unbedenklich hinsichtlich eines Einflusses auf die untersuchte Signaltransduktion eingeschätzt werden kann. Da sich in den durchgeführten Vorversuchen kein Unterschied zwischen einer unbehandelten Kontrolle und einer DMSO-Behandlung zeigte, wurde in den weiteren Versuchen lediglich eine 0,05%ige DMSO-Kontrolle verwendet. Da auch zwischen reiner Calciumapplikation und Calciumapplikation mit DMSO kein Unterschied festgestellt werden konnte, wurde in den folgenden Versuchen zur Reduktion der Behandlungsgruppen lediglich eine reine Calciumbehandlung durchgeführt. Nachträglich ist festzustellen, dass streng genommen eine Calciumbehandlung mit 0,05% DMSO geeigneter gewesen wäre, da dies sichergestellt hätte, dass alle Zellen mit 0,05% DMSO behandelt wurden. Dies hätte noch sicherer einen Einfluss von DMSO im Vergleich des Effekts von Calcium und von Calcium mit NPS-2143 ausschließen können. Die gewonnenen Erkenntnisse aus den durchgeführten Vorversuchen geben aber eine große Sicherheit, dass DMSO in der verwendeten Konzentration von 0,05% keinen

relevanten Einfluss hatte und die Aussagekraft der Ergebnisse der folgenden Versuche nicht gemindert ist.

5.2 CaSR-abhängige AKT-Aktivierung durch Calcium

Die AKT-Aktivierung über den CaSR ist schon für viele Zellen beschrieben worden. Frees et al. konnten eine verstärkte CaSR-abhängige AKT-Aktivierung in Nierenzellkarzinomzellen nach CaSR-Transfektion und Calciumstimulation belegen (159). Innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des CaSR mit Calcium in den Ovarialkarzinomzelllinien OVI5E und EFO21 ebenfalls mit einer starken AKT-Aktivierung einhergeht. Die gleichzeitige Inhibition des Rezeptors hob diesen Effekt wieder auf, sodass die Aktivierung von AKT zweifelsfrei über den CaSR vermittelt wurde. Auch in Magenkarzinomzellen konnte durch Xie et al. eine AKT-Aktivierung durch Calciumstimulation gezeigt werden, die nach CaSR-Knockdown nicht stattfand (160).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in der Endometriose-Zelllinie 12Z eine starke CaSR-abhängige Aktivierung von AKT durch Calciumstimulation stattfindet. Bei gleichzeitiger Inhibition des CaSR durch den CaSR-Inhibitor NPS-2143 fand keine Aktivierung von AKT statt. Dies belegt, dass die AKT-Aktivierung nach Calciumstimulation über den CaSR vermittelt wird.

AKT kann als Proteinkinase weitere Substrate phosphorylieren, was je nach Substrat einer Aktivierung oder einer Hemmung entsprechen kann. Es ist bekannt, dass AKT so Zellproliferation und Zellüberleben regulieren kann (117, 121, 161). AKT wirkt auf eine Vielzahl an Substraten, zu nennen sind beispielsweise FOXO und das pro-apoptotische Protein BAD der Bcl-2-Familie. Durch Phosphorylierung von FOXO und BAD wird die Apoptose gehemmt und das Zellüberleben gefördert (122, 161). AKT phosphoryliert ebenfalls mTORC1, GSK β 3, Caspase-9 und viele weitere Substrate, die insgesamt ebenfalls eine Hemmung der Apoptose und eine Förderung des Zellwachstums bewirkt (122). Die AKT-Aktivierung ist gut mit der in der eigenen Arbeitsgruppe belegten gesteigerten Proliferation der 12Z-Zellen nach Stimulation des CaSR in Einklang zu bringen (8). Es scheint naheliegend, dass die AKT-Aktivierung hier ein wesentlicher zugrundeliegender Mechanismus der gesteigerten Proliferation ist. Neben der Proliferation kann die AKT-Aktivierung in verschiedensten Zellen auch die Migration fördern (162–164). Für die 12Z-Zellen konnte gezeigt werden, dass CaSR-abhängige gesteigerte Migration und AKT-Aktivierung korrelieren. Ob hier ein kausaler Zusammenhang besteht, bleibt zu verifizieren.

In dieser Arbeit wurde die Phosphorylierung von AKT an T308 nachgewiesen. Durch diese Phosphorylierung durch PDK1 wird AKT aktiviert; die zusätzliche Phosphorylierung von S473

durch mTORC2 bewirkt aber eine stärkere Aktivierung sowie Stabilisierung der T308-Phosphorylierung (165). Dass auch eine Phosphorylierung an S473 durch CaSR-Stimulation stattfindet, kann zwar vermutet werden, bleibt aber noch zu belegen.

Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass eine verstärkte Aktivität von PI3K/AKT eine Rolle in der Pathophysiologie der Endometriose spielt. PI3K/AKT ist in ektopen sowie eutopen Stromazellen des Endometriums von Endometriosepatientinnen aktiver als in Stromazellen des gesunden Endometriums. In endometriotischen Drüsenzellen ist die PI3K/AKT-Aktivität erhöht im Vergleich zu eutopen Endometriumdrüsen von Betroffenen sowie Gesunden (126). Die Anwendung des AKT-Inhibitors MK-2206 an primären stromalen Endometriosezellen führte zu einer Reduktion ihrer Proliferation (166). Im Mausmodell konnte der Inhibitor MK-2206 die Anzahl der entstehenden Endometrioseläsionen in der Initialphase der Erkrankung reduzieren (166). Yin et al. zeigten, dass die Überaktivität von AKT mit einer Störung der Dezidualisierung von Stromazellen in Endometriose vergesellschaftet ist (167). Die Mechanismen der Aktivierung von PI3K/AKT in Endometriose sind allerdings unvollständig bekannt. Erstmals konnte in dieser Arbeit die Aktivierung von PI3K/AKT über den CaSR im Endometriose-Zellmodell belegt werden. Es können allerdings auch viele weitere Mechanismen eine Rolle in der Aktivierung des PI3K/AKT-Wegs spielen. So können Wachstumsfaktoren (z. B. über EGFR) zu einer AKT-Aktivierung führen (168). Auch Östrogen kann AKT aktivieren, während Progesterin (synthetisches Progesteron) eine Dephosphorylierung von AKT bewirkt (126, 169). Vermutlich hat auch natürliches Progesteron diesen Effekt, der aber durch die in Endometriose bestehende Progesteronresistenz geschwächt sein könnte.

Unterschiedliche Mechanismen der PI3K/AKT-Aktivierung könnten also bei Endometriose eine Rolle spielen und zusammenwirken. Es stellt sich daher die Frage, wie groß die Relevanz der Aktivierung von PI3K/AKT über den CaSR *in vivo* ist. Dies bleibt in Zukunft zu untersuchen.

5.3 CaSR-abhängige Aktivierung von MAPK durch Calcium

5.3.1 ERK1/2

Die CaSR-abhängige Aktivierung von ERK1/2 durch Calcium wurde bereits in unterschiedlichen Kontexten beschrieben. Vizard et al. zeigten, dass die Aktivierung des CaSR durch Calcium in suprazervikalen Ganglionzellen zu axonalem Wachstum durch ERK-Aktivierung führt. Der selektive MEK1/2-Inhibitor (vorgeschaltete Kinase von ERK1/2) U0126 konnte dieses Wachstum hemmen, was die Beteiligung von ERK1/2 bewies (170). Auch in Nierenzellkarzinomzellen konnte eine CaSR-abhängige ERK1/2-Aktivierung nach Calciumstimulation nachgewiesen werden. Bei gleichzeitiger Behandlung mit dem Inhibitor

NPS-2143 blieb die Aktivierung von ERK1/2 aus, was die CaSR-Abhängigkeit belegte (159). Mizumachi et al. untersuchten die Rolle des CaSR und ERK1/2 in der osteoblastischen Differenzierung von Zahnpulpazellen. Die Behandlung der Zahnpulpazellen mit Calcium und Strontium führte zur Phosphorylierung von ERK1/2. Die Applikation von NPS-2143 vor der Calcium- und Strontiumbehandlung konnte diesen Effekt aufheben, sodass auch im Falle der Zahnpulpazellen eine CaSR-abhängige Aktivierung von ERK nachgewiesen werden konnte (171). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in den Endometriosezellen 12Z eine Calciumstimulation zu ERK-Aktivierung führt. Die Vorbehandlung mit dem CaSR-Inhibitor NPS-2143 konnte die Aktivität von ERK1/2 etwa halbieren. Dieser Effekt war statistisch nicht signifikant ($p=0,0555$), daher kann hier eine Teilabhängigkeit vom CaSR stark vermutet aber nicht abschließend bewiesen werden. Andere Mechanismen der ERK-Aktivierung spielen hier offenbar ebenfalls eine Rolle. Möglich wäre z. B. eine Beteiligung anderer G-Proteingekoppelter Rezeptoren wie GPRC6A, dessen Wichtigkeit für die ERK-Aktivierung für Prostatakarzinomzellen oder Osteoblasten gezeigt wurde (172, 173). Die zusätzlichen Mechanismen der ERK-Aktivierung durch Calcium bleiben in Zukunft genauer zu untersuchen.

5.3.2 p38

In dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass Calcium eine Aktivitätssteigerung von p38 bewirkt. Dieses Ergebnis war nicht statistisch signifikant, es zeigt sich aber ein eindeutiger Trend der p-p38-Erhöhung nach Calciumstimulation. Nach gleichzeitiger NPS-2143 Behandlung fiel die p-p38-Erhöhung deutlich niedriger aus oder blieb aus. Dies legt nahe, dass trotz fehlender Signifikanz eine CaSR-abhängige Aktivierung von p38 stattfindet, wenn auch nicht so eindeutig und eindrücklich wie im Falle von AKT. Die Aktivierung von p38 über den CaSR wurde beispielsweise bereits von Lee et al. in renalen Tubuluszellen beschrieben (131) und nun auch für Endometriosezellen gezeigt.

5.3.3 JNK

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine eindeutige CaSR-abhängige JNK-Aktivierung nach Calciumstimulation. Ein ähnlicher Effekt konnte von Frees et al. in Nierenkarzinomzellen demonstriert werden, hier wurde eine CaSR-abhängige JNK-Aktivierung nach CaSR-Transfektion und Calciumstimulation beobachtet (159). Die JNK-Aktivierung kann je nach zellulärem Kontext proliferationsfördernd oder pro-apoptotisch wirken (140). In 12Z-Zellen ist die JNK-Aktivierung allerdings mit erhöhter Proliferation assoziiert (Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe, (8)), sodass hier ein proliferationsfördernder Effekt von JNK vermutet werden kann.

5.3.4 Zusammenhang zwischen aktivierten MAPK und Proliferation und Migration

Neben PI3K/AKT können auch die untersuchten MAPK grundsätzlich die Proliferation und Migration fördern (129). Zhao et al. zeigten beispielsweise, dass in Endometriosezellen Östradiol die Aktivierung von ERK1/2 induziert und damit die Proliferation und Migration fördert (174). Die in vorherigen Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe gezeigte erhöhte Proliferation und Migration der 12Z-Zellen nach CaSR-Stimulation könnte also auch durch die MAPK vermittelt werden – die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen hier eine klare Korrelation (8). Insgesamt scheint es wahrscheinlich, dass in den 12Z-Zellen die durch den CaSR-vermittelte Aktivierung der MAPK zu erhöhter Proliferation und Migration beitragen. Da die MAPK große Überschneidungen ihrer Substrate aufweisen, kann nicht ohne Weiteres beurteilt werden, welche MAPK an der erhöhten Proliferation oder Migration einen mehr oder weniger großen Anteil hat.

5.4 Effekt von alleiniger NPS-2143-Behandlung

In Versuchen an Mammakarzinomzellen konnte nach 48-stündiger Behandlung mit 4,08 μM NPS-2143 eine *Downregulation* von p-ERK, ITGB1 und Bcl-2 beobachtet werden (155). Zhang et al. konnten ebenfalls einen inhibitorischen Effekt von 7,5 μM NPS-2143 auf die Aktivität von AKT und mTOR in Adenokarzinomzellen des Magens nach 48-stündiger Behandlung feststellen (175). In Melanomzellen (M14) konnte nach 24-stündiger 9,5 μM NPS-2143-Behandlung ein vermindertes Aktivitätsniveau von AKT und mTOR nachgewiesen werden (111). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit kein hemmender Effekt der alleinigen NPS-2143-Behandlung auf die untersuchten Signalwege beobachtet werden. Zum einen unterschied sich die Behandlungsdauer sowie die Behandlungskonzentrationen, zum anderen unterschied sich auch ein weiter wesentlicher Aspekt der Versuchsbedingungen: In den zitierten Untersuchungen wurde im Gegensatz zu den eigenen Versuchen kein Calcium-reduziertes Medium verwendet. Dies führt dazu, dass der CaSR durch das im Medium enthaltene Calcium aktiviert wird, was durch die Behandlung mit NPS-2143 rückgängig gemacht werden kann. Da in den eigenen Versuchen Calcium-reduziertes Medium verwendet wurde, ist auch keine relevante Aktivierung des CaSR durch die enthaltene Menge Calcium (0,3 mM) zu erwarten. Demzufolge ist auch keine relevante Hemmung durch NPS-2143 zu erwarten.

Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe zeigten allerdings eine reduzierte Proliferation und Migration der 12Z-Zellen nach alleiniger NPS-2143-Behandlung (8). Es kann vermutet werden, dass eine geringe Aktivierung des CaSR durch das verbliebene Calcium oder andere Liganden (weitere Ionen oder Aminosäuren) im Calcium-reduzierten Medium stattfindet, die durch die

Applikation von NPS-2143 gehemmt werden kann. Die Reduktion fiel mit ca. 80% zur unbehandelten Kontrolle allerdings eher moderat aus, sodass sich die Frage stellt, ob dies ausreicht, um im Western-Blot ein Korrelat in der Aktivität der untersuchten Signalwege nachweisen zu können. Möglicherweise liegen der Reduktion von Proliferation und Migration in diesem Fall aber auch andere Mechanismen als die untersuchten Signalwege zugrunde.

5.5 Einfluss der Calcium- und NPS-2143-Behandlung auf die Gesamtexpression

Die Gesamtexpression der untersuchten Moleküle AKT, p38, ERK1/2 und JNK zeigte sich unabhängig von der angewendeten Behandlung konstant. Eine Änderung der Gesamtexpression nach der gewählten Behandlungsdauer von 30 min bzw. einer Stunde ist nicht zu erwarten, da es deutlich länger dauern würde die Transkription relevant zu beeinflussen. Um eine mögliche Änderung der Gesamtexpression durch Calcium- oder NPS-2143-Behandlung nachzuweisen, könnten die durchgeführten Versuche um Versuchsreihen mit längerer Behandlungsdauer, beispielsweise 24 Stunden, erweitert werden.

5.6 Expression und Aktivität von ITGB1

Bislang unveröffentlichte Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe zeigten eine erhöhte Expression von ITGB1, Integrin- α 2 und - α 5 nach Calciumstimulation in der Ovarialkarzinomzelllinie EFO21 sowie eine erhöhte Expression von ITGB1 und Integrin- α 2 nach Calciumstimulation in der Ovarialkarzinomzelllinie OVISE. Diese Effekte waren überwiegend über den CaSR vermittelt. Im Wissen über die Parallelen zwischen Ovarialkarzinom und Endometriose kam die Frage auf, ob auch in Endometriose eine CaSR-abhängige Änderung der Integrin-Expression zu beobachten sein könnte. Auch ist die Untersuchung der Integrine im Kontext der gesteigerten Migration durch CaSR-Aktivierung in 12Z-Zellen äußerst relevant (8). Exemplarisch wurde daher in dieser Arbeit ITGB1 untersucht, sowohl in seiner Gesamtheit als auch in phosphorylierter Form. Die in den Ovarialkarzinomzellen beobachtete Steigerung der Expression von ITGB1 nach Calciumstimulation konnte für die 12Z-Zellen nicht bestätigt werden. Dies verdeutlicht das sogenannte *biased signaling* des CaSR. Der gleiche Ligand kann an unterschiedlichen Zellen unterschiedliche Reizantworten provozieren (116). In den 12Z-Zellen statt einer Erhöhung eine leichte Erniedrigung des Expressionsniveaus von ITGB1 nach Calciumstimulation beobachtet werden. Die Expression von p-ITGB1 war im Vergleich zur Kontrolle in allen Gruppen ebenfalls leicht erniedrigt, jedoch ohne Signifikanz.

Insgesamt lässt sich also feststellen, dass in den 12Z-Zellen eine Calciumstimulation nicht zu einer erhöhten Expression oder Aktivität von ITGB1 führt. Die leichte Erniedrigung der Expression von ITGB1 durch Calciumstimulation konnte auch bei gleichzeitiger Inhibition des CaSR mit NPS-2143 beobachtet werden. Dies belegt, dass der Effekt nicht über den CaSR vermittelt wurde. Über welche Mechanismen diese Erniedrigung der Gesamtexpression von ITGB1 bewirken könnte, bleibt unklar. Ob dieser geringe Effekt überhaupt relevant ist, kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht beurteilt werden.

Der Zusammenhang zwischen weiteren Integrinen und dem CaSR bleibt zu untersuchen. Ebenso stellen Integrine und ihre Rolle in der Pathophysiologie der Endometriose (unabhängig vom CaSR) ein weiteres spannendes Forschungsfeld dar.

5.7 Der CaSR in Endometriose

5.7.1 Stimulation des CaSR *in vivo*

Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des CaSR mit Calcium *in vitro* zu erhöhter Proliferation und Migration der Endometriosezelllinie 12Z führt sowie - in dieser Arbeit gezeigt - zu erhöhter Aktivität von AKT, ERK1/2, p38 sowie JNK. Nun stellt sich die Frage, ob und wie der CaSR *in vivo* in Endometriose stimuliert wird. Die in dieser Arbeit eingesetzte Calciumkonzentration entspricht etwa dem Doppelten des Gesamt-Calcium im Serum bzw. dem Vierfachen des ionisierten Serumcalciums – die Serumkonzentration entspricht normalerweise der extrazellulären Konzentration. Häufig untersucht wurde der CaSR im Kontext der Metastasierung in den Knochen, wo die dortige hohe Calciumkonzentration den CaSR stimulieren kann. Aber auch bei Entzündungszuständen kann es zu erhöhten extrazellulären Calciumkonzentrationen. In entzündeter Gingiva wurde beispielsweise ein 3-fach erhöhtes extrazelluläres Calcium im Vergleich zum Serumcalcium bestimmt (176). An Peritonealdialysepatienten wurde beobachtet, dass eine Peritonitis zu erhöhter Sekretion von Calcium in die Peritonealflüssigkeit führt (177). Denkbar wäre also, dass auch bei Endometriose eine erhöhte Calciumkonzentration im Entzündungsmilieu zur Stimulation des CaSR führt.

Nicht nur fördert der CaSR Proliferation und Migration, er ist auch ein bekannter Mediator der Inflammation. Seine Rolle in der Entzündung ist vielseitig. Einerseits kann Calcium über die Stimulation des CaSR eine verstärkte Chemokin- und Zytokinausschüttung und damit eine Immunaktivierung bewirkt (178). Erhöhte Interleukinspiegel (IL-5, IL-13) bei Mäusen mit Asthma konnten durch die Inhibition des CaSR gesenkt werden (110). Andererseits konnte gezeigt werden, dass proinflammatorische Zytokine ihrerseits eine verstärkte Expression des CaSR induzieren können. Bei Schafen mit erhöhten zirkulierenden Zytokinen durch

Verbrennungsverletzungen wurde eine erhöhte Expression des CaSR in der Nebenschilddrüse beobachtet (179, 180). Bei Ratten konnten nach intraperitonealer Applikation von IL- β 1 oder IL-6 eine erhöhte Expression des CaSR in der Nebenschilddrüse, Schilddrüse sowie in der Niere gezeigt werden (180, 181).

Wie bereits erläutert ist Inflammation auch ein relevanter Bestandteil der Pathophysiologie der Endometriose. Denkbar wäre, dass der CaSR zum einen auch im Kontext der Endometriose eine Rolle in der Ausschüttung von proinflammatorischen Signalmolekülen spielt. Zudem könnte das lokale Entzündungsmilieu in und um Endometrioseherde herum zu einer erhöhten Expression und Aktivität des Rezeptors führen, was die Progression der Endometriose durch gesteigerte Proliferation und Migration fördern könnte. Weitere Forschung ist notwendig, um diese Zusammenhänge genauer zu verstehen.

5.7.2 CaSR als medikamentöses Target

Grundsätzlich stellt sich aber die Frage, ob NPS-2143 ein im Menschen einsetzbares Therapeutikum wäre. Bislang wurde es vorwiegend *in vitro* angewendet, in einigen Untersuchungen auch im Tier. Im Tiermodell wurde es zur Untersuchung unterschiedliche Fragestellungen eingesetzt, z. B. für neurologische oder kardiovaskuläre Untersuchungen oder die Analyse von Knochenmetastasen (159, 182). Ob der Einsatz von NPS-2143 im Menschen möglich und sinnvoll ist, bleibt in Zukunft zu prüfen.

Auch die nachgeschalteten Signalwege des CaSR kommen als mögliche Medikamenten-*Targets* in Betracht. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die duale Blockade von AKT und ERK1/2 das Wachstum von Endometrioseläsionen hemmt. Diese duale Blockade bewirkte außerdem eine Reduktion der Produktion proinflammatorischer Zytokine und der PGE₂-Synthese und verbesserte die Progesteronrezeptorsensitivität (183). Dies zeigt eindrücklich, dass diese beiden Signalwege von äußerst hoher Relevanz für die Pathophysiologie der Endometriose sind.

Es gilt für alle CaSR-Inhibitoren, dass die systemische Applikation durch die Beeinflussung der Calciumhomöostase und durch das ubiquitäre Vorkommens des CaSR im ganzen Körper mit vielen Nebenwirkungen verbunden ist. Einige Autoren teilen die Idee der Entwicklung eines lokal einsetzbaren CaSR-Inhibitors für unterschiedliche Erkrankungen, um systemische Nebenwirkungen zu vermeiden (178). Sollte sich die Wichtigkeit des CaSR auch in zukünftiger Endometrioseforschung bestätigen, wäre auch für dieses Krankheitsbild eine Therapie mit einem CaSR-Inhibitor nach sorgfältiger Überprüfung der Wirksamkeit und möglicher Nebenwirkungen denkbar.

5.8 Methodenkritik

5.8.1 Zellmodell 12Z

Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie 12Z ist ein bewährtes, häufig verwendetes Modell, um die Progression der Endometriose *in vitro* zu untersuchen (184). Die Zellen stammen aus einer peritonealen roten Endometrioseläsion einer 37 Jahre alten Patientin. Es handelt sich um Epithel-ähnliche immortalisierte Zellen. 12Z ist eine invasive Zelllinie, sie exprimieren u. a. N-Cadherin und Matrixmetalloproteasen (v. a. MMP6 und MMP9) (157, 185). Zellen aus einer TIE wachsen aber beispielsweise invasiver, sie exprimieren u. a. stärker MMPs und Faktoren der Angiogenese (186). Inwieweit man also die Erkenntnisse aus Endometriosezellen aus einer peritonealen Läsion auf andere Endometrioseentitäten übertragen kann, ist unklar. Es bleibt zu prüfen, wie Zellen aus einer TIE oder einer ovariellen Endometriose auf die Stimulation des CaSR reagieren. Bislang wurde die Expression des CaSR allerdings ausschließlich in den 12Z-Zellen nachgewiesen. Die Expression des CaSR in anderen Endometriosezelllinien oder Primärzellen ist zu vermuten, bleibt aber noch zu belegen.

Die 12Z-Zellen wurden in dieser Arbeit in einer 2D-Kultur untersucht. Näher an der Realität *in vivo* wäre eine 3D-Kultur als sog. Spheroide, auch als Ko-Kultur der epithelialen 12Z-Zellen mit stromalen Zellen (187). Stromale Endometriosezellen spielen bei vielen pathophysiologischen Prozessen auch eine wichtige Rolle (1). Primärzellen werden häufig etablierten immortalisierten Zelllinien vorgezogen, wenn es um die Nähe zur Realität geht (184). Bei allen *in vitro*-Untersuchungen stellt sich die grundsätzliche Frage nach der Übertragbarkeit auf die komplexere Situation *in vivo*. Die Kulturbedingungen im Labor unterscheiden sich von den realen Bedingungen im Körper. Das verwendete Kulturmedium beispielweise wird zwar für die zu untersuchenden Zellen passend ausgewählt, unterscheidet sich aber natürlich von der realen Umgebung der Endometriose. Die *in vivo* bestehenden hormonellen Bedingungen wurden in dieser Arbeit ausgeklammert, ebenso die Interaktion mit dem Immunsystem oder anderen Zellen. Doch insgesamt können *in vitro*-Versuche wichtige Erkenntnisse liefern, deren Gültigkeit *in vivo* verifiziert werden muss.

5.8.2 Versuchsaufbau

Die Proteinextraktion wurde sofort nach Ablauf der Behandlungszeit (30 min oder 1 Stunde) durchgeführt. Daher stellen die gewonnenen Erkenntnisse nur eine Momentaufnahme zu diesem Zeitpunkt da und erlauben keine Aussage darüber, wie sich die beobachtete Aktivierung der Signalwege über die Zeit verändert, ob es sich um eine kurze transiente Aktivierung handelt oder aber eine langanhaltende Aktivierung. Das Muster der Aktivierung kann Auswirkungen auf die Reaktion der Zelle haben, wie z. B. von Samson et al. für ERK1/2 gezeigt: hochfrequente ERK-Aktivierungen fördern v. a. die Proliferation während eine erhöhte

ERK-Grundaktivität und niedrigfrequente pulsatile Aktivierungen v. a. die Migration fördern (135).

6 Zusammenfassung

Endometriose wird als Erkrankung mit vielen Betroffenen (ca. 10% der Frauen im reproduktiven Alter) und hohem Leidensdruck zunehmend bekannt (2, 4). Um die häufig nicht suffiziente Behandlung der Endometriose weiterzuentwickeln, ist es unabdingbar die Pathophysiologie der Endometriose weiter zu erforschen (6). In dieser Arbeit sollte der bislang im Kontext der Endometriose kaum untersuchte Calcium-sensitive Rezeptor hinsichtlich seiner Signaltransmission untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die CaSR-induzierte Signaltransmission der Endometriosezelllinie 12Z untersucht. Da der CaSR-Inhibitor NPS-2143 in DMSO gelöst zum Einsatz kommen sollte, wurde zunächst der Einfluss von DMSO auf die zu untersuchenden Signalwege in Vorversuchen überprüft. DMSO kann eine toxische Wirkung haben und die Signaltransduktion der Zellen beeinflussen (158, 188). Um den Einfluss von DMSO zu untersuchen wurde die Expression von p-AKT, p-ERK1/2, p-p38 und p-JNK in den unbehandelten 12Z-Zellen mit 0,05% und 0,5% DMSO behandelten Zellen verglichen. Ebenso verglichen wurde die Expression dieser Signalwege nach reiner 5 mM-Calciumbehandlung und Calciumbehandlung mit 0,5% DMSO. In diese Untersuchungen zeigte sich kein relevanter Einfluss von 0,05% oder 0,5% DMSO auf die Aktivität von p-AKT, p-ERK1/2, p-p38, p-JNK, sodass die folgenden Versuche bedenkenlos durchgeführt werden konnten.

12Z-Zellen wurden mit Calcium (5 mM, 30 min) behandelt, um den CaSR zu stimulieren. Um etwaige Effekte der Stimulation auf den CaSR zurückführen zu können, wurde eine weitere Gruppe Zellen sowohl mit Calcium (5 mM, 30 min) als auch dem CaSR-Inhibitor NPS-2143 (4,3 μ M, 1 h) behandelt. Zudem wurden Zellen alleinig mit NPS-2143 (4,3 μ M, 1 h) behandelt. Nach diesen Behandlungen wurden die Proteine der Zellen extrahiert und im Western-Blot analysiert. Es wurde die Expression und Aktivität von AKT, der MAPK ERK1/2, p38 und JNK sowie von Integrin β 1 untersucht.

Erstmalig konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass AKT nach Calciumstimulation der 12Z-Zellen stark aktiviert wird. Dieser Effekt konnte durch die Kombinationsbehandlung mit NPS-2143 wieder aufgehoben werden, sodass nachgewiesen wurde, dass die AKT-Aktivierung durch Calciumstimulation vollständig über den CaSR vermittelt wird. Auch die MAPK ERK1/2 wurde durch Calciumstimulation aktiviert. Die Kombinationsbehandlung mit NPS-2143 halbierte diesen Effekt, sodass auf eine Teilabhängigkeit von CaSR geschlossen werden kann. Ebenso wurde die MAPK p38 durch Calciumstimulation aktiviert. Dieser Effekt wurde durch die Kombinationsbehandlung mit NPS-2143 deutlich reduziert, sodass auch hier von einer Teilabhängigkeit vom CaSR ausgegangen werden kann. Für die MAPK JNK konnte ebenfalls die CaSR-abhängige Aktivierung nachgewiesen werden, hier konnte die

Kombinationsbehandlung mit NPS-2143 das Aktivitätsniveau von JNK auf das der Kontrolle senken, sodass belegt werden konnte, dass die Aktivierung von JNK nach Calciumstimulation vollständig über den CaSR vermittelt wird. Die alleinige NPS-2143-Behandlung hatte keinen Effekt auf das Aktivitätsniveau der untersuchten Kinasen. Die Expression unphosphorylierten (nicht aktivierten) AKTs und MAPKs wurde durch die unterschiedlichen Behandlungen nicht beeinflusst. Die Expression und das Aktivitätsniveau von Integrin $\beta 1$ blieb unter allen Behandlungsbedingungen weitestgehend stabil, sodass eine CaSR-abhängige Aktivierung oder Änderung der Expression von Integrin $\beta 1$ ausgeschlossen werden konnte.

Zusammenfassend konnte also festgestellt werden, dass in 12Z-Zellen sowohl AKT als auch JNK durch Calcium vollständig CaSR-abhängig aktiviert werden, ERK1/2 und p38 werden teilweise CaSR-abhängig aktiviert. Die CaSR-abhängige Aktivitätserhöhung von AKT und der MAPK ERK1/2, p38 und JNK korreliert dabei mit CaSR-abhängiger erhöhten Proliferation Migration, die in vorherigen Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe nachgewiesen werden konnte (8). Integrin $\beta 1$ wird in 12Z-Zellen nicht CaSR-abhängig aktiviert.

Diese Erkenntnisse stellen ein kleines Puzzleteil im Verständnis der Pathophysiologie der Endometriose dar. Weitere Forschung ist zwingend notwendig, um Antworten auf die vielen weiteren offenen Fragen zu finden und die Therapiemöglichkeiten für Betroffene zu verbessern.

7 Literaturverzeichnis

1. Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med* 2009; 360(3):268–79. doi: 10.1056/NEJMra0804690.
2. Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997; 24(2):235–58. doi: 10.1016/s0889-8545(05)70302-8.
3. Bulletti C, Coccia ME, Battistoni S, Borini A. Endometriosis and infertility. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27(8):441–7. doi: 10.1007/s10815-010-9436-1.
4. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. S2k-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Endometriose: Version 5.0; 2025.
5. Saunders PTK, Horne AW. Endometriosis: Etiology, pathobiology, and therapeutic prospects. *Cell* 2021; 184(11):2807–24. doi: 10.1016/j.cell.2021.04.041.
6. Mechsner S. Endometriosis, an Ongoing Pain-Step-by-Step Treatment. *J Clin Med* 2022; 11(2). doi: 10.3390/jcm11020467.
7. França PRdC, Lontra ACP, Fernandes PD. Endometriosis: A Disease with Few Direct Treatment Options. *Molecules* 2022; 27(13). doi: 10.3390/molecules27134034.
8. Nees KA. Der Einfluss des Calcium-sensitiven Rezeptors auf die Progression der Endometriose; 2025.
9. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol* 2007; 8(5):215. doi: 10.1186/gb-2007-8-5-215.
10. Shafrir AL, Farland LV, Shah DK, Harris HR, Kvaskoff M, Zondervan K et al. Risk for and consequences of endometriosis: A critical epidemiologic review. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2018; 51:1–15. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.06.001.
11. Houston DE, Noller KL, Melton LJ, Selwyn BJ, Hardy RJ. Incidence of pelvic endometriosis in Rochester, Minnesota, 1970-1979. *Am J Epidemiol* 1987; 125(6):959–69. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a114634.
12. Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Marshall LM, Hunter DJ. Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. *Am J Epidemiol* 2004; 160(8):784–96. doi: 10.1093/aje/kwh275.

13. Leibson CL, Good AE, Hass SL, Ransom J, Yawn BP, O'Fallon WM et al. Incidence and characterization of diagnosed endometriosis in a geographically defined population. *Fertil Steril* 2004; 82(2):314–21. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.01.037.
14. Chapron C, Marcellin L, Borghese B, Santulli P. Rethinking mechanisms, diagnosis and management of endometriosis. *Nat Rev Endocrinol* 2019; 15(11):666–82. doi: 10.1038/s41574-019-0245-z.
15. Marie-Scemama L, Even M, La Joliniere JB de, Ayoubi J-M. Endometriosis and the menopause: why the question merits our full attention. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2019; 37(2). doi: 10.1515/hmbci-2018-0071.
16. Weber ML, Germeyer A. Endometriose und Klimakterisches Syndrom. *Ther Umsch* 2021; 78(8):441–6. doi: 10.1024/0040-5930/a001295.
17. Inceboz U. Endometriosis after menopause. *Womens Health (Lond)* 2015; 11(5):711–5. doi: 10.2217/whe.15.59.
18. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004; 364(9447):1789–99. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17403-5.
19. Shim JY, Laufer MR. Adolescent Endometriosis: An Update. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2020; 33(2):112–9. doi: 10.1016/j.jpag.2019.11.011.
20. Fukunaga M. Paratesticular endometriosis in a man with a prolonged hormonal therapy for prostatic carcinoma. *Pathol Res Pract* 2012; 208(1):59–61. doi: 10.1016/j.prp.2011.10.007.
21. Pinkert TC, Catlow CE, Straus R. Endometriosis of the urinary bladder in a man with prostatic carcinoma. *Cancer* 1979; 43(4):1562–7. doi: 10.1002/1097-0142(197904)43:4<1562::aid-cnrcr2820430451>3.0.co;2-w.
22. Simsek G, Bulus H, Tas A, Koklu S, Yilmaz SB, Coskun A. An unusual cause of inguinal hernia in a male patient: endometriosis. *Gut Liver* 2012; 6(2):284–5. doi: 10.5009/gnl.2012.6.2.284.
23. Jabr FI, Mani V. An unusual cause of abdominal pain in a male patient: Endometriosis. *Avicenna J Med* 2014; 4(4):99–101. doi: 10.4103/2231-0770.140660.
24. Ferrando CA, Chapman G, Pollard R. Preoperative Pain Symptoms and the Incidence of Endometriosis in Transgender Men Undergoing Hysterectomy for Gender Affirmation. *J Minim Invasive Gynecol* 2021; 28(9):1579–84. doi: 10.1016/j.jmig.2021.01.018.
25. Moen MH, Magnus P. The familial risk of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1993; 72(7):560–4. doi: 10.3109/00016349309058164.

26. Hadfield RM, Mardon HJ, Barlow DH, Kennedy SH. Endometriosis in monozygotic twins. *Fertil Steril* 1997; 68(5):941–2. doi: 10.1016/s0015-0282(97)00359-2.
27. Treloar SA, O'Connor DT, O'Connor VM, Martin NG. Genetic influences on endometriosis in an Australian twin sample. *sueT@qimr.edu.au. Fertil Steril* 1999; 71(4):701–10. doi: 10.1016/s0015-0282(98)00540-8.
28. Ottolina J, Schimberni M, Makieva S, Bartiromo L, Fazia T, Bernardinelli L et al. Early-life factors, in-utero exposures and endometriosis risk: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2020; 41(2):279–89. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.04.005.
29. Sims OT, Gupta J, Missmer SA, Aninye IO. Stigma and Endometriosis: A Brief Overview and Recommendations to Improve Psychosocial Well-Being and Diagnostic Delay. *Int J Environ Res Public Health* 2021; 18(15). doi: 10.3390/ijerph18158210.
30. Bougie O, Nwosu I, Warshafsky C. Revisiting the impact of race/ethnicity in endometriosis. *Reprod Fertil* 2022; 3(2):R34-R41. doi: 10.1530/RAF-21-0106.
31. Chatman DL. Endometriosis in the black woman. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 125(7):987–9. doi: 10.1016/0002-9378(76)90502-0.
32. Bougie O, Yap MI, Sikora L, Flaxman T, Singh S. Influence of race/ethnicity on prevalence and presentation of endometriosis: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* 2019; 126(9):1104–15. doi: 10.1111/1471-0528.15692.
33. Thomas Weyerstahl MS. *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe: 4. vollständig überarbeitete Auflage*: Thieme; 2013.
34. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. *S2k-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Endometriose: Version 4.0*; 2020.
35. Bulun SE, Yildiz S, Adli M, Chakravarti D, Parker JB, Milad M et al. Endometriosis and adenomyosis: shared pathophysiology. *Fertil Steril* 2023; 119(5):746–50. doi: 10.1016/j.fertnstert.2023.03.006.
36. Imperiale L, Nisolle M, Noël J-C, Fastrez M. Three Types of Endometriosis: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. State of the Art. *J Clin Med* 2023; 12(3). doi: 10.3390/jcm12030994.
37. Hudelist G, Ballard K, English J, Wright J, Banerjee S, Mastoroudes H et al. Transvaginal sonography vs. clinical examination in the preoperative diagnosis of deep infiltrating endometriosis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011; 37(4):480–7. doi: 10.1002/uog.8935.

38. Al-Fozan H, Tulandi T. Left lateral predisposition of endometriosis and endometrioma. *Obstet Gynecol* 2003; 101(1):164–6. doi: 10.1016/s0029-7844(02)02446-8.
39. Hudelist G, Valentin L, Saridogan E, Condous G, Malzoni M, Roman H et al. What to choose and why to use - a critical review on the clinical relevance of rASRM, EFI and Enzian classifications of endometriosis. *Facts Views Vis Obgyn* 2021; 13(4):331–8. doi: 10.52054/FVVO.13.4.041.
40. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997; 67(5):817–21. doi: 10.1016/s0015-0282(97)81391-x.
41. Lee S-Y, Koo Y-J, Lee D-H. Classification of endometriosis. *Yeungnam Univ J Med* 2021; 38(1):10–8. doi: 10.12701/yujm.2020.00444.
42. Keckstein J, Saridogan E, Ulrich UA, Sillem M, Oppelt P, Schweppe KW et al. The #Enzian classification: A comprehensive non-invasive and surgical description system for endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2021; 100(7):1165–75. doi: 10.1111/aogs.14099.
43. Abrao MS, Andres MP, Miller CE, Gingold JA, Rius M, Neto JS et al. AAGL 2021 Endometriosis Classification: An Anatomy-based Surgical Complexity Score. *J Minim Invasive Gynecol* 2021; 28(11):1941-1950.e1. doi: 10.1016/j.jmig.2021.09.709.
44. Hickey M, Ballard K, Farquhar C. Endometriosis. *BMJ* 2014; 348:g1752. doi: 10.1136/bmj.g1752.
45. Adamson GD, Pasta DJ. Endometriosis fertility index: the new, validated endometriosis staging system. *Fertil Steril* 2010; 94(5):1609–15. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.09.035.
46. Gruber TM, Mechsner S. Pathogenesis of Endometriosis: The Origin of Pain and Subfertility. *Cells* 2021; 10(6). doi: 10.3390/cells10061381.
47. Regine Gätje, Christine Eberle, Christoph Scholz, Marion Lübke, Christine Solbach. *Kurzlehrbuch Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2. Aufl.: Thieme; 2015.
48. Amro B, Ramirez Aristondo ME, Alsuwaidi S, Almaamari B, Hakim Z, Tahlak M et al. New Understanding of Diagnosis, Treatment and Prevention of Endometriosis. *Int J Environ Res Public Health* 2022; 19(11). doi: 10.3390/ijerph19116725.
49. Koninckx PR, Ussia A, Adamyan L, Wattiez A, Gomel V, Martin DC. Pathogenesis of endometriosis: the genetic/epigenetic theory. *Fertil Steril* 2019; 111(2):327–40. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.10.013.
50. Mechsner S. Ganzheitliche Behandlung der Endometriose. *Schmerz* 2023; 37(6):437–47. doi: 10.1007/s00482-023-00747-0.

51. Bonavina G, Taylor HS. Endometriosis-associated infertility: From pathophysiology to tailored treatment. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022; 13:1020827. doi: 10.3389/fendo.2022.1020827.
52. Filip L, Duică F, Prădatu A, Crețoiu D, Suci N, Crețoiu SM et al. Endometriosis Associated Infertility: A Critical Review and Analysis on Etiopathogenesis and Therapeutic Approaches. *Medicina (Kaunas)* 2020; 56(9). doi: 10.3390/medicina56090460.
53. Purusothaman V, Garneau AS, Goodman LR. Live and let DIE: a closer look at deep infiltrating endometriosis. *Fertil Steril* 2021; 115(4):913–4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.02.034.
54. Chandel PK, Maurya PK, Hussain S, Vashistha D, Sharma S. Endometriosis and Depression: A Double Agony for Women. *Ann Neurosci* 2023; 30(3):205–9. doi: 10.1177/09727531231152022.
55. Warzecha D, Szymusik I, Wielgos M, Pietrzak B. The Impact of Endometriosis on the Quality of Life and the Incidence of Depression-A Cohort Study. *Int J Environ Res Public Health* 2020; 17(10). doi: 10.3390/ijerph17103641.
56. Gold SM, Köhler-Forsberg O, Moss-Morris R, Mehnert A, Miranda JJ, Bullinger M et al. Comorbid depression in medical diseases. *Nat Rev Dis Primers* 2020; 6(1):69. doi: 10.1038/s41572-020-0200-2.
57. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14(4):422–69. doi: 10.1016/S0002-9378(15)30003-X.
58. Yovich JL, Rowlands PK, Lingham S, Sillender M, Srinivasan S. Pathogenesis of endometriosis: Look no further than John Sampson. *Reprod Biomed Online* 2020; 40(1):7–11. doi: 10.1016/j.rbmo.2019.10.007.
59. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 64(2):151–4.
60. Bulun SE. Endometriosis caused by retrograde menstruation: now demonstrated by DNA evidence. *Fertil Steril* 2022; 118(3):535–6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2022.07.012.
61. Sampson JA. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation*. *Am J Pathol* 1927; 3(2):93-110.43.
62. Rosenfeld DL, Lecher BD. Endometriosis in a patient with Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 139(1):105. doi: 10.1016/0002-9378(81)90418-x.

63. Cho MK, Kim CH, Oh ST. Endometriosis in a patient with Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *J Obstet Gynaecol Res* 2009; 35(5):994–6. doi: 10.1111/j.1447-0756.2009.01025.x.
64. Morcel K, Camborieux L, Guerrier D. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2007; 2:13. doi: 10.1186/1750-1172-2-13.
65. Lamceva J, Uljanovs R, Strumfa I. The Main Theories on the Pathogenesis of Endometriosis. *Int J Mol Sci* 2023; 24(5). doi: 10.3390/ijms24054254.
66. Maruyama T. A Revised Stem Cell Theory for the Pathogenesis of Endometriosis. *J Pers Med* 2022; 12(2). doi: 10.3390/jpm12020216.
67. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2012; 98(3):511–9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.029.
68. Bulun SE, Monsavais D, Pavone ME, Dyson M, Xue Q, Attar E et al. Role of estrogen receptor- β in endometriosis. *Semin Reprod Med* 2012; 30(1):39–45. doi: 10.1055/s-0031-1299596.
69. Hapangama DK, Kamal AM, Bulmer JN. Estrogen receptor β : the guardian of the endometrium. *Hum Reprod Update* 2015; 21(2):174–93. doi: 10.1093/humupd/dmu053.
70. Trukhacheva E, Lin Z, Reierstad S, Cheng Y-H, Milad M, Bulun SE. Estrogen receptor (ER) beta regulates ERalpha expression in stromal cells derived from ovarian endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(2):615–22. doi: 10.1210/jc.2008-1466.
71. Monnin N, Fattet AJ, Koscinski I. Endometriosis: Update of Pathophysiology, (Epi) Genetic and Environmental Involvement. *Biomedicines* 2023; 11(3). doi: 10.3390/biomedicines11030978.
72. Zhang P, Wang G. Progesterone Resistance in Endometriosis: Current Evidence and Putative Mechanisms. *Int J Mol Sci* 2023; 24(8). doi: 10.3390/ijms24086992.
73. Shi J-L, Zheng Z-M, Chen M, Shen H-H, Li M-Q, Shao J. IL-17: an important pathogenic factor in endometriosis. *Int J Med Sci* 2022; 19(4):769–78. doi: 10.7150/ijms.71972.
74. Jiang L, Yan Y, Liu Z, Wang Y. Inflammation and endometriosis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2016; 21(5):941–8. doi: 10.2741/4431.
75. Lai Z-Z, Yang H-L, Ha S-Y, Chang K-K, Mei J, Zhou W-J et al. Cyclooxygenase-2 in Endometriosis. *Int J Biol Sci* 2019; 15(13):2783–97. doi: 10.7150/ijbs.35128.
76. Liu Y, Wang J, Zhang X. An Update on the Multifaceted Role of NF-kappaB in Endometriosis. *Int. J. Biol. Sci.* 2022; 18(11):4400–13. doi: 10.7150/ijbs.72707.

77. Horie S, Harada T, Mitsunari M, Taniguchi F, Iwabe T, Terakawa N. Progesterone and progestational compounds attenuate tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 production via nuclear factor kappa B inactivation in endometriotic stromal cells. *Fertil Steril* 2005; 83(5):1530–5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.11.042.
78. Zhang H, Li M, Wang F, Liu S, Li J, Wen Z et al. Endometriotic epithelial cells induce MMPs expression in endometrial stromal cells via an NFkappaB-dependent pathway. *Gynecol Endocrinol* 2010; 26(6):456–67. doi: 10.3109/09513590903366988.
79. Béliard A, Donnez J, Nisolle M, Foidart JM. Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril* 1997; 67(2):266–72. doi: 10.1016/S0015-0282(97)81909-7.
80. Kvaskoff M, Mahamat-Saleh Y, Farland LV, Shigesu N, Terry KL, Harris HR et al. Endometriosis and cancer: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2021; 27(2):393–420. doi: 10.1093/humupd/dmaa045.
81. Králíčková M, Losan P, Vetvicka V. Endometriosis and cancer. *Womens Health (Lond)* 2014; 10(6):591–7. doi: 10.2217/whe.14.43.
82. Wang S, Qiu L, Lang JH, Shen K, Yang JX, Huang HF et al. Clinical analysis of ovarian epithelial carcinoma with coexisting pelvic endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 2013; 208(5):413.e1-5. doi: 10.1016/j.ajog.2012.12.004.
83. Bulun SE, Wan Y, Matei D. Epithelial Mutations in Endometriosis: Link to Ovarian Cancer. *Endocrinology* 2019; 160(3):626–38. doi: 10.1210/en.2018-00794.
84. 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 Rep* 2018; 24(7):1777–89. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.037.
85. Králíčková M, Laganà AS, Ghezzi F, Vetvicka V. Endometriosis and risk of ovarian cancer: what do we know? *Arch Gynecol Obstet* 2020; 301(1):1–10. doi: 10.1007/s00404-019-05358-8.
86. Zhang C, Miller CL, Brown EM, Yang JJ. The calcium sensing receptor: from calcium sensing to signaling. *Sci China Life Sci* 2015; 58(1):14–27. doi: 10.1007/s11427-014-4779-y.
87. Gorvin CM. Molecular and clinical insights from studies of calcium-sensing receptor mutations. *J Mol Endocrinol* 2019; 63(2):R1-R16. doi: 10.1530/JME-19-0104.
88. Hannan FM, Kallay E, Chang W, Brandi ML, Thakker RV. The calcium-sensing receptor in physiology and in calcitropic and noncalcitropic diseases. *Nat Rev Endocrinol* 2018; 15(1):33–51. doi: 10.1038/s41574-018-0115-0.

89. Molostvov G, Fletcher S, Bland R, Zehnder D. Extracellular calcium-sensing receptor mediated signalling is involved in human vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis. *Cell Physiol Biochem* 2008; 22(5-6):413–22. doi: 10.1159/000185484.
90. Schepelmann M, Yarova PL, Lopez-Fernandez I, Davies TS, Brennan SC, Edwards PJ et al. The vascular Ca²⁺-sensing receptor regulates blood vessel tone and blood pressure. *Am J Physiol Cell Physiol* 2016; 310(3):C193-204. doi: 10.1152/ajpcell.00248.2015.
91. Ruat M, Traiffort E. Roles of the calcium sensing receptor in the central nervous system. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013; 27(3):429–42. doi: 10.1016/j.beem.2013.03.001.
92. Dufner MM, Kirchhoff P, Remy C, Hafner P, Müller MK, Cheng SX et al. The calcium-sensing receptor acts as a modulator of gastric acid secretion in freshly isolated human gastric glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289(6):G1084-90. doi: 10.1152/ajpgi.00571.2004.
93. Feng J, Petersen CD, Coy DH, Jiang J-K, Thomas CJ, Pollak MR et al. Calcium-sensing receptor is a physiologic multimodal chemosensor regulating gastric G-cell growth and gastrin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(41):17791–6. doi: 10.1073/pnas.1009078107.
94. Cheng SX, Lightfoot YL, Yang T, Zadeh M, Tang L, Sahay B et al. Epithelial CaSR deficiency alters intestinal integrity and promotes proinflammatory immune responses. *FEBS Lett* 2014; 588(22):4158–66. doi: 10.1016/j.febslet.2014.05.007.
95. Geibel J, Sritharan K, Geibel R, Geibel P, Persing JS, Seeger A et al. Calcium-sensing receptor abrogates secretagogue- induced increases in intestinal net fluid secretion by enhancing cyclic nucleotide destruction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(25):9390–7. doi: 10.1073/pnas.0602996103.
96. Tennakoon S, Aggarwal A, Kállay E. The calcium-sensing receptor and the hallmarks of cancer. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863(6 Pt B):1398–407. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.11.017.
97. Chavez-Abiega S, Mos I, Centeno PP, Elajnaf T, Schlattl W, Ward DT et al. Sensing Extracellular Calcium - An Insight into the Structure and Function of the Calcium-Sensing Receptor (CaSR). *Adv Exp Med Biol* 2020; 1131:1031–63. doi: 10.1007/978-3-030-12457-1_41.
98. 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. *Front Oncol* 2020; 10:69. doi: 10.3389/fonc.2020.00069.

99. Liu L, Fan Y, Chen Z, Zhang Y, Yu J. CaSR Induces Osteoclast Differentiation and Promotes Bone Metastasis in Lung Adenocarcinoma. *Front Oncol* 2020; 10:305. doi: 10.3389/fonc.2020.00305.
100. 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. doi: 10.1038/s41598-018-19286-1.
101. Hendy GN, Canaff L, Cole DEC. The CASR gene: alternative splicing and transcriptional control, and calcium-sensing receptor (CaSR) protein: structure and ligand binding sites. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013; 27(3):285–301. doi: 10.1016/j.beem.2013.02.009.
102. Conigrave AD, Ward DT. Calcium-sensing receptor (CaSR): pharmacological properties and signaling pathways. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013; 27(3):315–31. doi: 10.1016/j.beem.2013.05.010.
103. 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. doi: 10.3389/fphys.2016.00441.
104. Muñoz-Torres M, García-Martín A. Hiperparatiroidismo primario. *Med Clin (Barc)* 2018; 150(6):226–32. doi: 10.1016/j.medcli.2017.07.020.
105. Nemeth EF. The search for calcium receptor antagonists (calcilytics). *J Mol Endocrinol* 2002; 29(1):15–21. doi: 10.1677/jme.0.0290015.
106. Nemeth EF, Delmar EG, Heaton WL, Miller MA, Lambert LD, Conklin RL et al. Calcilytic compounds: potent and selective Ca²⁺ receptor antagonists that stimulate secretion of parathyroid hormone. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299(1):323–31.
107. Miedlich SU, Gama L, Seuwen K, Wolf RM, Breitwieser GE. Homology modeling of the transmembrane domain of the human calcium sensing receptor and localization of an allosteric binding site. *J Biol Chem* 2004; 279(8):7254–63. doi: 10.1074/jbc.M307191200.
108. Wen T, Wang Z, Chen X, Ren Y, Lu X, Xing Y et al. Structural basis for activation and allosteric modulation of full-length calcium-sensing receptor. *Sci Adv* 2021; 7(23). doi: 10.1126/sciadv.abg1483.
109. Widler L. Calcilytics: antagonists of the calcium-sensing receptor for the treatment of osteoporosis. *Future Med Chem* 2011; 3(5):535–47. doi: 10.4155/fmc.11.17.

110. Xiang Z-Y, Tao D-D. The role of calcium-sensitive receptor in ovalbumin-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in juvenile mice with asthma. *Kaohsiung J Med Sci* 2022; 38(12):1203–12. doi: 10.1002/kjm2.12601.
111. Wang S, Qiu L, Song H, Dang N. NPS - 2143 (hydrochloride) inhibits melanoma cancer cell proliferation and induces autophagy and apoptosis. *Med Sci (Paris)* 2018; 34 Focus issue F1:87–93. doi: 10.1051/medsci/201834f115.
112. Peter C. Heinrich, Matthias Müller, Lutz Graeve. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Aufl.: Springer; 2014.
113. Brown EM, MacLeod RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 2001; 81(1):239–97. doi: 10.1152/physrev.2001.81.1.239.
114. Müller-Esterl W. *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 3. Aufl.: Springer; 2018.
115. Thomsen ARB, Hvidtfeldt M, Bräuner-Osborne H. Biased agonism of the calcium-sensing receptor. *Cell Calcium* 2012; 51(2):107–16. doi: 10.1016/j.ceca.2011.11.009.
116. Leach K, Sexton PM, Christopoulos A, Conigrave AD. Engendering biased signalling from the calcium-sensing receptor for the pharmacotherapy of diverse disorders. *Br J Pharmacol* 2014; 171(5):1142–55. doi: 10.1111/bph.12420.
117. Ersahin T, Tuncbag N, Cetin-Atalay R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol Biosyst* 2015; 11(7):1946–54. doi: 10.1039/c5mb00101c.
118. Zhao W, Zhang Z, Zheng L, You C, Chi H, Zhang T et al. Calcium-sensing receptor activating ERK1/2 and PI3K-Akt pathways to induce the proliferation of osteosarcoma cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2020; 47(3):517–9. doi: 10.1111/1440-1681.13209.
119. Chiu Y-C, Lin Y-H, Chen Y-W, Kuo T-Y, Shie M-Y. Additive manufacturing of barium-doped calcium silicate/poly- ϵ -caprolactone scaffolds to activate CaSR and AKT signalling and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Mater Chem B* 2023; 11(21):4666–76. doi: 10.1039/d3tb00208j.
120. Markworth R, Adolfs Y, Dambeck V, Steinbeck LM, Lizé M, Pasterkamp RJ et al. Sensory Axon Growth Requires Spatiotemporal Integration of CaSR and TrkB Signaling. *J Neurosci* 2019; 39(30):5842–60. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0027-19.2019.
121. Glaviano A, Foo ASC, Lam HY, Yap KCH, Jacot W, Jones RH et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Mol Cancer* 2023; 22(1):138. doi: 10.1186/s12943-023-01827-6.

122. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007; 129(7):1261–74. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.009.
123. Szwed A, Kim E, Jacinto E. Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2. *Physiol Rev* 2021; 101(3):1371–426. doi: 10.1152/physrev.00026.2020.
124. Driva TS, Schatz C, Haybaeck J. Endometriosis-Associated Ovarian Carcinomas: How PI3K/AKT/mTOR Pathway Affects Their Pathogenesis. *Biomolecules* 2023; 13(8). doi: 10.3390/biom13081253.
125. Zhang H, Li M, Zheng X, Sun Y, Wen Z, Zhao X. Endometriotic stromal cells lose the ability to regulate cell-survival signaling in endometrial epithelial cells in vitro. *Mol Hum Reprod* 2009; 15(10):653–63. doi: 10.1093/molehr/gap069.
126. Cinar O, Seval Y, Uz YH, Cakmak H, Ulukus M, Kayisli UA et al. Differential regulation of Akt phosphorylation in endometriosis. *Reprod Biomed Online* 2009; 19(6):864–71. doi: 10.1016/j.rbmo.2009.10.001.
127. Ma Y, Nicolet J. Specificity models in MAPK cascade signaling. *FEBS Open Bio* 2023; 13(7):1177–92. doi: 10.1002/2211-5463.13619.
128. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 2005; 15(1):11–8. doi: 10.1038/sj.cr.7290257.
129. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011; 75(1):50–83. doi: 10.1128/MMBR.00031-10.
130. Hobson SA, Wright J, Lee F, McNeil SE, Bilderback T, Rodland KD. Activation of the MAP kinase cascade by exogenous calcium-sensing receptor. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 200(1-2):189–98. doi: 10.1016/s0303-7207(01)00749-3.
131. Lee JJ, Alzamil J, Rehman S, Pan W, Dimke H, Alexander RT. Activation of the calcium sensing receptor increases claudin-14 expression via a PLC -p38-Sp1 pathway. *FASEB J* 2021; 35(11):e21982. doi: 10.1096/fj.202002137RRR.
132. Guo Y-J, Pan W-W, Liu S-B, Shen Z-F, Xu Y, Hu L-L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med* 2020; 19(3):1997–2007. doi: 10.3892/etm.2020.8454.
133. Park J-I. MAPK-ERK Pathway. *Int J Mol Sci* 2023; 24(11). doi: 10.3390/ijms24119666.
134. Lavoie H, Gagnon J, Therrien M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21(10):607–32. doi: 10.1038/s41580-020-0255-7.

135. Samson SC, Khan AM, Mendoza MC. ERK signaling for cell migration and invasion. *Front Mol Biosci* 2022; 9:998475. doi: 10.3389/fmolb.2022.998475.
136. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 2010; 429(3):403–17. doi: 10.1042/BJ20100323.
137. Coulthard LR, White DE, Jones DL, McDermott MF, Burchill SA. p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends Mol Med* 2009; 15(8):369–79. doi: 10.1016/j.molmed.2009.06.005.
138. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 2000; 12(1):1–13. doi: 10.1016/s0898-6568(99)00071-6.
139. Tan Y, Rouse J, Zhang A, Cariati S, Cohen P, Comb MJ. FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *The EMBO Journal* 1996; 15(17):4629–42. doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00840.x.
140. Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19(2):142–9. doi: 10.1016/j.ceb.2007.02.001.
141. Zeke A, Misheva M, Reményi A, Bogoyevitch MA. JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiol Mol Biol Rev* 2016; 80(3):793–835. doi: 10.1128/MMBR.00043-14.
142. Bogoyevitch MA, Kobe B. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70(4):1061–95. doi: 10.1128/MMBR.00025-06.
143. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4. Aufl.: Garland Science; 2002.
144. Su C, Mo J, Dong S, Liao Z, Zhang B, Zhu P. Integrin β -1 in disorders and cancers: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Cell Commun Signal* 2024; 22(1):71. doi: 10.1186/s12964-023-01338-3.
145. Tharmalingam S, Hampson DR. The Calcium-Sensing Receptor and Integrins in Cellular Differentiation and Migration. *Front Physiol* 2016; 7:190. doi: 10.3389/fphys.2016.00190.
146. Morrow SA, Clift F, Devonshire V, Lapointe E, Schneider R, Stefanelli M et al. Use of natalizumab in persons with multiple sclerosis: 2022 update. *Mult Scler Relat Disord* 2022; 65:103995. doi: 10.1016/j.msard.2022.103995.

147. Loftus EV, Feagan BG, Panaccione R, Colombel J-F, Sandborn WJ, Sands BE et al. Long-term safety of vedolizumab for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2020; 52(8):1353–65. doi: 10.1111/apt.16060.
148. Liu F, Wu Q, Dong Z, Liu K. Integrins in cancer: Emerging mechanisms and therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther* 2023; 247:108458. doi: 10.1016/j.pharmthera.2023.108458.
149. Grimm TM, Dierdorf NI, Betz K, Paone C, Hauck CR. PPM1F controls integrin activity via a conserved phospho-switch. *J Cell Biol* 2020; 219(12). doi: 10.1083/jcb.202001057.
150. Anthis NJ, Haling JR, Oxley CL, Memo M, Wegener KL, Lim CJ et al. Beta integrin tyrosine phosphorylation is a conserved mechanism for regulating talin-induced integrin activation. *J Biol Chem* 2009; 284(52):36700–10. doi: 10.1074/jbc.M109.061275.
151. Duan R, Wang Y, Lin A, Lian L, Cao H, Gu W et al. Expression of nm23-H1, p53, and integrin β 1 in endometriosis and their clinical significance. *Int J Clin Exp Pathol* 2020; 13(5):1024–9.
152. Joshi NR, Kohan-Ghadr H-R, Roqueiro DS, Yoo JY, Fru K, Hestermann E et al. Genetic and epigenetic changes in the eutopic endometrium of women with endometriosis: association with decreased endometrial $\alpha\beta$ 3 integrin expression. *Mol Hum Reprod* 2021; 27(6). doi: 10.1093/molehr/gaab018.
153. Tang X, Li Q, Li L, Jiang J. Expression of Talin-1 in endometriosis and its possible role in pathogenesis. *Reprod Biol Endocrinol* 2021; 19(1):42. doi: 10.1186/s12958-021-00725-0.
154. Choi H-J, Park M-J, Kim B-S, Choi H-J, Joo B, Lee KS et al. Transforming growth factor β 1 enhances adhesion of endometrial cells to mesothelium by regulating integrin expression. *BMB Rep* 2017; 50(8):429–34. doi: 10.5483/bmbrep.2017.50.8.097.
155. Alqudah MAY, Azaizeh M, Zayed A, Asaad L. Calcium-Sensing Receptor Antagonist NPS-2143 Inhibits Breast Cancer cell Proliferation, Migration and Invasion via Downregulation of p-ERK1/2, Bcl-2 and Integrin β 1 and Induces Caspase 3/7 Activation. *Adv Pharm Bull* 2022; 12(2):383–8. doi: 10.34172/apb.2022.037.
156. Tharmalingam S, Daulat AM, Antflick JE, Ahmed SM, Nemeth EF, Angers S et al. Calcium-sensing receptor modulates cell adhesion and migration via integrins. *J Biol Chem* 2011; 286(47):40922–33. doi: 10.1074/jbc.M111.265454.
157. 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. *Am J Pathol* 2001; 159(5):1839–52. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63030-1.

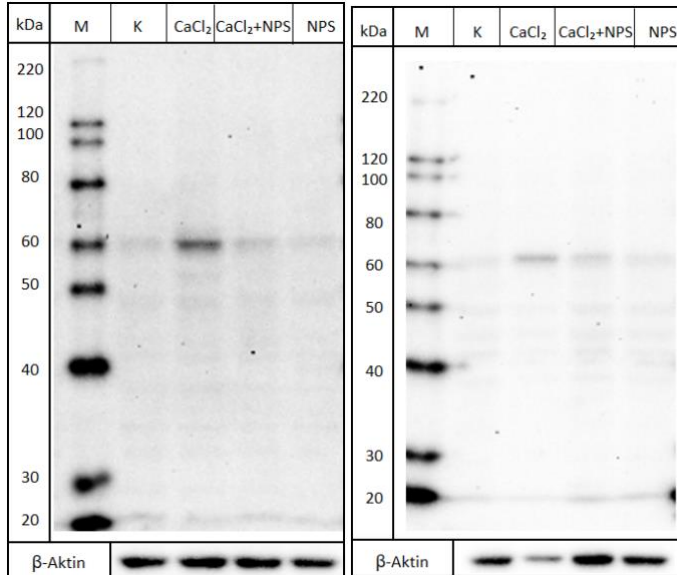
158. Guo W, Qiu W, Ao X, Li W, He X, Ao L et al. Low-concentration DMSO accelerates skin wound healing by Akt/mTOR-mediated cell proliferation and migration in diabetic mice. *Br J Pharmacol* 2020; 177(14):3327–41. doi: 10.1111/bph.15052.
159. Frees S, Breuksch I, Haber T, Bauer H-K, Chavez-Munoz C, Raven P et al. Calcium-sensing receptor (CaSR) promotes development of bone metastasis in renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2018; 9(21):15766–79. doi: 10.18632/oncotarget.24607.
160. Xie R, Xu J, Xiao Y, Wu J, Wan H, Tang B et al. Calcium Promotes Human Gastric Cancer via a Novel Coupling of Calcium-Sensing Receptor and TRPV4 Channel. *Cancer Res* 2017; 77(23):6499–512. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0360.
161. Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813(11):1978–86. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.03.010.
162. Geng Y, Zuo P, Li X-O, Zhang L. PODNL1 promotes cell proliferation and migration in glioma via regulating Akt/mTOR pathway. *J Cancer* 2020; 11(21):6234–42. doi: 10.7150/jca.46901.
163. Takeda T, Yamamoto Y, Tsubaki M, Matsuda T, Kimura A, Shimo N et al. PI3K/Akt/YAP signaling promotes migration and invasion of DLD-1 colorectal cancer cells. *Oncol Lett* 2022; 23(4):106. doi: 10.3892/ol.2022.13226.
164. Chin YR, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell Signal* 2009; 21(4):470–6. doi: 10.1016/j.cellsig.2008.11.015.
165. He X, Li Y, Deng B, Lin A, Zhang G, Ma M et al. The PI3K/AKT signalling pathway in inflammation, cell death and glial scar formation after traumatic spinal cord injury: Mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Prolif* 2022; 55(9):e13275. doi: 10.1111/cpr.13275.
166. Kim TH, Yu Y, Luo L, Lydon JP, Jeong J-W, Kim JJ. Activated AKT pathway promotes establishment of endometriosis. *Endocrinology* 2014; 155(5):1921–30. doi: 10.1210/en.2013-1951.
167. Yin X, Pavone ME, Lu Z, Wei J, Kim JJ. Increased activation of the PI3K/AKT pathway compromises decidualization of stromal cells from endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(1):E35-43. doi: 10.1210/jc.2011-1527.
168. Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12(18):5268–72. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1554.

169. Hua K, Feng W, Cao Q, Zhou X, Lu X, Feng Y. Estrogen and progesterin regulate metastasis through the PI3K/AKT pathway in human ovarian cancer. *Int J Oncol* 2008; 33(5):959–67.
170. Vizard TN, Newton M, Howard L, Wyatt S, Davies AM. ERK signaling mediates CaSR-promoted axon growth. *Neurosci Lett* 2015; 603:77–83. doi: 10.1016/j.neulet.2015.07.019.
171. Mizumachi H, Yoshida S, Tomokiyo A, Hasegawa D, Hamano S, Yuda A et al. Calcium-sensing receptor-ERK signaling promotes odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *Bone* 2017; 101:191–201. doi: 10.1016/j.bone.2017.05.012.
172. Pi M, Zhang L, Lei S-F, Huang M-Z, Zhu W, Zhang J et al. Impaired osteoblast function in GPRC6A null mice. *J Bone Miner Res* 2010; 25(5):1092–102. doi: 10.1359/jbmr.091037.
173. Pi M, Quarles LD. GPRC6A regulates prostate cancer progression. *Prostate* 2012; 72(4):399–409. doi: 10.1002/pros.21442.
174. Zhao X, Li X, Liu P, Li P, Xu X, Chen Y et al. 17 β -estradiol promotes angiogenesis through non-genomic activation of Smad1 signaling in endometriosis. *Vascul Pharmacol* 2022; 142:106932. doi: 10.1016/j.vph.2021.106932.
175. Zhang Z-L, Li Z-R, Li J-S, Wang S-R. Calcium-sensing receptor antagonist NPS-2143 suppresses proliferation and invasion of gastric cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2020; 27(7-8):548–57. doi: 10.1038/s41417-019-0128-4.
176. Kaslick RS, Chasens AI, Mandel ID, Weinstein D, Waldman R, Pluhar T et al. Quantitative analysis of sodium, potassium and calcium in gingival fluid from gingiva in varying degrees of inflammation. *J Periodontol* 1970; 41(2):93–7. doi: 10.1902/jop.1970.41.2.93.
177. Lin CY, Huang TP. Enhancement of ionized calcium and 1,25-dihydroxycholecalciferol loss from peritoneal fluid during peritonitis in patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 1991; 59(1):90–5. doi: 10.1159/000186525.
178. Iamartino L, Brandi ML. The calcium-sensing receptor in inflammation: Recent updates. *Front Physiol* 2022; 13:1059369. doi: 10.3389/fphys.2022.1059369.
179. Murphey ED, Chattopadhyay N, Bai M, Kifor O, Harper D, Traber DL et al. Up-regulation of the parathyroid calcium-sensing receptor after burn injury in sheep: a potential contributory factor to postburn hypocalcemia. *Crit Care Med* 2000; 28(12):3885–90. doi: 10.1097/00003246-200012000-00024.
180. Canaff L, Zhou X, Hendy GN. The proinflammatory cytokine, interleukin-6, up-regulates calcium-sensing receptor gene transcription via Stat1/3 and Sp1/3. *J Biol Chem* 2008; 283(20):13586–600. doi: 10.1074/jbc.M708087200.

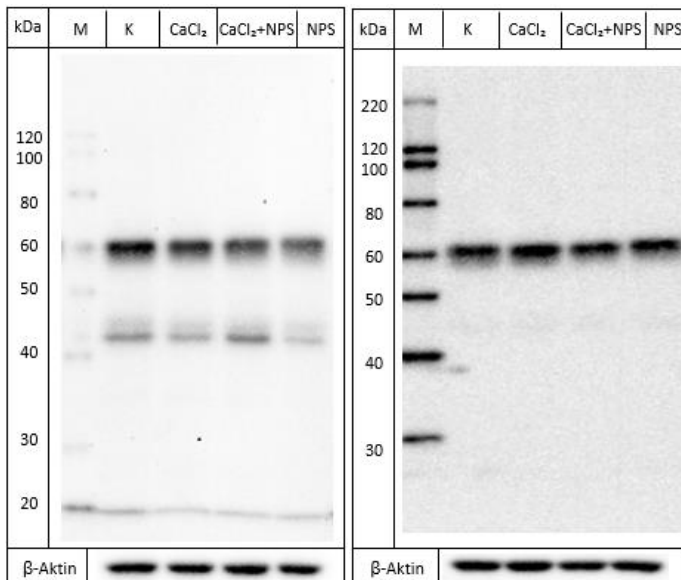
181. Canaff L, Hendy GN. Calcium-sensing receptor gene transcription is up-regulated by the proinflammatory cytokine, interleukin-1beta. Role of the NF-kappaB PATHWAY and kappaB elements. *J Biol Chem* 2005; 280(14):14177–88. doi: 10.1074/jbc.M408587200.
182. Ying H, Zhang Z, Wang W, Yang Z, You C, Li Y et al. Inhibition of Calcium-Sensing Receptor Alleviates Chronic Intermittent Hypoxia-Induced Cognitive Dysfunction via CaSR-PKC-ERK1/2 Pathway. *Mol Neurobiol* 2023; 60(4):2099–115. doi: 10.1007/s12035-022-03189-4.
183. Arosh JA, Lee J, Banu SK. Effects of dual inhibition of AKT and ERK1/2 pathways on endometrial pro-inflammatory, hormonal, and epigenetic microenvironment in endometriosis. *Mol Cell Endocrinol* 2022; 539:111446. doi: 10.1016/j.mce.2021.111446.
184. Romano A, Xanthoulea S, Giacomini E, Delvoux B, Alleva E, Vigano P. Endometriotic cell culture contamination and authenticity: a source of bias in in vitro research? *Hum Reprod* 2020; 35(2):364–76. doi: 10.1093/humrep/dez266.
185. Banu SK, Lee J, Starzinski-Powitz A, Arosh JA. Gene expression profiles and functional characterization of human immortalized endometriotic epithelial and stromal cells. *Fertil Steril* 2008; 90(4):972–87. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.07.1358.
186. Tosti C, Pinzauti S, Santulli P, Chapron C, Petraglia F. Pathogenetic Mechanisms of Deep Infiltrating Endometriosis. *Reprod Sci* 2015; 22(9):1053–9. doi: 10.1177/1933719115592713.
187. Song Y, Burns GW, Joshi NR, Arora R, Kim JJ, Fazleabas AT. Spheroids as a model for endometriotic lesions. *JCI Insight* 2023; 8(11). doi: 10.1172/jci.insight.160815.
188. Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J* 2014; 28(3):1317–30. doi: 10.1096/fj.13-235440.

8 Anhang

Zu 4.2. Expression und Aktivität von AKT

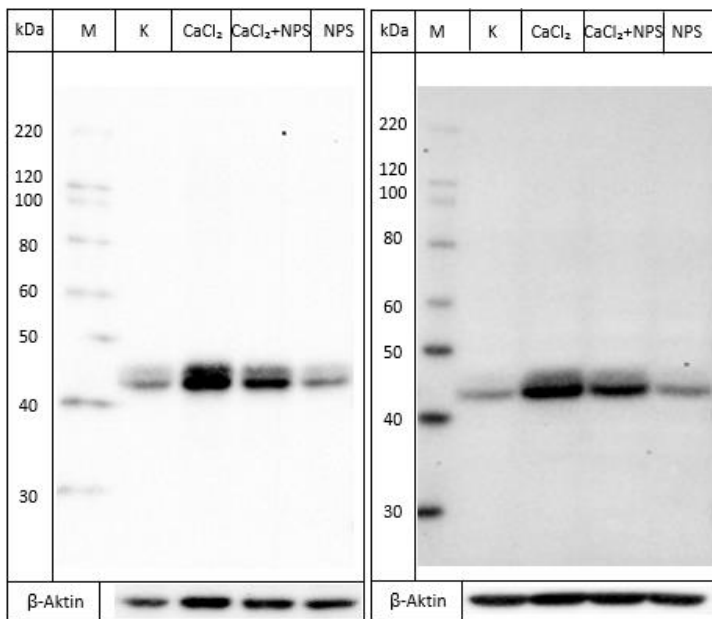


Western-Blot-Analyse von p-AKT von Proteinlysat 1 (links) und Proteinlysat 3 (rechts). Proteinlysat 2 unter Ergebnisse 4.2. abgebildet.

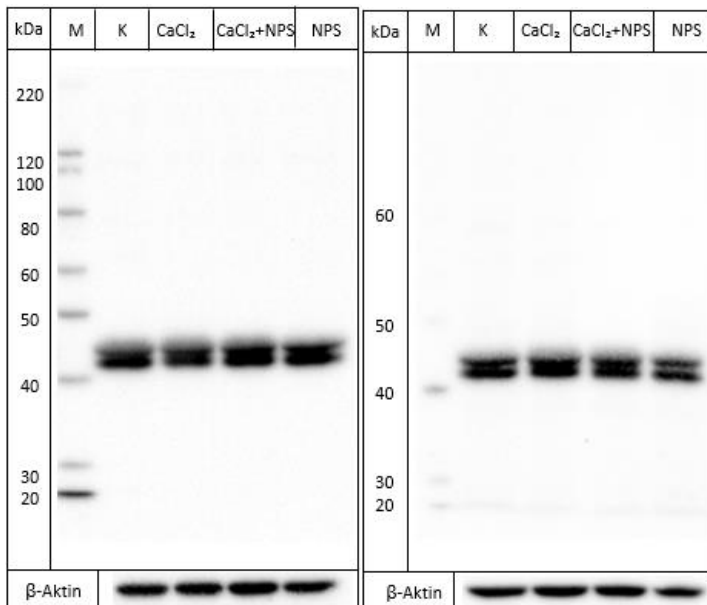


Western-Blot-Analyse von t-AKT von Proteinlysat 2 (links) und Proteinlysat 3 (rechts). Proteinlysat 1 unter Ergebnisse 4.2. abgebildet

Zu 4.3. Expression und Aktivität von ERK

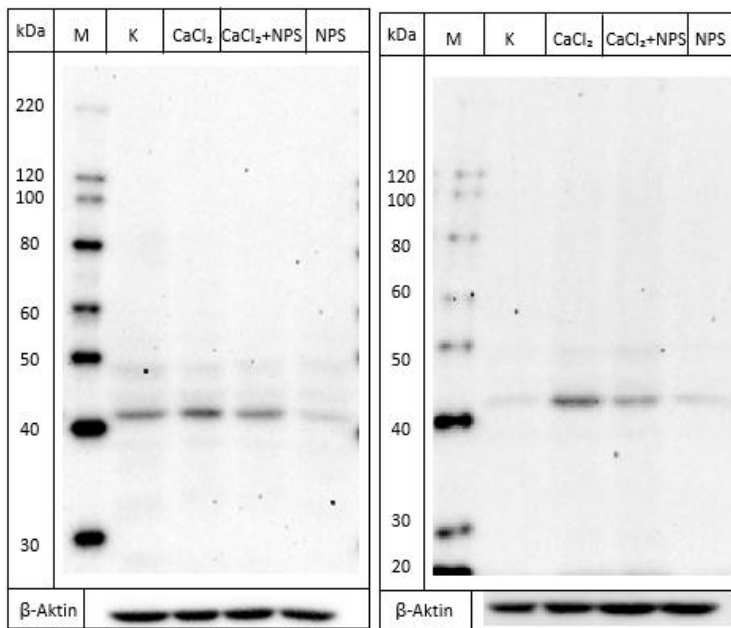


Western-Blot-Analyse von p-ERK Proteinlysat 2 (links) und Proteinlysat 3 (rechts). Proteinlysat 1 unter Ergebnisse 4.3. abgebildet.

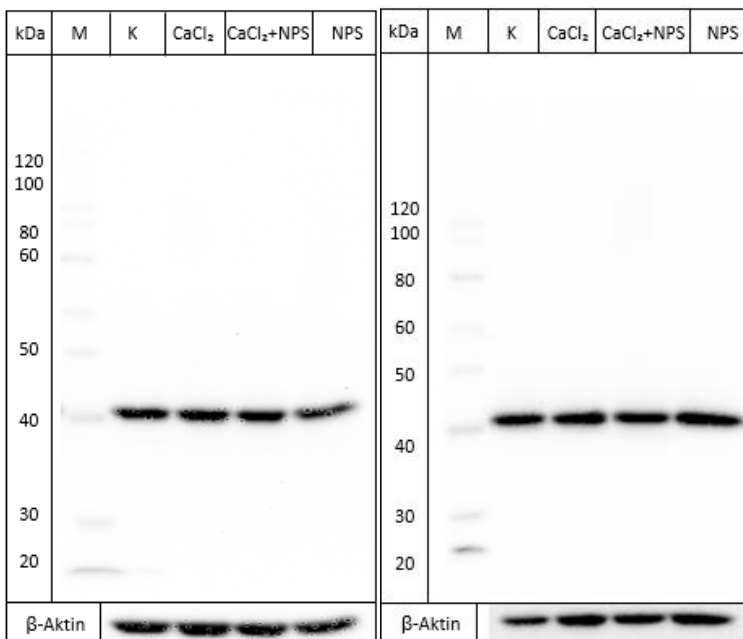


Western-Blot-Analyse t-ERK von Proteinlysat 2 (links) und Proteinlysat 3 (rechts). Proteinlysat 1 unter Ergebnisse 4.3. abgebildet.

Zu 4.4. Expression und Aktivität von p38

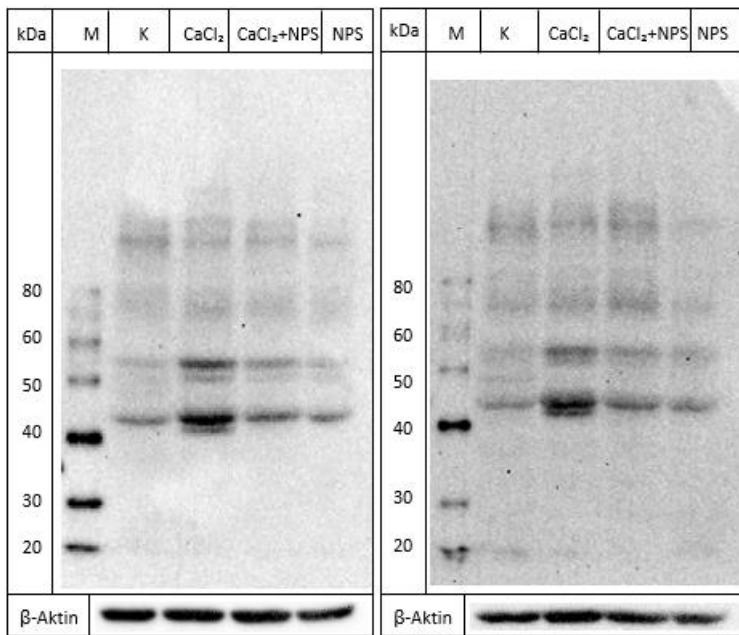


Western-Blot-Analyse p-p38 von Proteinlysat 2 (links) und Proteinlysat 3 (rechts). Proteinlysat 1 unter Ergebnisse 4.4. abgebildet.

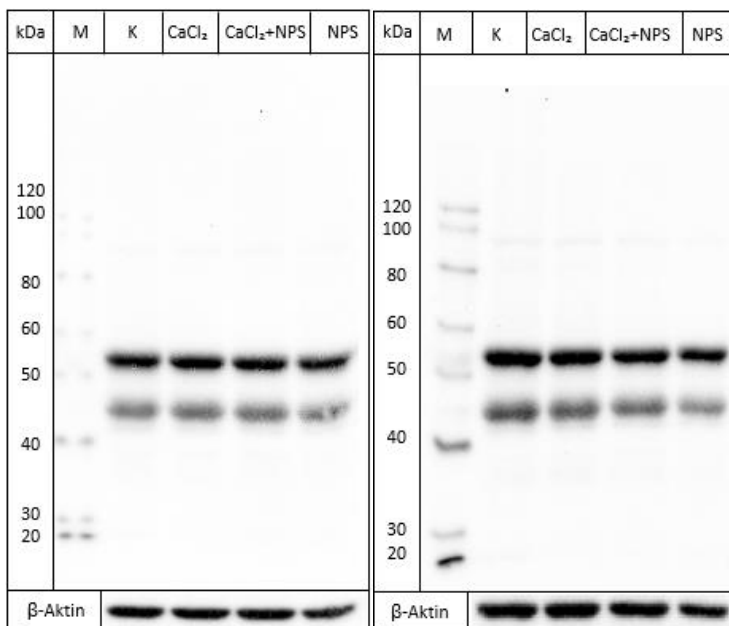


Western-Blot-Analyse von t-p38 von Proteinlysat 2 (links) und Proteinlysat 3 (rechts). Proteinlysat 1 unter Ergebnisse 4.4. abgebildet.

Zu 4.5. Expression und Aktivität von JNK

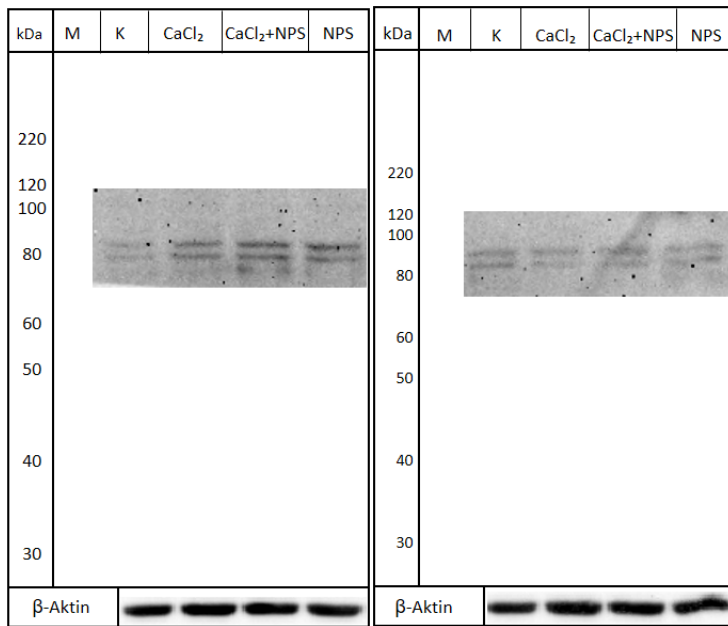


Western-Blot-Analyse von p-JNK von Proteinlysat 1 (links) und Proteinlysat 3 (rechts). Proteinlysat 2 unter Ergebnisse 4.5. abgebildet.

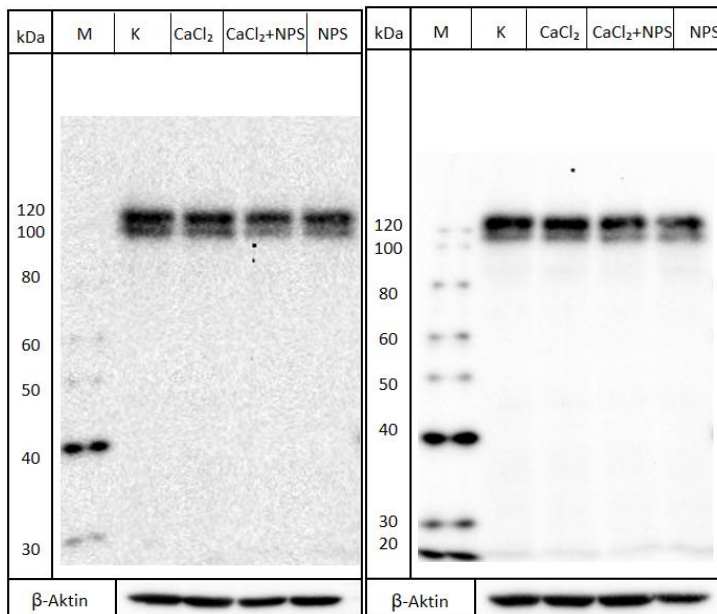


Western-Blot-Analyse von t-JNK von Proteinlysat 1 (links) und Proteinlysat 2 (rechts). Proteinlysat 3 unter Ergebnisse 4.5. abgebildet.

Zu 4.6. Expression und Aktivität von ITGB1



Western-Blot-Analyse von p-ITGB1 von Proteinlysat 2 (links) und Proteinlysat 3 (rechts). Proteinlysat 1 unter Ergebnisse 4.5. abgebildet.



Western-Blot-Analyse von t-ITGB1 von Proteinlysat 2 (links) und Proteinlysat 3 (rechts). Proteinlysat 1 unter Ergebnisse 4.5. abgebildet.

Auswertung der Expression von p-AKT und t-AKT

		Proteinlysat 1	Proteinlysat 2	Proteinlysat 3	Mittelwert	Standardabweichung	T-Test
p-AKT	Kontrolle	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	
	CaCl ₂	305,8	508,0	550,8	454,9	130,9	0,043
	CaCl ₂ +NPS	91,9	117,4	112,4	107,2	13,5	0,452
	NPS	77,2	59,5	93,7	76,8	17,1	0,143
t-AKT	Kontrolle	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	
	CaCl ₂	102,9	86,8	108,2	99,3	11,2	0,925
	CaCl ₂ +NPS	72,4	74,3	102,9	83,2	17,0	0,230
	NPS	97,4	78,1	100,6	92,0	12,2	0,373

Auswertung der Expression von p-ERK und t-ERK

		Proteinlysat 1	Proteinlysat 2	Proteinlysat 3	Mittelwert	Standardabweichung	T-Test
p-ERK	Kontrolle	100	100	100	100	0	
	CaCl ₂	338,8	217,3	290,5	282,2	61,2	0,036
	CaCl ₂ +NPS	207,6	152,3	222,8	194,3	37,1	0,048
	NPS	125,7	70,4	130,2	108,8	33,3	0,693
t-ERK	Kontrolle	100	100	100	100	0	
	CaCl ₂	114,6	86,8	92,4	97,9	14,7	0,829
	CaCl ₂ +NPS	109,0	95,2	86,5	96,9	11,3	0,684
	NPS	101,6	101,5	99,8	101,0	1,0	0,229

Auswertung der Expression von p-p38 und t-p38

		Proteinlysat 1	Proteinlysat 2	Proteinlysat 3	Mittelwert	Standardabweichung	T-Test
p-p38	Kontrolle	100	100,0	100,0	100,0	0	
	CaCl ₂	239,2	119,4	494,3	284,3	191,5	0,237
	CaCl ₂ +NPS	89,2	87,3	219,9	132,1	76	0,540
	NPS	107,6	37,2	88,6	77,8	36,4	0,402
t-p38	Kontrolle	100	100	100	100	0	
	CaCl ₂	98,9	97,3	68,2	88,3	17	0,356
	CaCl ₂ +NPS	87,3	99,4	72,1	86,3	13,7	0,224
	NPS	89	89,2	78,9	85,1	6,9	0,052

Auswertung der Expression von p-JNK und t-JNK

		Proteinlysat 1	Proteinlysat 2	Proteinlysat 3	Mittelwert	Standardabweichung	T-Test
p-JNK	Kontrolle	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	
	CaCl ₂	198,9	190,7	190,1	193,3	4,9	0,0009
	CaCl ₂ +NPS	104,5	105,6	123,1	111,1	10,4	0,2061
	NPS	90,3	93,2	72,2	85,3	11,4	0,1545
t-JNK	Kontrolle	100	100,0	100,0	100,0	0,0	
	CaCl ₂	105,771914	87,6	81,5	91,6	12,6	0,3699
	CaCl ₂ +NPS	103,46344	88,0	96,3	95,9	7,7	0,4561
	NPS	100,329707	78,2	108,7	95,7	15,7	0,6850

Auswertung der Expression von p-ITGB1 und t-ITGB1

		Proteinlysate 1	Proteinlysate 2	Proteinlysate 3	Mittelwert	Standardabweichung	T-Test
p-ITGB1	Kontrolle	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	
	CaCl ₂	59,7	94,0	66,2	73,3	18,2	0,1266
	CaCl ₂ +NPS	73,1	107,1	75,2	85,1	19,0	0,3084
	NPS	93,0	115,0	78,2	95,4	18,5	0,7088
t-ITGB1	Kontrolle	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	
	CaCl ₂	84,3	82,7	83,3	83,5	0,8	0,0008
	CaCl ₂ +NPS	82,7	80,3	71,1	78,0	6,1	0,0249
	NPS	88,3	75,6	87,1	83,7	7,0	0,0567

9 Danksagung

Ein herzliches Dankeschön möchte ich an das gesamte Laborteam der AG Brenner richten. Danke für die schöne gemeinsame Zeit, tatkräftige Unterstützung, die guten Gespräche zwischen den Versuchen und die wohlverdienten gemeinsamen Kaffeepausen.

Ganz besonders möchte ich natürlich Walburgis Brenner und Susanne Gebhard danken, die diese Doktorarbeit erst ermöglicht haben. Danke für das entspannte und konstruktive Miteinander. Danke für eure offenen Ohren und eure unermüdliche Zuversicht, vor allem wenn sie mir mal abhandeln kam!

Mein größter Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner für die bedingungslose Unterstützung auf meinem Weg.

Ich danke außerdem meinem Zweitgutachter Univ.-Prof. Dr. phil. nat. Oliver Krämer für seine Zeit und Mühe.