

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Prof. Dr. med. G. Emons)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Verstärkung der Antitumorwirkung von Estrogenantagonisten
durch die Kombination mit einem GnRH-II-Antagonisten, angewandt
an Zelllinien des Ovarialkarzinoms**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Stefanie Zierke, geb. Klöhn

aus

Hildesheim

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker

II. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Kube

III. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Johnsen

IV. Berichtserstatterin: Prof. Dr. M. Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Ovarialkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Histopathologie	2
1.1.3	Stadieneinteilung.....	2
1.1.4	Ätiologie	3
1.1.5	Risikofaktoren	4
1.1.6	Prognosefaktoren.....	4
1.1.7	Therapie des Ovarialkarzinoms	5
1.2	Die endokrinen Therapieansätze des Ovarialkarzinoms	7
1.2.1	Estrogen-Rezeptoren und bindende Substanzen	7
1.2.2	GnRH-Rezeptoren	11
1.2.3	Die Kombinationstherapie mit einem GnRH-II-Antagonisten und einem SERM bzw. einem reinen Antiestrogen	14
1.3	Zielsetzung und Fragestellung	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Geräte	16
2.1.2	Reagenzien	17
2.1.3	Puffer, Lösungen und andere verwendete Substanzen	17
2.1.4	Kulturmedien	19
2.1.1	Zelllinien.....	20
2.1.2	Oligonukleotide	21
2.1.3	Antikörper.....	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Zellkultur	23
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	26
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	29
2.2.4	Statistische Analysen	32

3	Ergebnisse.....	33
3.1	Einfluss von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Proliferationsfähigkeit humaner Ovarialkarzinomzellen.....	33
3.1.1	Proliferationsfähigkeit der Zelllinie OVCAR-3 nach Behandlung mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)].....	33
3.1.2	Proliferationsfähigkeit der Zelllinie SKOV-3 nach Behandlung mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)].....	35
3.1.3	Proliferationsfähigkeit der Zelllinie EFO-21 nach Behandlung mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)].....	36
3.1.4	Proliferationsfähigkeit der Zelllinie EFO-27 nach Behandlung mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)].....	39
3.1.5	Vergleich des Proliferationsverhaltens der Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3, EFO-21 und EFO-27 nach Behandlung mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)].....	40
3.2	Einfluss von Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Proliferationsfähigkeit humaner Ovarialkarzinomzellen.....	41
3.2.1	Proliferationsfähigkeit der Zelllinie OVCAR-3 nach Behandlung mit Fulvestrant und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)].....	41
3.2.2	Proliferationsfähigkeit der Zelllinie SKOV-3 nach Behandlung mit Fulvestrant und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)].....	42
3.2.3	Proliferationsfähigkeit der Zelllinie EFO-21 nach Behandlung mit Fulvestrant und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)].....	44
3.2.4	Proliferationsfähigkeit der Zelllinie EFO-27 nach Behandlung mit Fulvestrant und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)].....	45

3.2.5	Vergleich des Proliferationsverhaltens der Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3, EFO-21 und EFO-27 nach Behandlung mit Fulvestrant und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)].....	47
3.3	ER- α -Expression humaner Ovarialkarzinomzellen	48
3.3.1	Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die ER- α -mRNA-Expression von SKOV-3-Zellen	48
3.3.2	Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die ER- α -Protein-Expression in der Zelllinie EFO-27.....	49
3.4	ER- β -Expression humaner Ovarialkarzinomzellen	50
3.4.1	Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die ER- β -mRNA-Expression von SKOV-3-Zellen	50
3.4.2	Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die ER- β -mRNA-Expression von EFO-27-Zellen.....	51
3.5	GPR-30-Expression humaner Ovarialkarzinomzellen.....	53
3.5.1	Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die GPR-30-mRNA-Expression von SKOV-3-Zellen.....	53
3.5.2	Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die GPR-30-mRNA-Expression von EFO-27-Zellen	54
3.6	GnRH-II-Rezeptor-Expression humaner Ovarialkarzinomzellen	55
3.6.1	Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die GnRH-II-mRNA-Expression von SKOV-3-Zellen	56
3.6.2	Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die GnRH-II-mRNA-Expression von EFO-27-Zellen.....	57
3.7	Rezeptorexpression der Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3, eine zusammenfassende Übersicht.....	58

3.8	Rezeptorexpression der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-21, eine zusammenfassende Übersicht	60
3.9	Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Phosphorylierung der Apoptoseproteine p38 und JNK humaner Ovarialkarzinomzellen	62
3.9.1	Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Phosphorylierung des p38-Proteins von SKOV-3-Zellen	63
3.9.2	Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Phosphorylierung des p38-Proteins von EFO-27-Zellen	64
3.9.3	Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Phosphorylierung des JNK-Proteins von SKOV-3-Zellen.....	65
3.9.4	Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Phosphorylierung des JNK-Proteins von EFO-27-Zellen	69
3.10	Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Spaltung von Caspase-3 in humanen Ovarialkarzinomzellen.....	71
3.10.1	Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Spaltung von Caspase-3 in SKOV-3-Zellen	71
3.10.2	Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Spaltung von Caspase-3 in EFO-27-Zellen.....	72
4	Diskussion.....	73
4.1	Wirkung der Substanzen auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen und mögliche Signalwege	75
4.1.1	Der Kombinationseffekt von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist	76
4.2	Die Rezeptorexpression der untersuchten Zelllinien.....	77
4.2.1	Das Proliferations- und Rezeptorexpressionsverhalten der einzelnen Zelllinien nach Behandlung mit Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist.....	78

4.3	Auswirkung der Substanzen auf die Apoptoseproteine p38 und JNK und die Spaltung von Caspase-3.....	80
4.3.1	Wirkung der Substanzen auf das Verhältnis von phosphoryliertem p38 zu unphosphoryliertem p38 und von phosphoryliertem JNK zu unphosphoryliertem JNK ..	81
4.3.2	Wirkung der Substanzen auf die Spaltung von Caspase-3.....	82
4.4	Der prognostische Wert der Rezeptoren für das Ovarialkarzinom	83
4.4.1	Die ER- α -und ER- β -Expression als mögliche Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms.....	83
4.4.2	Die GPR-30-Expression als möglicher Prognosefaktor des Ovarialkarzinoms.	85
4.4.3	Die GnRH-II-Rezeptorexpression als möglicher Prognosefaktor des Ovarialkarzinoms.....	85
4.5	Fazit	86
5	Zusammenfassung	87
6	Literaturverzeichnis	89
7	Anhang.....	101
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	101
7.2	Tabellenverzeichnis.....	104
7.3	Abkürzungsverzeichnis	105
7.4	Aminosäurecode für natürliche Aminosäuren	108

1 Einleitung

1.1 *Das Ovarialkarzinom*

1.1.1 *Epidemiologie*

Das Ovarialkarzinom stellt weltweit einen der tödlichsten gynäkologischen Tumoren dar (Chen et al. 2007; Halon et al. 2011). Es zählt zu den fünfthäufigsten krebsassoziierten Todesursachen der Frauen in entwickelten Ländern (Choi et al. 2007). Im Jahr 2008 waren Ovarialtumoren die sechsthäufigste maligne Tumorerkrankung der Frau (Leitlinie Ovarialkarzinom 2013). Um 190.000 Neuerkrankungen und 114.000 durch das Ovarialkarzinom bedingte Todesfälle ereignen sich jährlich weltweit. Dabei verzeichnen Skandinavien und Osteuropa, die USA und Kanada die höchsten Erkrankungsraten (Halon et al. 2011; Nowak-Markwitz et al. 2010).

Das Risiko einer Frau, in ihrem Leben an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, beträgt 1,5 % (Leitlinie Ovarialkarzinom 2013). Das Ovarialkarzinom tritt vor allem bei postmenopausalen Frauen auf mit den meisten Fällen zwischen dem 50. und 75. Lebensjahr. Der Erkrankungsgipfel ist mit einer Erkrankungsrate von 61,5/100.000 Frauen in der Gruppe der 75- bis 79-jährigen erreicht (Rubin et al. 2011). Diese Zahlen zeigen, dass das Ovarialkarzinom einen sehr häufigen und bedrohlichen malignen Tumor darstellt, was durch die - trotz moderner Behandlungsmethoden - schlechte Prognose noch unterstrichen wird.

Nach Daten der *American Cancer Society* ist die 5-Jahres-Überlebensrate aller Ovarialkarzinome von 37 % in den mittleren 1970er Jahren auf 46 % in den mittleren 2000er Jahren angestiegen (Rubin et al. 2011). Dennoch hat das Ovarialkarzinom noch immer die schlechteste Überlebensrate unter den gynäkologischen Tumoren (Oberaigner et al. 2012). Es liegt nahe, dass die Forschung an neuen Behandlungsmöglichkeiten weiterhin wichtig und notwendig ist.

1.1.2 Histopathologie

Die Ovarialkarzinome werden entsprechend ihres Ursprungsgewebes von der *World Health Organization* (WHO) unterteilt in Karzinome des Oberflächenepithels aus Zölomepithel, in Keimzelltumoren und in mesenchymale Tumoren.

Die epithelialen Tumoren machen 80 % der bösartigen Tumoren des Ovars aus (Morgan et al. 2011). Diese werden weiterhin in seröse, muzinöse, endometrioide, klarzellige, Transitionalzell-Tumoren (Brennertumoren), Karzinosarkome, gemischte epitheliale Tumoren, undifferenzierte Karzinome und weitere Untergruppen eingeteilt (Kaku et al. 2003). 80-85 % aller Karzinome in den westlichen Ländern sind hierunter serös (Colombo et al. 2010).

1.1.3 Stadieneinteilung

Die prognostische Einteilung richtet sich nach der Ausbreitung des Tumors und erfolgt nach der FIGO- (**F**édération **I**nternationale de **G**ynécologie et d'**O**bstétrique) beziehungsweise der TNM-Einteilung: Die FIGO-Stadien werden durch ein klinisch-chirurgisches Staging ermittelt. Die TNM-Stadien basieren hingegen auf einer klinischen und/oder pathologischen Klassifikation und beurteilen den Tumor, die Lymphknoten (englisch: *lymphnodes*) und **Metastasen**.

TNM	FIGO	Befundsituation
T1	I	Tumor begrenzt auf Ovarien
T2	II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus
T3	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien, mit histologisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen
M1	IV	Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)

Tab. 2.1: Einteilung des Ovarialkarzinoms in FIGO- und TNM-Stadien nach: FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer, Gynecologic Oncology, 2014

Die FIGO-Stadien I und III werden jeweils noch weiter unterteilt in A bis C, das Stadium II wird unterteilt in A und B. Beim Lymphknotenbefall werden NX (nicht beurteilbar), N0 (keine regionären Lymphknotenmetastasen) und N1 (regionäre Lymphknotenmetastasen) unterschieden.

Darüber hinaus hat die FIGO auch das *Grading* (G) des Ovarialkarzinoms definiert. Das *Grading* gibt den Anteil an Tumorzellen in der suspekten Gewebeprobe an und beschreibt den Differenzierungsgrad des Tumorgewebes. Ovarialkarzinome werden aus prognostischen Gründen in G1- (gut differenzierte), G2- (mäßig differenzierte) und G3- (schlecht differenzierte) Tumoren eingeteilt (Schwartz et al. 2002).

1.1.4 Ätiologie

Es existieren verschiedene Theorien zur Entstehung eines Ovarialkarzinoms, wie z.B. die Theorie der ununterbrochenen Ovulation (*incessant ovulation*). Hierbei wird davon ausgegangen, dass wiederholte Zyklen von Traumen und Reparatur am Ovar, welche durch die Ovulation entstehen, über Apoptose und regenerative Wiederherstellung zu einer genetischen Instabilität führen (Fathalla 1971; Tung et al. 2005). Diese Theorie wird durch die Erkenntnis unterstützt, dass während der Ovulation oxidativer DNA-Schaden, eine Expression von p53 und Apoptosereaktionen in den oberflächlichen Epithelzellen des Ovars nachgewiesen werden können (Ho 2003). Es ist zudem bekannt, dass seröse Adenokarzinome mit einer Häufigkeit von 96 % p53 Gen-Mutationen aufweisen, während bei 85 % der muzinösen Karzinome K-ras-Mutationen aufzufinden sind. Endometrioide Adenokarzinome zeigen oft eine Mikrosatelliteninstabilität und Mutationen im CTNNB1-(β -catenin)-Gen (Schwartz et al. 2002; Chambers und Martinez 2012).

Die Theorie der ununterbrochenen Ovulation wird zusätzlich dadurch bestätigt, dass die Einnahme von oralen Kontrazeptiva, mehrmalige Schwangerschaften, Stillen, der Zustand nach Hysterektomie und Sterilisation das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, verringert, da diese Faktoren eine „Pause“ der Ovulationen bewirken (Daniilidis und Karagiannis 2007; Leitlinie Ovarialkarzinom 2013).

Eine weitere Theorie besagt, dass inflammatorische Reaktionen im weiblichen Becken zu karzinomatöser Entartung führen können. So ist zum Beispiel auch Endometriose als Risikofaktor für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms zu sehen (Choi et al. 2007). Endometriose wird als gynäkologische Erkrankung definiert, welche durch das Vorhandensein und das Wachstum von glandulären, epithelialen und Stromazellen des Endometriums in extrauterinen Geweben charakterisiert wird (Stilley et al. 2012).

Auch das Zusammenspiel und Gleichgewicht von Estrogenen und Gonadotropin spielt eine Rolle bei der Entstehung von Ovarialkarzinomen. Eine zu hohe Sekretionsrate von Gonadotropin bewirkt eine verstärkte Stimulation des Oberflächenepithels des Ovars durch Estrogene und führt wiederum zu einem erhöhten Entartungsrisiko (Choi et al. 2007).

1.1.5 Risikofaktoren

Risikofaktoren, welche mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einhergehen, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, sind unter anderem eine positive Familienanamnese bezüglich des Ovarialkarzinoms, jedoch auch anderer gynäkologischer Tumoren wie des Mammakarzinoms und des Endometriumkarzinoms (Tortolero-Luna und Mitchell 1995).

Ebenso bringen eine Mutation im BRCA-1- oder BRCA-2-Gen ein erhebliches Erkrankungsrisiko für die Mutationsträgerin mit sich. Das Risiko der Erkrankung liegt für die BRCA-1-Mutation bei 39 % und bei 11-22 % für die BRCA-2-Mutation (Leitlinie Ovarialkarzinom 2013).

Zu den hereditären Syndromen, die mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Ovarialkarzinom einhergehen, gehört auch das familiäre nichtpolypöse Kolonkarzinomsyndrom HNPCC-Syndrom (*hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome*). HNPCC kann das Risiko um bis zu 12 % steigern (Prat et al. 2005).

Das Alter und Nulliparität erhöhen ebenfalls das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (Tortolero-Luna und Mitchell 1995; Oei et al. 2006; Daniilidis und Karagiannis 2007; Rubin et al. 2011).

1.1.6 Prognosefaktoren

Das Hauptproblem der schlechten Prognose stellen die fehlenden bzw. unspezifischen Frühsymptome und die dadurch späte Diagnose, aber auch die hohe Rezidivgefahr (Rezidive treten bei ca. 47 % der Patientinnen auf (Zanon et al. 2004)) dar. 75 % der Patientinnen werden erst im FIGO-Stadium III oder IV diagnostiziert (Halon et al. 2011). Die 5-Jahres-Überlebensrate der Patientinnen in diesen fortgeschrittenen Stadien beträgt nur 16-28 % (Chen et al. 2007; Choi et al 2007).

Außer dem Tumorstadium und dem Tumorgrading gelten als weitere Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms der Tumorrest, welcher nach erfolgter Operation verbleibt, das Alter und der Allgemeinzustand der Patientin, der histologische Typ des Tumors und eine leitliniengerechte Durchführung der Therapie. Als ungünstige histologische Typen werden das klarzellige und das muzinöse Karzinom angesehen, das serös-papilläre und das endometrioide Karzinom haben eine bessere Prognose (Leitlinie Ovarialkarzinom 2013).

1.1.7 *Therapie des Ovarialkarzinoms*

1.1.7.1 Operative Therapie

Grundsätzlich wird bei der Therapie des Ovarialkarzinoms die maximale operative Tumorreduktion angestrebt (Vitale et al. 2013). Hierbei erfolgt die totale abdominale Hysterektomie, eine bilaterale Adnexektomie, die Entfernung der pelvinen und paraaortalen Lymphknoten sowie die Entfernung des Omentums. Aus den auffälligen Stellen werden Biopsien entnommen, und eine Peritonealzytologie-Probe wird angelegt (Leitlinie Ovarialkarzinom 2013). Die Prognose hängt dann davon ab, ob der Tumor und seine Metastasen komplett entfernt werden konnten (Al Rawahi et al. 2013). Diese primäre Tumormassenreduktion (Tumoredebulking) ist zudem entscheidend für den Therapieerfolg der nachfolgenden adjuvanten Chemotherapie.

Das operative Vorgehen dient außer der Tumorentfernung vor allem auch dem Staging, da bis zu 30 % (Leitlinie Ovarialkarzinom 2013) der Patientinnen, deren Tumor vor der Operation als frühes Ovarialkarzinom (FIGO I bis IIA) eingeteilt wird, durch das Auffinden von Lymphknotenmetastasen in das FIGO-Stadium III höher gestuft werden, was dann eine andere Therapie indiziert.

Postoperativ wird die Behandlung mit einer platinhaltigen Chemotherapie begonnen (s.u.) (Kim et al. 2012; Al Rawahi et al. 2013).

1.1.7.2 Postoperative Chemotherapie

Eine platinhaltige adjuvante Chemotherapie in sechs Zyklen wird beim Vorliegen eines serösen Ovarialkarzinoms schon ab dem FIGO-Stadium I (außer Ia) durchgeführt, da sich für diese Patientinnen eine Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate von 75 % auf 82 % zeigte. Zudem verbesserte sich auch das krankheitsfreie Überleben von 65 % auf 76 % (Leitlinie Ovarialkarzinom 2013).

Beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom in den FIGO-Stadien IIB-IV wird die adjuvante Chemotherapie mit einer Kombination aus platinhaltiger und taxanhaltiger Chemotherapie über sechs Zyklen alle drei Wochen durchgeführt. Bei Vorliegen der FIGO-Stadien IIIB bis IV kann zusätzlich Bevacizumab eingesetzt werden (Leitlinie Ovarialkarzinom 2013). Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen den VEGF (englisch: *vascular epithelial growth factor*) gerichtet ist. Somit wird die Tumorangio-genese gehemmt (Mabuchi et al. 2012). Auch PARP-(Poly-ADP-Ribose-Polymerase)-Inhibitoren kommen hierfür in Frage. PARPs spielen eine Schlüsselrolle bei den Reperaturmechanismen von DNA-Einzelstrangbrüchen. Wird die Poly-ADP-Ribose-Polymerase gehemmt, führt dies zu einer

Ansammlung von Einzelstrangbrüchen, die wiederum bei dem Replikationsvorgang an der Gabelstelle zu Doppelstrangbrüchen führen (Kim et al. 2012; Smolle et al. 2013).

Dennoch zeigt der klarzellige Typ ein starkes Resistenzverhalten gegenüber dieser Therapie und geht somit mit einer schlechteren Prognose als seröse Adenokarzinome einher. Hier könnte eine Therapie mit Irinotecan und Cisplatin effektiver sein (Kim et al. 2012).

Während für die Therapie eines Tumorrezidivs in den S2- Leitlinien von 2007 (Leitlinie Ovarialkarzinom 2007) unter anderem Tamoxifen oder GnRH-Analoga diskutiert werden, wird in den aktuellen S3-Leitlinien klargestellt, dass endokrine Therapien auch beim platinresistenten Rezidiv einer Monochemotherapie unterlegen sind.

Dies legt nahe, dass die Möglichkeiten dieser endokrinen Therapieform noch verbessert und erweitert werden müssen.

1.2 Die endokrinen Therapieansätze des Ovarialkarzinoms

1.2.1 Estrogen-Rezeptoren und bindende Substanzen

1.2.1.1 Estrogen-Rezeptor- α und Estrogen-Rezeptor- β

Die Wirkung von Estrogenen wird im menschlichen Körper vor allem über die Aktivierung von zwei Estrogenrezeptortypen, dem Estrogen-Rezeptor-alpha ($ER-\alpha$) und Estrogen-Rezeptor-beta ($ER-\beta$) vermittelt (Matthews und Gustafsson 2003).

Der $ER-\alpha$ war der erste Estrogenrezeptor, welcher im Jahre 1973 anhand spezieller Bindungsaktivitäten in uterinen und vaginalen Gewebeproben aus Ratten detektiert werden konnte. Seine DNA-Sequenz wurde erstmalig 1986 beschrieben (Green et al. 1986; Zwart et al. 2010). Der $ER-\beta$ wurde 1996 identifiziert (Mosselman et al. 1996).

$ER-\alpha$ und $ER-\beta$ sind Mitglieder der nukleären Rezeptor-Superfamilie und werden von zwei verschiedenen Genen kodiert. Der $ER-\alpha$ setzt sich aus 595 Aminosäuren zusammen, während der $ER-\beta$ aus 530 Aminosäuren besteht (Zwart et al. 2010). Obwohl $ER-\alpha$ und $ER-\beta$ *in vitro* ähnliche Bindungsfähigkeiten und -affinitäten zu Estradiol zeigen, weist $ER-\beta$ eine schwächere Transaktivierungsfähigkeit als $ER-\alpha$ auf. Zudem werden Unterschiede für den nicht-klassischen Aktivierungsweg der Rezeptoren beschrieben (Zwart et al. 2010).

Der ER setzt sich aus zwei Transkriptionsaktivierungsdomänen zusammen, der Bindungsdomäne AF-1 und der Bindungsdomäne AF-2 (Bilimoria et al. 1996). Die Funktion der AF-1 Domäne ist ligandenunabhängig, die AF-2 Domäne hingegen ist ligandeninduziert aktiv und benötigt Co-Aktivatoren der p160-Familie wie SRC-1 und AIB/SRC-3, um ihre Effekte auszuüben (Block 2009; Zwart et al. 2010).

Die durch Bindung von Estrogenen vermittelten Signalwege erfolgen am $ER-\alpha$ und am $ER-\beta$ sowohl über die beiden unabhängigen Domänen AF-1 und AF-2 als auch über das Auslösen von schnellen membran-initiierten Steroid-Signalen (MISS) (Arnal et al. 2013).

Die Transaktivierung des ERs kann dabei über zwei unterschiedliche Wege erfolgen: Zum einen über den klassischen Weg, bei welchem es zur Bindung eines ER-Homodimers an eine palindrome ERE-(englisch: *estrogen-response-elements*)-Sequenz kommt, zum anderen über den nicht-klassischen Weg, bei welchem der ER an andere Transkriptionsfaktoren angebunden ist, wie zum Beispiel den Fos-Jun-Komplex, NF- κ B und Sp-1 (Zwart et al. 2010).

Dem ER- β fehlt eine aktive AF-1 Domäne. Somit lässt sich ein unterschiedliches Antwortverhalten der beiden Rezeptoren auf Tamoxifen erklären. Die schwache agonistische Reaktion, bedingt durch die noch aktive AF-1 Domäne am ER- α , fehlt am ER- β (Zwart et al. 2010).

Die Expression von ER- α stellt einen prognostischen Faktor in epithelialen Ovarialkarzinomen dar. Dennoch ist die Rolle von Estrogen in der ovariellen Kanzerogenese noch unklar. Obwohl mehr als 60 % der Ovarialkarzinome ER- α -positiv sind, ist das Übereinstimmen von Rezeptorstatus und Ansprechen auf eine Antiestrogentherapie viel niedriger als bei der Therapie von Brustkrebs (Yap et al. 2009; Choi et al. 2011). Eine Erklärung hierfür scheint nach Smith et al. (2010) zu sein, dass Estrogen seine Effekte in Ovarialkarzinomen zumindest teilweise durch Mechanismen, die unabhängig vom Estrogen-Rezeptor sind, steuert. Hierfür kommt vor allem der GPR-30 in Frage. Die Rolle des ER- β in Ovarialkarzinomen ist bis heute noch nicht vollständig geklärt, jedoch zeigen Ovarialkarzinome geringere Level an ER- β als normales Gewebe, und ein geringes Level an ER- β scheint mit prognostisch ungünstigen Faktoren wie einer kürzeren Überlebensrate und einem metastasierten Lymphknotenstatus einherzugehen (Bossard et al. 2012). Zudem ist in der Literatur eine Wechselwirkung zwischen dem ER- α und dem ER- β beschrieben, bei welcher es durch den ER- β zu einer Suppression der Zellproliferation durch den ER- α kommt (Zhao et al. 2010; Bossard et al. 2012). Zusätzlich bewirkt eine Aktivierung des ER- β vermutlich eine Auslösung von antiproliferativen Signalkaskaden (Zhao et al. 2010; Bossard et al. 2012). Zhao et al. (2010) beschrieben in diesem Zusammenhang eine Aktivierung von TGF- β , welches die Zellproliferation in Brustkrebszellen hemmt.

1.2.1.2 GPR-30

Der GPR-30 (englisch: **G** *protein-coupled estrogen receptor* **30**) ist ein G-Protein-gekoppelter 7-Transmembranrezeptor, der neben dem traditionellen ER- α und ER- β die physiologische Antwort auf Estrogene reguliert.

Er wurde 1996 erstmalig kloniert (Owman et al. 1996; Kolkova et al. 2010).

GPR-30 wurden in vielen benignen wie auch malignen Geweben nachgewiesen, wobei besonders hohe Level in Herz, Lunge, Leber, in interstitiellen Organen, im Gehirn und im Ovar gefunden wurden (Prossnitz et al. 2008).

Der GPR-30 kann die Reaktion auf Estrogene sowohl über den schnellen, nicht genomischen als auch über den langsameren genomischen Weg, welcher eine Veränderung von Transkriptionsgenen bewirkt, vermitteln (Prossnitz et al. 2008).

Der GPR-30 bindet dabei Estradiol mit einer 10-mal höheren Affinität als der ER- α und wird deshalb auch „G-Protein-gekoppelter-estrogen-receptor-1“ (*GPER 1*) genannt (Kolkova et al. 2010).

Der Rezeptor wird nicht nur durch Estrogen, sondern auch durch Tamoxifen und Fulvestrant stimuliert und aktiviert dann viele Zellsignalwege wie die Mobilisierung von Calcium, Adenylylcyclase, MAP-Kinase und Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase. Zu einem großen Anteil geschieht dies durch die Transaktivierung des *Epidermal-Growth-Factor*-Rezeptors.

Bindet der GPR-30 einen Liganden, erfolgt über die Src-Kinase die Aktivierung von Metalloproteasen, welche wiederum die Freisetzung von *Epidermal Growth Factor (EGF)* aus der Extrazellulärmatrix bewirken. EGF bindet daraufhin an seinen EGF-Rezeptor und dadurch erfolgt über den RAS- und MAP-Kinase-Weg die Aktivierung von ERK-1/2 und PI3K. Dies führt zu Proliferation (Filardo et al. 2000; Prossnitz et al. 2008). Der EGF-Rezeptor ist in 33-75 % der Ovarialkarzinome nachzuweisen und führt zu Tumorwachstum und Progression der Erkrankung (Fujiwara et al. 2012).

Da GPR-30 in vielen Geweben des Körpers vorhanden ist und sehr oft in Krebszelllinien exprimiert wird, erhofft man sich, hier einen weiteren Angriffspunkt in der endokrinen Therapie von Karzinomen gefunden zu haben. Von gynäkologischem Interesse ist der GPR-30 nicht zuletzt dadurch, dass auch Tumoren, welche ER- α - und ER- β -negativ sind, durch den GPR-30 weiterhin auf Estrogene ansprechen könnten. In mehreren Arbeitsgruppen wurde bereits dargestellt, dass die Expression des GPR-30 vor allem mit schlechten Prognosefaktoren wie maligner Transformation, Invasion und Metastasierung assoziiert ist, vor allem in *high-risk*-Ovarialkarzinomen exprimiert wird und mit niedrigeren Überlebensraten einhergeht (Long et al. 2012; Smith et al. 2010; Fujiwara et al. 2012).

1.2.1.3 Tamoxifen als selektiver Estrogenrezeptormodulator (SERM) und die Wirkung am ER

Estrogene bewirken am Ovar starke Proliferation, Entartungsgefahr und Malignitätsentwicklung. Es ist bewiesen, dass Patientinnen, welche über einen längeren Zeitraum mit reinen Estrogenen behandelt wurden, ein erhöhtes Risiko haben, an Ovarialkrebs zu erkranken (Bossard et al. 2012). Viele gynäkologische Tumore überexprimieren zudem die Estrogenrezeptoren, vor allem ER- α (Issa et al. 2009). Ein großer Anteil der gynäkologischen Tumoren ist demnach hormonabhängig, so dass der Estrogenrezeptor auch am Ovarialkarzinom weiterhin einen wichtigen therapeutischen Angriffspunkt darstellen könnte (Brasseur et al. 2013).

Tamoxifen (*TAM*) ist ein nicht steroidaler Wirkstoff, welcher 1962 durch Dr. Arthur L. Walpole als Medikament für die Krebstherapie erkannt wurde. Entdeckt wurde Tamoxifen schon früher, jedoch sollte es zunächst eine andere Funktion erfüllen (Jordan 1988). Tamoxifen wurde in Tierversuchen mit Ratten als postkoitales Kontrazeptivum genutzt (Harper und Walpole 1967).

Als selektiver Estrogen-Rezeptor-Modulator (*SERM*) kann Tamoxifen abhängig vom Zielgewebe sowohl agonistisch als auch antagonistisch wirken (Prossnitz et al. 2008). Die antagonistische Wirkung beruht auf drei Wirkmechanismen. Zum einen bindet Tamoxifen als SERM mit einer hohen Affinität an die AF-2 Domäne des ER und verhindert damit die Bindung von Estrogenen (Ball et al. 2008; Mc Inerney und Katzenellenbogen 1996). Zum anderen verhindert Tamoxifen die Bindung von Co-Aktivatoren an die ligandenbindende Domäne von AF-2. Es kommt somit zwar zu einer Dimerisierung des Estrogenrezeptors, jedoch wird die AF-2 Domäne dabei nicht aktiviert (Robertson 2001).

Tamoxifen bewirkt außerdem die Rekrutierung von Co-Repressor-Proteinen wie N-CoR zum ER, was dazu führt, dass durch Histonacetylierung und Chromatinumwandlungen die Transkription von Genen supprimiert wird (Ball et al. 2008).

Die partielle agonistische Aktivität von Tamoxifen resultiert aus der noch aktiven AF-1-Domäne, welche weiterhin zur Genexpression führt (Robertson 2001).

Während Tamoxifen heutzutage in der Behandlung von Brustkrebs als eine Säule der Standardtherapien eingesetzt wird, ist die Wirkung an Ovarialkarzinomen umstritten.

Es konnte teilweise eine Wirksamkeit von Tamoxifen auf Cisplatin-resistente Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen werden (Zhou et al. 2005) oder zumindest gezeigt werden, dass Tamoxifen die Sensitivität auf Cisplatin beeinflusst (Nowak-Markwitz et al. 2010). Dennoch gibt es ebenso Hinweise darauf, dass Tamoxifen über die Vorstufe von ovarieller Zystenbildung zu einem erhöhten Risiko von Ovarialkarzinomen führen kann (Ting et al. 2008).

Die Ansprechrate auf eine endokrine Therapie mit Tamoxifen liegt für das Ovarialkarzinom lediglich bei 7-18 % (Nowak-Markwitz et al. 2010).

1.2.1.4 Fulvestrant als selektiver Estrogenrezeptordestabilisator (SERD) und die Wirkung am Estrogenrezeptor

Fulvestrant wird als „reines Antiestrogen“ bezeichnet, da es die Effekte von Estrogenen komplett supprimiert. Es entstand durch die Ersetzung von Wasserstoff in der 7- α -Position von Estradiol durch einen langkettigen Alkyl-Rest (Carlson 2005). Fulvestrant war die erste Substanz, welche die Expression von Estrogen-Rezeptoren herunterregulierte (Wardley 2002). Im Gegensatz zu Tamoxifen führt Fulvestrant nicht zu einer Dimerisierung des ERs. Es kommt weiterhin nicht zu einem Transport des Liganden-Rezeptor-Komplexes in den Zellkern, und somit findet keine Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren statt. Stattdessen erfolgt eine proteolytische Degradation des Estrogenrezeptors (Robertson 2001; Ishii et al. 2011; Carlson 2005). Unter der Anwendung von Fulvestrant kommt es daher zu einer verminderten Expression des Estrogenrezeptors (Johnston et al. 2005; Ishii et al. 2011).

1.2.2 GnRH-Rezeptoren

Der GnRH-I-Rezeptor wurde in den reproduktiven Organen nachgewiesen, und es konnte gezeigt werden, dass GnRH-I durch diesen Rezeptor die Steroidbildung reguliert und Zellwachstum in menschlichen Ovarialzellen hemmt (Hong et al. 2008). Der GnRH-II-Rezeptor, welcher von einem anderen Gen kodiert wird, wurde ebenfalls in Endometrium- sowie Brustgewebe, in humanen Granulosazellen, oberflächlichen epithelialen Ovarialzellen und auch im Ovarialkarzinom nachgewiesen (Hong et al. 2008).

Die Bedeutung und Funktion des menschlichen GnRH-II-Rezeptors stellt schon seit über zehn Jahren einen Interessenschwerpunkt der Forschung dar.

Millar et al. berichteten 2001 erstmals von der Klonierung des GnRH-II-Rezeptors aus cDNA vom Krallenaffen. Sie fanden heraus, dass der Rezeptor nur zu 41 % mit dem GnRH-I-Rezeptor identisch war und dass er im Gegensatz zum Typ-I-Rezeptor kein terminales Carboxyl-Ende besitzt (Millar et al 2001).

Im menschlichen Genom existieren zwei homologe Gene für den GnRH-II-Rezeptor. Ein Gen liegt auf dem Chromosom 1, das andere auf Chromosom 14.

Dem Gen, welches auf Chromosom 14 liegt, fehlt das Exon 1, welches nötig ist, um einen Rezeptor in voller Länge zu kodieren. Das Gen, welches sich auf Chromosom 1 befindet, beinhaltet alle 3 Exons (Wu et al. 2009).

Die Funktion sowie die Mechanismen des GnRH-II-Rezeptors in den reproduktiven Organen blieben jedoch lange unklar. Obwohl man bereits wusste, dass der GnRH-II-Rezeptor in vielen unterschiedlichen Geweben existiert, konnte ein funktioneller GnRH-II-Rezeptor aufgrund einer *frameshift*-Mutation und einem vorzeitigen Stop-Codon im GnRH-II-Rezeptor, welche zum Genabbruch führen, lange Zeit nicht detektiert werden (Tan et al. 2013; Cheng und Leung 2005).

Die Erkenntnis, dass der GnRH-II-Rezeptor in seiner Struktur schon seit über 500 Millionen Jahren besteht, da er in allen Spezies vom Fisch bis hin zum Menschen gefunden werden konnte, sowie die Feststellung, dass GnRH-II in vielen Geweben vorhanden ist, zeigt, dass der Rezeptor bei vielen reproduktiven und nicht-reproduktiven Vorgängen eine Funktion besitzt (Millar 2003).

1.2.2.1 Die GnRH-Liganden und ihre Wirkung an den GnRH-II-Rezeptoren

Es wurden inzwischen drei Typen von GnRH-Liganden isoliert. Verglichen mit GnRH-I, unterscheiden sich GnRH-II und GnRH-III in drei und zwei verschiedenen Aminosäureresten. GnRH-II ist auf dem Chromosom 20p13 lokalisiert und unterscheidet sich von GnRH-I, welches auf Chromosom 8p21-p11.2 liegt, durch die drei Aminosäurereste an den Positionen 5, 7 und 8 (Wu et al. 2009; White et al. 1998).

Man fand heraus, dass GnRH-II identisch mit dem Hühner-GnRH ist (Miyamoto et al. 1984; Millar et al. 2001). GnRH-III wurde aus dem Meeres-Neunauge isoliert und wurde auch in Neuronen des menschlichen Gehirns gefunden (Tan und Bukulmez 2011).

Das Dekapeptid GnRH-I ist bekannt als der zentrale hypothalamische Regulator der reproduktiven Funktionen. Es wird im Hypothalamus gebildet und von dort freigesetzt, um an dem Hypophysenvorderlappen zu wirken. Hier stimuliert GnRH über den oberflächlichen GnRH-Zellrezeptor, welcher zur G-Protein-gekoppelten Superfamilie gehört, die Synthese und die Abgabe von LH und FSH (Millar et al. 2001; Hong et al. 2008).

GnRH-II wird im Mittelhirn, im Hippocampus und in einigen Kernen des Hypothalamus gebildet (Wu et al. 2009), jedoch wird auch ein sehr hoher Anteil außerhalb des Gehirns und in reproduktiven Geweben exprimiert (White et al. 1998; Wu et al 2009).

Sowohl GnRH-I-Agonisten als auch Antagonisten haben bereits in der Therapie von gynäkologischen Tumoren sowie auch von Prostatatumoren Anwendung gefunden. Auch die Wirkweise von GnRH-II-Liganden ist therapeutisch von großem Interesse. Es konnte dargestellt werden, dass in gynäkologischen Tumoren antiproliferative Eigenschaften über den GnRH-II-Rezeptor erfolgten, welche nicht durch den GnRH-I-Rezeptor vermittelt wurden, da der GnRH-I-Antagonist Cetrorelix auch ohne Anwesenheit bzw. nach Knockout des GnRH-I-Rezeptors Wirkung zeigte. Diese Wirkung wurde über den GnRH-II-Rezeptor vermittelt (Eicke et al. 2005). Es zeigte sich, dass sowohl GnRH-I als auch GnRH-II die Apoptoserate in humanen Granulosazellen steigern können (Hong et al. 2008), wobei GnRH-II einen noch stärkeren Effekt auf die Apoptose in Ovarialkarzinomzellen ausübt (Gründker et al. 2002, Kim et al. 2004, Kim et al. 2005).

1.2.2.2 Der GnRH-II-Antagonist

Die Aminosäuresequenz des GnRH-II-Antagonisten unterscheidet sich nur in wenigen Aminosäurepositionen von derjenigen des nativen GnRH-II.

Zur Herstellung der GnRH-II-Antagonisten bzw. GnRH-II-Agonisten werden strukturelle Veränderungen am GnRH-II-Analogon äquivalent zu denen der GnRH-I-Analoga vorgenommen. Die Analoga unterscheiden sich vom nativen Protein durch mindestens eine Aminosäuresubstitution, wobei die Anzahl und die Position darüber bestimmen, ob am Ende ein Agonist oder Antagonist vorliegt (Fister 2007).

Fister konnte 2007 mit ihrer Arbeit zeigen, dass die durch GnRH-II-Antagonisten ausgelöste Signaltransduktion wie auch diejenige der GnRH-I-Antagonisten vermutlich durch den GnRH-I- und den GnRH-II-Rezeptor vermittelt werden. Zwischen dem GnRH-II-Rezeptor und dem GnRH-I-Rezeptor wird dabei von einem bestehenden *cross-talk* ausgegangen (Fister 2007). Bindet der GnRH-II-Antagonist an den GnRH-I-Rezeptor, wird die EGF-induzierte Signaltransduktion gehemmt (Eicke et al. 2006; Fister 2007; Fister et al. 2009).

Bindet der GnRH-II-Antagonist an den GnRH-II-Rezeptor, wird Apoptose über den intrinsischen Apoptoseweg durch die Aktivierung von den MAPKs p38 und JNK und die anschließende Aktivierung des proapoptotischen Proteins Bax ausgelöst (Fister et al. 2009). Durch diese Aktivierung wird die Balance zwischen dem antiapoptotischen Protein Bcl-2 und Bcl-xL, welche sich in der äußeren Mitochondrienmembran befinden und den proapoptotischen Proteinen wie Bad und Bax, die sich im Zytosol befinden, gestört. Bcl-1 und Bcl-xL inhibieren normalerweise die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Werden Bax und Bad jedoch durch Apoptoseinduktion zur Mitochondrienmembran rekrutiert, führen sie dort zur Bildung von Poren und somit zur Freisetzung von Cytochrom C. Cytochrom C formt daraufhin mit ATP, Caspase-9 und Apaf-1 das Aptosom, was zur Aktivierung von Caspase-3 führt, welche dann wiederum die Caspase-7 aktiviert (Fister et al. 2009; Zou et al. 1999).

Zusätzlich zur Freisetzung von Cytochrom C kommt es bei Apoptose zur Freisetzung von Smac aus dem Mitochondrium, welches seinerseits ebenfalls zu einer Aktivierung von Caspase-9 führt, indem es an sogenannte IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) bindet und deren inhibitorische Funktion aufhebt (Du et al. 2000).

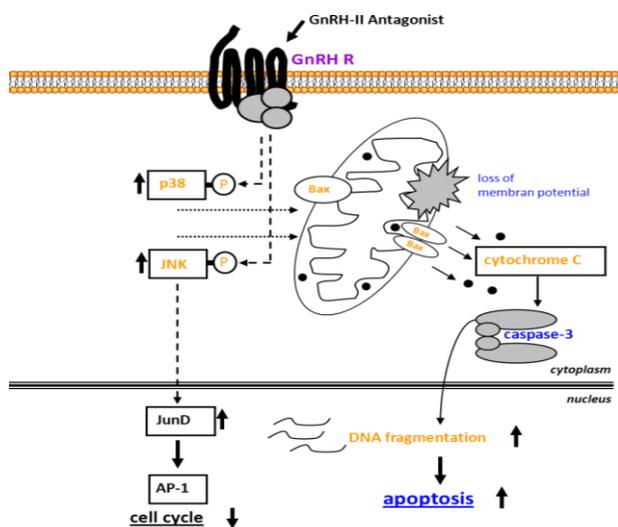


Abb. 2.1: Darstellung der durch GnRH-II-Antagonisten ausgelösten Apoptosewege.

GnRH-II-Antagonisten führen über die MAPK p38 und JNK zu einer Aktivierung von Bax, wodurch es zu einem Membranpotentialverlust an den Mitochondrien und daraufhin zur Freisetzung von Cytochrom C kommt. Die Aktivierung der Effektorcaspase-3 führt über weitere Schritte zur DNA-Fragmentierung (modifiziert nach Fister et al. 2009).

Während der Apoptosereaktion kommt es außerdem zur Freisetzung von Endonuklease G aus dem Mitochondrium, welches zur Fragmentierung des Zellkerns beiträgt (Li et al. 2001). Hong et al. (2012) berichteten, dass in humanen Granulosazellen GnRH-I oder -II Apoptose mehr durch einen Caspase-3-abhängigen extrinsischen Signalweg als durch einen

Bcl-2-Familie-abhängigen, intrinsischen Signalweg erreichen und die antiapoptotische Funktion von IGF-1 durch Akt abschwächen.

1.2.3 Die Kombinationstherapie mit einem GnRH-II-Antagonisten und einem SERM bzw. einem reinen Antiestrogen

Bisher hat die endokrine Therapie von Ovarialkarzinomen keine vielversprechenden Erfolge erzielt, obwohl ca. 60 % der Ovarialkarzinome Estrogenrezeptoren aufweisen (Yap et al. 2009; Choi et al. 2011).

Ein Grund dafür ist vermutlich, dass in der bisherigen Therapie nur die Blockade eines einzelnen Signalwegs im Vordergrund steht.

Eine Verbesserung des Therapieerfolgs könnte durch eine Therapie erreicht werden, die sich mindestens gegen zwei Signalwege richtet, dabei jedoch keine oder zumindest nur eine mäßig höhere Toxizität aufweist.

In Frage kommen für die Blockade eines weiteren Signalweges seit mehreren Jahren die GnRH-II-Antagonisten. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Mamma-, Endometrium- und Ovarial-Karzinomen mit GnRH-II-Antagonisten zu Apoptose *in vitro* und *in vivo* führt (Fister et al. 2007).

Die apoptotische Wirkung entsteht durch Effekte der GnRH-II-Antagonisten auf das mitochondriale Membranpotential, welche zu einem Potentialverlust führen, und durch einen Aktivitätsanstieg von p38, JNK und der Aktivierung von Caspase-3 ausgelöst werden. Diese Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs erfolgt schon durch nanomolare Konzentrationen von GnRH-II-Antagonisten (Fister et al. 2009). Es zeigte sich auch, dass der Antitumoreffekt bei langsam wachsenden Tumoren wesentlich stärker ist als bei sehr schnell wachsenden und sehr aggressiven Tumoren.

Von der Kombination eines SERMs bzw. SERDs mit GnRH-II-Antagonisten erhofft man sich auch hier bessere Ergebnisse zu erzielen.

1.3 Zielsetzung und Fragestellung

Die endokrine Therapie von Ovarialkarzinomen hat bis heute aufgrund unbefriedigender Behandlungsergebnisse keinen großen Stellenwert. Im Gegensatz zum Mammakarzinom, bei welchem der Einsatz von Tamoxifen eine Säule der Standardtherapie bildet, zeigt Tamoxifen, angewandt an Ovarialkarzinomen, lediglich Ansprechraten von 7-18 %, obwohl viele Ovarialkarzinome Estrogenrezeptoren besitzen (Nowak-Markwitz et al. 2010).

Kombiniert mit Cisplatin konnte Tamoxifen jedoch teilweise die Sensitivität von Ovarialkarzinomen auf Cisplatin steigern (Zhou et al. 2005; Nowak-Markwitz 2010).

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass GnRH-II-Antagonisten in Mamma-, Endometrium-, und Ovarialkarzinomen zu Apoptose in vitro und in vivo (Fister et al. 2007) und zur Aktivierung von den proapoptotischen Proteinen p38 und JNK führen (Fister et al. 2009), erhofft man sich nun durch die Kombination von SERMs und SERDs mit GnRH-II-Antagonisten eine neue, nebenwirkungsarme und noch effektivere Therapieoption zur Behandlung humaner Karzinome der Mamma, des Endometriums und des Ovars.

In dieser Arbeit wird nun auf die genaueren zugrundeliegenden Mechanismen der Kombinationswirkung beim Ovarialkarzinom eingegangen. Hierzu werden die vier in der Literatur bekannten und etablierten Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR-3, SKOV-3, EFO-21 und EFO-27 mit Tamoxifen und Fulvestrant und dem GnRH-II-Antagonist allein und in Kombination behandelt.

In den verschiedenen Versuchen sollen zunächst das Proliferationsverhalten der Zelllinien unter Behandlung mit den Substanzen untersucht und Veränderungen der Expression der Rezeptoren ER- α , ER- β , des GPR-30-Rezeptors und des GnRH-II-Rezeptors unter der Behandlung ermittelt werden.

Um die zugrundeliegenden Apoptosewege genauer zu beleuchten, sollen schließlich Western Blots zur Detektierung der aktivierten Apoptoseproteine p38, JNK und Caspase-3 angefertigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 *Material*

2.1.1 *Geräte*

Analysenwaage BP161P	Sartorius, Göttingen, D
Autoklav, 2540 EL	Tuttnauer, Breda, NL
Biodoc Analyse	Biometra, Göttingen, D
Biofuge pico	Heraeus Holding, Hanau, D
Brutschrank, 3121 S/N 28439532	Forma Scientific, Waltham, USA
Elektrophoresekammer, DNA	OWL Separation Systems, Portsmouth, USA
Kodak digital science™ electrophoresis documentation and analysis system	Kodak GmbH, Stuttgart, D
Labofuge 400R	Heraeus Holding, Hanau, D
Magnetrührer MR 3000	Heidolph, Schwabach, D
Mini-Protean™ Cell and Systems	Bio-Rad, München, D
Multi-Detection Microplate Reader, Synergy HT	BIO-TEK, Bad Friedrichshall, D
Phasenkontrastmikroskop, axiovert 25	Zeiss, Göttingen, D
Powerpack P25	Biometra, Göttingen, D
Schüttler Titramax 1000	Heidolph, Schwabach, D
Spektralphotometer (Biophotometer)	Eppendorf, Hamburg, D
Sterilwerkbank, LaminAIR® HA 2448 GS	Heraeus Holding, Hanau, D
Thermocycler T 3000	Biometra, Göttingen, D
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein, Zürich, CH
Wasserbad	Memmert, Schwabach, D
X-Ray Film Prozessor, SRS-101A	Konika, München, D
Zellkulturflaschen	Nunc, Roskilde, DK

2.1.2 Reagenzien

4-OH Tamoxifen; Reinheit \geq 98% Sigma, München, D

Bestellnummer: H7904-5 mg

Fulvestrant; Reinheit \geq 98% Bestellnummer: Sigma, München, D

14409-25 mg

GnRH-II-Antagonist [(AcD-2-Nal¹), Ferring GmbH, Kiel, D

(D-4Cpa²), (D-3Pal³), (D-3Pal⁶), (D-Leu⁸),

(D-Ala¹⁰)]

2.1.3 Puffer, Lösungen und andere verwendete Substanzen

Puffer und Lösungen

Komponenten; Firma

Anodenpuffer	1,82 g Tris, 100 ml 20 % Methanol, ad 500 ml ddH ₂ O (doppelt destilliertes (dd) H ₂ O), pH 10,4
Anodenpuffer, konzentriert	18,2 g Tris, 100 ml 20 % Methanol, ad 500 ml ddH ₂ O, pH 10,4
Antikörper-Stripping-Puffer	Uptima
Blockierungsreagenz	TBST + 5 % (w/v) Magermilchpulver
Citratpuffer	0,01 M Citronensäure
CellLytic™ M Cell Lysis Reagent	Sigma-Aldrich
DNA-Ladepuffer (10x)	50 % (v/v) Glycerin, 10mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol
Ethidiumbromid-Bad	0,007 % (v/v) Ethidiumbromid
Kathodenpuffer	2,62 g 6-Amino-Hexansäure, 1,51 g Tris, 100 ml 20 % Methanol, ad 500 ml ddH ₂ O, pH 9,4
Laemmli-Probenpuffer (2x)	62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) Glycerol, 0,05 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau

NuPAGE® LDS Sample Buffer (2x)	Invitrogen
PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,6 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ HPO ₄ , pH 7,4
SDS-Elektrophoresepuffer (10x)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
TBE (0,5x)	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8
TBS (10x)	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH 7,5
TBST	TBS + 0,1 % (v/v) Tween
Transferpuffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol

Inhibitoren**Firma**

Protease-Inhibitor	Sigma Aldrich
RNasin® plus RNase Inhibitor	Promega

Enzyme**Firma**

DNase I recombinant, RNase-frei	Roche
KAPA2G™ Fast 2x ReadyMix with Dye	Peqlab
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen
Trypsin/EDTA	PAA
Taq NA Polymerase	Roche, Grenzach-Wyhlen, D

Größenstandard-Marker**Firma**

100 bp DNA-Leiter	Invitrogen
PeqGOLD Protein-Marker V	Peqlab

2.1.4 Kulturmedien

Für die Kultivierung der Karzinomzellen wurde das fertig bezogene MEM-Earl (*Minimum Essential Medium*) w Phenolrot verwendet.

MEM w/o Phenolrot (Experimentalmedium) wurde für die In-vitro-Versuche verwendet um Farbumschläge während des Versuchs detektieren zu können.

Das Einfriermedium wurde aus MEM-Earl w Phenolrot, 20 % FCS und 5 % DMSO (Dimethylsulfoxid) hergestellt.

MEM- Earl w/o Phenolrot Kulturmedium	10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) P/S, 2 % (v/v) L-Gln, 0,22 % (w/v) NaHCO ₃ ; Biochrom, Berlin
holo-Transferrin human (1 µg/ml) Reinheit ≥ 97 %	Sigma, München, D
MEM-Earl w/o Phenolrot	Biochrom, Berlin,
nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin, D
L-Glutamine (200 mM), Low Endotoxin	Biochrom, Berlin, D

	MEM-Earl w Phenolrot	MEM w/o Phenolrot
Funktion	Nährmedium	Experimentalmedium
Zusätze	10 % (v/v) FCS	10 % (v/v) FCS
	1 % (v/v) P/S	1 % (v/v) P/S
		1 % (v/v) L-Gln
	0,1 % (v/v) Transferrin	0,1 % (v/v) Transferrin
	-	1% (v/v) HEPES Puffer

Tab. 2.1: Kulturmedien und deren Zusätze

2.1.1 Zelllinien

Für die *in-vitro*-Versuche wurden folgende etablierte Zelllinien von der ATCC (*American Type Culture Collection*) bezogen.

Zelllinie	Herkunft	Histologie	Referenz
EFO-21	Aszites	wenig differenziertes Adenokarzinom	Simon et. al 1983
EFO-27	Omentum-Metastase	Mäßig differenziertes Adenokarzinom	Simon et. al 1983
OVCAR-3	Aszites	Schwach differenziertes Adenokarzinom	American Type Culture Collection (ATCC)
SKOV-3;	Aszites	Adenokarzinom	American Type Culture Collection (ATCC)

Tab. 2.2: verwendete Zelllinien

2.1.2 Oligonukleotide

Die Desoxynukleosid-Triphosphate (Synonym: Mononukleotid; kurz: dNTPs (dATP, dCTP, dTDP, dGDP)) (Roche) werden während der reversen Transkription verwendet.

Die Oligonukleotide (MWG Biotech AG) werden als Sense- und Antisense-Primer bei der Polymerase-Ketten-Reaktion eingesetzt.

	Sequenz	Position	Produktgröße
ER-α			
Sense:	5'- AATTCAGATAATCGACGCCAG -3'	827-847	344bp
Antisense:	5'- GTGTTTCAACATTCTCCCTCCTC-3'	1149-1171	
ER-α (Kurz)			
Sense :	5'- CCAGGGAGGCTACTGTTTGC-3'	432-451	124bp
Antisense :	5'- TCCAGAGACTTCAGGGTGCT-3'	537-556	
ER-β			
Sense:	5'- TCTCCTCAGCTGAATCTGAC-3'	208-217	431 bp
Antisense:	5'- TGGGATGACTGTAACCTGAG-3'	620-639	
GPR-30			
Sense:	5'- AGTCGGATGTGAGGTTTCAG-3'	1654-1672	239 bp
Antisense:	5'- TCTGTGTGAGGAGTGCAAG-3'	1875-1893	
GnRH-II- Rezeptor			
Sense:	5'- GCCCTGCTTATCTTGCTGAC-3'	5873-5892	312 bp
Antisense:	5'- CTCCTGCCCTTCTTGATGTC-3'	6166-6185	

Tab. 2.3: Oligonukleotide

2.1.3 Antikörper

Primärantikörper	Herkunft; Verdünnung	Referenz
Anti-phospho p38 MAP-Kinase	Kaninchen, polyklonal; 1:1000	Cell-signaling, Danvers
Anti-phospho SAPK/JNK	Kaninchen, polyklonal; 1:1000	Cell-signaling, Danvers
Anti-p38	Kaninchen, polyklonal; 1:1000	Cell-signaling, Danvers
Anti-SAPK/JNK	Kaninchen, IgG; 1:1000	Cell-signaling, Danvers
Caspase 3	Kaninchen, IgG, 1:1000	Cell-Signaling, Danvers
Anti-Actin	Kaninchen, IgG, 1:1000	Sigma-Aldrich

Tab. 2.4: Primärantikörper

Sekundärantikörper	Herkunft; Verdünnung	Referenz
Kaninchen IgG horseradish Peroxidase-gekoppelt	Donkey; 1:20.000-1:50.000	GE Healthcare

Tab. 2.5: Sekundärantikörper

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Zelllinien werden in Zellkulturflaschen bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre von 95 % Luft mit 5 % Kohlendioxid kultiviert. Die Kultivierung erfolgt in 75- cm²-Zellkulturflaschen von nunc™. In jede Flasche wird 10 ml Nährmedium gegeben. Nach 4-5 d wird das Medium gewechselt und die Zellen je nach Füllungszustand der Flasche geteilt bzw. für einen Versuch verwertet.

2.2.1.2 AlamarBlue-Assay

Prinzip

Die Durchführung des AlamarBlue-Assays (AlamarBlue™ Assay von Serotec) erfolgt zur Bestimmung der Viabilität der Tumorzellen. Der sogenannte Resazurin-Reduktions-Test wird schon seit über 50 Jahren genutzt, um anhand des Farbumschlags durch Reduktion von Resazurin, welches sich blau und nicht fluoreszierend darstellt, zu Resorufin, welches pink und hoch fluoreszierend imponiert, eine Aussage über das Proliferationsverhalten von Zellen treffen zu können. Resorufin wird danach zu Hydroresorufin reduziert (O'Brien et al. 2000).

Die Reduktion vom oxidierten in den reduzierten Zustand erfolgt dabei durch die mitochondriale Atmungsaktivität und stellt somit ein Maß für die Viabilität der Zellen dar. Ist die Proliferation vermindert, wird weniger Farbstoff umgesetzt, und der Farbumschlag fällt deutlich geringer aus (Ahmed et al. 1994, Fister 2007).

Für das Durchführen des Proliferationsassays werden die Zellen so lange kultiviert, bis sie in einer 25-cm²-Zellkulturflasche in 10 ml Medium zu 80-90 % konfluent vorliegen.

Dann werden sie mit 2 ml Trypsin abgelöst, mit 8 ml Medium suspendiert und für 8 min bei 300 g zentrifugiert.

Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet mit 10 ml Experimentalmedium aufgenommen. 10 µl der Suspension werden mit 10 µl Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Kammer weist eine Tiefe von 0,1 mm und eine Fläche von 0,0025 cm² auf. Das Trypanblau färbt die toten Zellen dunkelblau an, die vitalen Zellen stellen sich weiß dar.

Berechnung der Zellzahl:

Zellzahl in vier Quadranten : $4 \times 2 \times 10.000$ Zellzahl/ml

Die Suspension aus Zellpellet wird mit Experimentalmedium verdünnt, so dass 50.000 Zellen/ml enthalten sind. In jede Vertiefung der 96-Loch-Platte wird 100 µl der Zellsuspension gegeben. Die Platte wird über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag werden die Substanzen nach folgendem Schema dazugegeben:

Spalte	Inhalt
1	Leerwerte
2	100 µl Experimentalmedium mit FCS
3	50 µl Experimentalmedium und 50 µl 4×10^{-7} M TAM bzw. 4×10^{-9} M Fulvestrant
4	50 µl Experimentalmedium und 4×10^{-6} M TAM bzw. 4×10^{-7} M Fulvestrant
5	50 µl Experimentalmedium und 4×10^{-7} M GnRH-II-Ant.
6	50 µl Experimentalmedium und 4×10^{-5} M GnRH-II-Ant.
7	50 µl 4×10^{-7} M GnRH-II-Ant. und 4×10^{-7} M TAM bzw. 4×10^{-9} M Fulvestrant
8	50 µl 4×10^{-7} M GnRH-II-Ant. und 4×10^{-6} M TAM bzw. 4×10^{-7} M Fulvestrant
9	50 µl 4×10^{-5} M GnRH-II-Ant. und 4×10^{-7} M TAM bzw. 4×10^{-9} M Fulvestrant
10	50 µl 4×10^{-5} M GnRH-II-Ant. und 4×10^{-6} M TAM bzw. 4×10^{-7} M Fulvestrant

Tab. 2.6: Behandlungsschema der 96-Loch-Platten für die Durchführung der AlamarBlue-Assays

Nach 168 h wird 20 µl AlamarBlue in jede Vertiefung der 96-Loch-Platte gegeben und die Zellen weitere 4 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgt die spektralphotometrische Messung bei $\lambda = 570$ nm und als Referenz bei 630 nm im Multidetektion Microplate Reader von Bio-Tek.

AlamarBlue macht hierbei die Atmungsaktivität der Mitochondrien anhand eines Farbumschlages vom oxidierten in den reduzierten Zustand des Stoffes sichtbar (Ahmed et. al. 1994, Fister 2007).

Der Redox-Indikator Resazurin ist in oxidiertem Zustand, also nach der Zugabe blau und färbt sich bei Reduktion in Resofurin rot.

Zweiter Versuchsteil mit Mehrfachbehandlung

Für die Zelllinie EFO-21 wurde der Versuch unter neuen Bedingungen für diese Zelllinie durchgeführt, um einer eventuellen zeitlich bedingten Wirkungsabnahme des GnRH-II-Antagonisten (GnRH-II-Ant.) entgegenzuwirken.

Die Platte wird anstelle einer einmaligen Behandlung jeweils am ersten Tag nach dem Aussäen (50.000 Zellen/ml) zusätzlich am zweiten, vierten und sechsten Tag mit dem GnRH-II-Antagonisten beimpft.

Erster Tag: Die Zellen werden anstelle der vorigen einmaligen Zugabe von 50 μl 4×10^{-5} M GnRH-II-Ant. mit 20 μl 1×10^{-4} M GnRH-II-Ant. beimpft. Anstelle von 50 μl 4×10^{-7} M GnRH-II-Ant. werden 20 μl 1×10^{-6} M GnRH-II-Ant. eingesetzt.

Zweiter, vierter und sechster Tag: Anstelle von 20 μl 1×10^{-4} M GnRH-II-Ant. erfolgt der Einsatz von 10 μl 2×10^{-4} M GnRH-II-Ant., und anstelle von 20 μl 1×10^{-6} M GnRH-II-Ant. erfolgt der Einsatz von 10 μl 2×10^{-6} M GnRH-II-Ant.

Der Einsatz von Tamoxifen (TAM) war gleichbleibend mit dem ersten Versuchsaufbau und erfolgte somit in den in der obigen Tabelle angegebenen Konzentrationen einmalig.

Da sich auch hier keine Wirkungssteigerung erzielen ließ, wurde der Versuch nach diesem Prinzip der mehrmaligen Behandlung für Fulvestrant kombiniert mit dem GnRH-II-Antagonisten nicht mehr durchgeführt.

Die Versuche wurden in drei unabhängigen Experimenten mit drei verschiedenen Passagen wiederholt.

Erstellen der Konzentrationen:

Die für den Versuch benötigten Stammlösungen

Stammlösung für Tamoxifen (1×10^{-3} in Et-OH)

1×10^{-4} M TAM = 50 μl 1×10^{-3} M TAM + 450 μl Et-OH

4×10^{-6} M TAM = 160 μl 1×10^{-4} M + 3,84 ml Experimentalmedium

4×10^{-7} M TAM = 300 μl 4×10^{-6} M + 2,7 ml Experimentalmedium

Stammlösung für Fulvestrant (1×10^{-3} M in Et-OH)

1×10^{-5} M Fulvestrant = 10 μl Fulvestrant + 990 μl Et-OH

4×10^{-7} M Fulvestrant = 160 μl 1×10^{-5} Fulvestrant + 3,84 ml Experimentalmedium

4×10^{-9} M Fulvestrant = 40 μl 4×10^{-7} Fulvestrant + 4 ml Experimentalmedium

Stammlösung für GnRH-II-Antagonist (GnRH-II-Ant.) 1×10^{-3} (0,01 M Essigsäure)

4×10^{-5} M GnRH-II-Ant = 150 μl 1×10^{-3} M GnRH-II-Ant. + 3,6 ml Experimentalmedium

4×10^{-7} M GnRH-II-Ant. = 40 μl 4×10^{-5} M GnRH-II-Ant. + 4 ml Experimentalmedium

1. Tag, 2. Versuchsteil mit Mehrfachbeimpfung

1×10^{-4} M GnRH-II-Ant.: 150 μl (1×10^{-3} M GnRH-II-Ant.) + 1350 μl Experimentalmedium (mit FCS)

1×10^{-6} M GnRH-II-Ant.: 15 μl (1×10^{-4} M GnRH-II-Ant.) + 1385 μl Experimentalmedium.

2., 4., 6. Tag, 2. Versuchsteil mit Mehrfachbeimpfung

2×10^{-4} M GnRH-II-Ant.: 300 μl (1×10^{-3} M GnRH-II-Ant.) + 1200 μl Experimentalmedium

2×10^{-6} M GnRH-II-Ant.: 15 μ l (2×10^{-4} M GnRH-II-Ant.) + 1385 μ l Experimentalmedium

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolation von RNA aus den Ovarialkarzinomzellen

Die RNA-Isolierung erfolgt mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen, welche auf der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) basiert.

Hierzu werden die Zellen erneut so lange kultiviert, bis sie in der 25 cm² Zellkulturflasche in 10 ml zu 80-90 % konfluent vorliegen. Jeweils 1.000.000 Zellen werden in 2 ml in vier Kammern der 6-Loch-Platte verteilt und über Nacht anwachsen gelassen. Dazu werden am darauffolgenden Tag gegeben:

Kammer 1: 200 μ l PBS

Kammer 2: 200 μ l 1×10^{-6} M TAM \rightarrow 1×10^{-7} M TAM

Kammer 3: 200 μ l 1×10^{-4} M GnRH-II-Ant. \rightarrow 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.

Kammer 4: 200 μ l 1×10^{-6} M TAM und 200 μ l 1×10^{-4} M GnRH-II-Ant.

Die für den Versuch benötigten Stammlösungen

Stammlösung für Tamoxifen (1×10^{-3} M in Et-OH)

1×10^{-5} M TAM: 990 μ l PBS + 10 μ l (1×10^{-3} M TAM)

1×10^{-6} M TAM: 900 μ l PBS + 100 μ l (1×10^{-5} M TAM)

Stammlösung für GnRH-II-Antagonist 1×10^{-3} M (0,01 M Essigsäure)

1×10^{-4} M GnRH-II-Ant.: 900 μ l PBS + 100 μ l (1×10^{-3} M GnRH-II-Ant.)

Die Zellen werden für 1, 2 und 4 h bei 37 °C mit den Substanzen kultiviert, danach werden die Zellen in 350 μ l RLT-Puffer aus dem RNeasy Kit von Qiagen lysiert.

Das Lysat wird auf Silicagel-Säulen gegeben und mit RW1 und RPE-Puffer gewaschen.

Durch Zugabe von RNase freiem Wasser wird die RNA von den Säulen eluiert. Die gewonnene Suspension wird bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Quantifizierung der RNA

Die gewonnene Menge der RNA wird photometrisch mit dem BioPhotometer 6131 der Firma Eppendorf bestimmt.

Hierzu wird die Suspension in einem Verhältnis von 1:10 mit Ampuwa verdünnt (7 µl RNA, 63 µl Ampuwa) Die Messung erfolgt bei einer Absorption von $\lambda = 260 \text{ nm}$.

Die RNA-Proben werden nach Messung des RNA-Gehaltes mit Ampuwa so weit verdünnt, dass noch 1 µg RNA/1 ml Suspension enthalten sind.

2.2.2.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription erfolgt im Thermocycler T3000 von Biometra und dient der Umschreibung der RNA in cDNA (*complementary deoxyribonucleic acid*; deutsch: komplementäre Desoxyribonukleinsäure). Die Umschreibung erfolgt mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Bestandteil von SuperScript™ II Reverse Transcriptase).

Die 12 µl-Proben werden zunächst für 3 min auf 70°C erhitzt. Anschließend werden sie auf 4°C heruntergekühlt. Die Proben werden für fünf Minuten auf 4°C gehalten. In dieser Zeit werden 26 µl des Mastermixes hinzugegeben. Anschließend erfolgt eine Erwärmung auf 37°C für 1 h und eine erneute Erhitzung auf 95°C für 5 min.

Substanz	Volumen [µl]
RT-Puffer	120
DTT	48
dNTP	48
Oligo dT	96
Superskript	24

Tab. 2.7: Substanzen zur Herstellung des Enzym-Mix zur reversen Transkription für 12 Proben

Die Proben werden nun als Template (RT-DNA) in die darauffolgende PCR eingesetzt.

2.2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Durchführung der PCR erfolgt im Thermocycler T3000 von Biometra.

Anhand der PCR (*polymerase chain reaction*, deutsch: Polymerase-Ketten-Reaktion) lassen sich DNA-Fragmente vervielfältigen. Hierbei wird ein komplementärer DNA-Strang zum Matrizenstrang erstellt. An denjenigen DNA-Abschnitt, welcher vervielfältigt wird, bindet ein spezifischer Primer.

Den ersten Schritt der PCR stellt die Denaturierung dar. Die doppelsträngige DNA wird auf 95°C erhitzt, wodurch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen aufgebrochen und die beiden Stränge getrennt werden.

Im nächsten Schritt (Annealing) wird diejenige Primer-Temperatur gewählt, welche eine Anlagerung des Primers an die DNA erlaubt. Die Temperatur liegt meist unter dem Schmelzpunkt der Primersequenzen bei 55-65°C.

Den letzten Schritt stellt die Elongation dar, wobei die DNA-Polymerase die gesuchten Abschnitte der DNA-Stränge durch die freien dNTPS vom 3'-Ende des Primers an synthetisiert. Die Elongation erfolgt bei 72°C, dem Temperaturoptimum der TAQ-Polymerase.

Die gewonnene RT-DNA wird in einem Verhältnis von 1:5 mit Ampuwa verdünnt (5 µl RT-DNA, 20 µl Ampuwa). Von dieser Verdünnung werden 5 µl zu 20 µl Mastermix pro Cup gegeben.

Substanz	Volumen [µl]
Puffer	30
dNTP	12
Sense-Primer	12
Antisense-Primer	12
H₂O	180
TAQ-Polymerase	10

Tab. 2.8: Substanzen zur Herstellung des PCR-Reaktionsansatzes

Für den ER-α und ER-β erfolgte die Denaturierung bei 95°C für 30 sec. Für beide Rezeptoren wurde die Elongation mit 72°C für 1 min durchgeführt.

Für den GPR-30 und den GnRH-II-Rezeptor betrug die Denaturierungstemperatur 94°C und 30 sec. Die Elongation erfolgte für beide ebenfalls bei 72°C 1 min lang.

Die Annealingtemperatur sowie die Anzahl der Zyklen variierten innerhalb der verschiedenen Zelllinien und kann der unten aufgeführten Tabelle entnommen werden.

Zelllinien	ER-α	Er-β	GPR-30	GnRH-II
SKOV-3	57°C, 30 Zyklen	66°C, 36 Zyklen	66°C, 29 Zyklen	64°C, 24 Zyklen
Ovcar-3	-	64°C, 38 Zyklen	66°C, 32 Zyklen	64°C, 26 Zyklen
Efo-21	-	63°C, 37 Zyklen	66°C, 30 Zyklen	64°C, 25 Zyklen
Efo-27	-	63°C, 37 Zyklen	66°C, 31 Zyklen	64°C, 24 Zyklen

Tab. 2.9: Annealingtemperaturen und Anzahl der benötigten Zellzyklen für die verschiedenen Zelllinien

Die Amplifikation von L7 diente jeweils als Bezugswert, da dieses Protein in allen Geweben exprimiert wird.

Für die Detektion von L7 erfolgte die Denaturierung bei 94°C und 30 sec lang. Die Annealingtemperatur betrug 55°C bei 30 sec, die Elongation fand bei einer Temperatur von 72°C und einer Dauer von 1 min statt. Die Zyklenzahl betrug 29.

2.2.2.5 Agarose-Gel-Elektrophorese

Anhand der Agarose-Gel-Elektrophorese werden die DNA-Stränge ihrer Größe nach aufgetrennt.

Durch Anlage eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle durch die Gelmatrix. Die kleineren Moleküle wandern schneller durch das Gel, so dass eine Auftrennung der Amplifikate nach ihrer Größe erfolgen kann. Zur Herstellung der Agarose-Gele wird die Agarose gemeinsam mit 0,5 x TBE aufgekocht und je 30 ml in die vorgesehene Gelkammer mit eingestecktem Kamm gegossen. Nach Aushärtung des Gels wird die Kammer mit 0,5 x TBE aufgefüllt und der Kamm entfernt. In jede der Geltaschen werden 10 µl der Proben pipettiert. Als Größenstandard wird ein DNA-Fragmentlängen-Standard (100 bp DNA-Leiter) verwendet.

Die Auftrennung erfolgt bei 95 V für durchschnittlich 45 min.

2.2.2.6 Auswertung

Das Gel wird nach Durchführung der Elektrophorese für 20 min in ein Ethidiumbromidbad gegeben, wodurch die Nukleinsäuren durch den interkalierenden und fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid nachgewiesen werden. Anschließend werden die Gele mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Wellenlänge der UV-Strahlung zur Detektion liegt bei $\lambda = 302 \text{ nm}$.

Die Ergebnisse werden mit der Software Bio Doc Analyze 2.1 festgehalten und ausgewertet.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

In dieser Arbeit wurde die Methode des Western-Blots zum Nachweis des Vorhandenseins von Apoptoseproteinen anhand von Reaktionen mit geeigneten Antikörpern genutzt.

In den durchgeführten Versuchen sollte phosphoryliertes p38 (pp38), dephosphoryliertes p38 (p38), sowie phosphorylierte JNK (pJNK) und dephosphorylierte JNK (JNK) nachgewiesen werden. Hierzu werden die Zellen erneut in 25 cm³ Zellkulturflaschen so weit kultiviert, bis sie zu 80 % konfluent vorliegen. Es werden 2 ml mit 1.000.000 Zellen/ml ausgesät.

2.2.3.1 Proteinisolation

Die Zellen werden jeweils in drei 6-Loch-Platten mit 2 ml Zellsuspension (1×10^6 Zellen/ml) pro Well ausgesät und über Nacht inkubiert, so dass am nächsten Tag die Substratzugabe erfolgen kann.

In das erste Well werden 200 µl PBS, in das zweite Well 200 µl TAM, in das dritte Well 200 µl GnRH-II-Ant. und in das vierte Well 200 µl der Kombination der beiden Wirkstoffe gegeben (analog zu der Beimpfung der 6-Loch-Platten im Versuchsteil 2.2.2.1 Isolation von RNA aus den Ovarialkarzinomzellen). Die Proteinisolation der ersten Platte erfolgt 5 min nach Zugabe, die der zweiten nach 10 min und die der dritten Platte 20 min nach Zugabe der Substanzen.

Für die Bestimmung von Caspase-3 werden nur zwei 6-Loch-Platten benötigt, wobei die erste Isolation nach drei und die zweite Isolation nach 168 h erfolgt. Das Medium der Platte, welche nach 168 h isoliert wird, wird nach 96 h gewechselt und die Substanzen erneut zugegeben.

Zur Isolation werden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und mit 2 ml PBS/EDTA abgelöst. Die Zellen werden daraufhin mit dem Rubber abgetragen, mit zusätzlichen 2 ml PBS verdünnt und in 15 ml Röhrchen bei 300 g 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet wird jeweils mit 100 µl Cell-lytic-Puffer aufgenommen, in 4 Eppendorfcups und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

2.2.3.2 Proteinbestimmung

Zur Messung der Proteinkonzentration wird das Lysat 5 min lang in der Eppendorfszentrifuge bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand von 100 µl wird abgenommen und in neue Cups überführt. Von diesem Überstand werden 5 µl entnommen und mit 45 µl H_2O verdünnt. Davon werden jeweils zweimal 10 µl in Kammern der 96-Loch-Platte gegeben. In die ersten 10 Kammern wird die Standard-Reihe pipetiert. Nach Zugabe von jeweils 200 µl des Proteinbestimmungsreagenz von Biorad, welches 1:5 mit H_2O verdünnt wurde, erfolgt die Messung bei 490 nm im Mikrotiterplattenphotometer.

Zu den restlichen 95 µl des Überstands werden 95 µl Laemli Sample-Puffer zweifach konzentriert gegeben.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Mittels der SDS (*sodium dodecyl sulfate*-) Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) werden die gewonnenen Proteine anschließend ihrer Größe nach aufgetrennt.

SDS bindet dabei an die Proteine und gibt diesen aufgrund seiner anionischen Ladung ebenfalls eine negative Ladung. Anschließend werden die Proben in einem Sammelgel (5 % Polyacrylamid) konzentriert und danach in einem Trenngel (10-15 %) separiert. Hierfür werden 12 %-SDS-Polyacrylamid-Fertiggele der Firma Bio-Rad verwendet.

Die Proben werden zuvor 5 min bei 96°C erhitzt, danach auf Eis gestellt und jeweils die gleichen Proteinmengen in die Taschen pipettiert. Zudem werden 5 µl des PeqGOLD Protein-Markers V als Größenstandard in die erste Tasche des Gels gegeben.

Die Mini-PROTEAN III Electrophoresis Cell Apparatur von Bio-Rad wird nach Angaben des Herstellers aufgebaut und mit 500 ml SDS-Elektrophoresepuffer befüllt.

Die Elektrophorese wird für eine 30 min bei 80 V (Konzentrierung der Proteine) und danach für 1 h bei 100 V (Auftrennung der Proteine) durchgeführt.

Die aufgetrennten Proteine können nun im Western-Blot-Verfahren auf eine PVDF-(Polyvinylidenfluorid)-Membran transferiert und nachgewiesen werden.

2.2.3.4 Western Blot

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden anhand des Western-Blot-Verfahrens auf eine Trägermembran übertragen. Anschließend können die Proteine durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

Die PVDF-Membran der Firma Millipore wurde für 1 min in Methanol, anschließend 5 min in bidestilliertem Wasser und danach für 10 min in Transferpuffer geschwenkt. Der Transferpuffer dient der Aktivierung der Membran.

Das Trenngel wird nach der Elektrophorese mit bidestilliertem Wasser gespült und danach für fünf Minuten in Transferpuffer geschwenkt. Das Sammelgel wird verworfen.

Die Halbtrockenzelle zur Durchführung des Western Blots wurde ebenfalls von der Firma Bio-Rad bezogen und nach Angaben des Herstellers aufgebaut.

Zur Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran werden zunächst acht Lagen Filterpapier (Whatman, Schleicher und Schuell) mit konzentriertem Anodenpuffer getränkt. Auf vier der Filterpapiere werden luftblasenfrei das Gel und die PVDF-Membran gegeben und anschließend mit Transferpuffer übergossen. Die weiteren vier Lagen Filterpapier getränkt mit Kathodenpuffer werden zuletzt aufgelegt. Die Proteine werden für 1 h bei 100 V auf die PVDF-Membran transferiert.

Die fertige Membran wird für 1 h mit dem Blocking-Reagenz benetzt und geschüttelt. Vor Zugabe des Antikörpers wird die Membran mit TBST gewaschen. Der zu untersuchende Antikörper wird über Nacht auf der Membran belassen. Anschließend wird die Membran viermal für 15 min mit TBST gewaschen bis der Peroxidase-markierte Sekundärantikörper

hinzugegeben wird. Dieser bleibt für 1 h auf der Membran. Danach wird die Membran erneut viermal mit TBST gewaschen.

Zur Darstellung der Proteinbanden wird die Membran für 5 min mit 2 ml Chemolumineszenz-Reagenz von Millipore benetzt. Das Chemolumineszenz-Reagenz reagiert bei der katalytischen Reaktion mit der Peroxidase mit einem Maximum bei $\lambda=430$ nm, womit dann die Röntgenfilme belichtet werden können. Zur Exposition wurde eine Röntgenfilmkassette von X-Ray GmbH verwendet. Anschließend wurde der Film im X-Ray-Film Prozessor SRS-101A in der Dunkelkammer entwickelt. Mit Hilfe der Kodak Digital Science 1D Software wurden die Ergebnisse ausgewertet.

Zur Detektion weiterer Proteine wird die Membran für 15 min mit Stripping-Puffer geschüttelt, danach mit destilliertem Wasser gewaschen und in TBST zum nächsten Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.4 Statistische Analysen

Die anhand der durchgeführten Versuche erhobenen Ergebnisse wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism® (Version 5.00) statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Der *one-way ANOVA (one-way Analysis of variance)*, gefolgt vom *Dunnett's Comparison Test* oder der t-Test (gepaart oder ungepaart) wurden dabei als statistische Tests angewandt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Proliferationsfähigkeit humaner Ovarialkarzinomzellen

Die Behandlung von Mamma-, Ovarial-, und Endometrium-Karzinomzellen mit GnRH-II-Antagonisten führt durch die Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und JNK und dem proapoptotischen Protein Bax zu Apoptose (Fister et al. 2009). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Antitumorwirkung durch die simultane Anwendung von Tamoxifen (SERM) oder Fulvestrant (SERD) noch verstärkt werden könnte.

Hierfür wurden zunächst mit den vier Zelllinien (OVCAR-3, SKOV-3, EFO-21, EFO-27) AlamarBlue-Assays durchgeführt. Die Ovarialkarzinomzelllinien wurden für 168 h mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten einzeln und in Kombination in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Die unten genannten Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen erhoben.

3.1.1 Proliferationsfähigkeit der Zelllinie OVCAR-3 nach Behandlung mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)]

Die alleinige Behandlung der Zelllinie OVCAR-3 mit Tamoxifen in unterschiedlichen Konzentrationen ergab keine signifikante Reduktion der Zellzahl (OVCAR-3, 1×10^{-7} M TAM: $96,3 \pm 3,41$ % (n.s. vs K (Kontrolle)); OVCAR-3, 1×10^{-6} M TAM: $93,75 \pm 5,41$ % (n.s. vs. K)).

Die Inkubation der Zelllinie OVCAR-3 mit dem GnRH-II-Antagonisten einzeln in unterschiedlichen Konzentrationen angewandt, führte ebenfalls zu keiner signifikanten Reduktion der Zellzahl (OVCAR-3, 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant: $95,5 \pm 3,93$ % (n.s. vs. K); OVCAR-3, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant: $79,75 \pm 5,31$ (n.s. vs. K)).

Bei der Zelllinie OVCAR-3 zeigte sich die größte antiproliferative Wirkung bei der Kombination von 1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. nach 168 h Inkubation. Die

Proliferationsfähigkeit der Zelllinie OVCAR-3 wurde bei einer Konzentration von 1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. verglichen mit der Kontrolle signifikant reduziert (OVCAR-3, 1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $56 \pm 19,41$ % ($p < 0,01$)).

Bei Inkubation der Zelllinie OVCAR-3 mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist in niedrigeren Konzentrationen ergab sich keine signifikante Reduktion der Zellzahl (OVCAR-3, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant.: $85,88 \pm 7,0$ % (n.s. vs. K); OVCAR-3, 1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant.: $77,63 \pm 6,11$ % (n.s. vs. K); OVCAR-3, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $83,5 \pm 6,14$ % (n.s. vs. K)).

Die Zelllinie OVCAR-3 reagierte mit einer signifikant größeren Proliferationsminderung bei Behandlung mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist als bei alleiniger Behandlung mit Tamoxifen (OVCAR-3, 1×10^{-6} M TAM: $93,75 \pm 5,41$ % vs. OVCAR-3, 1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $56 \pm 19,41$ % ($p < 0,05$)) (Abb.3.1).

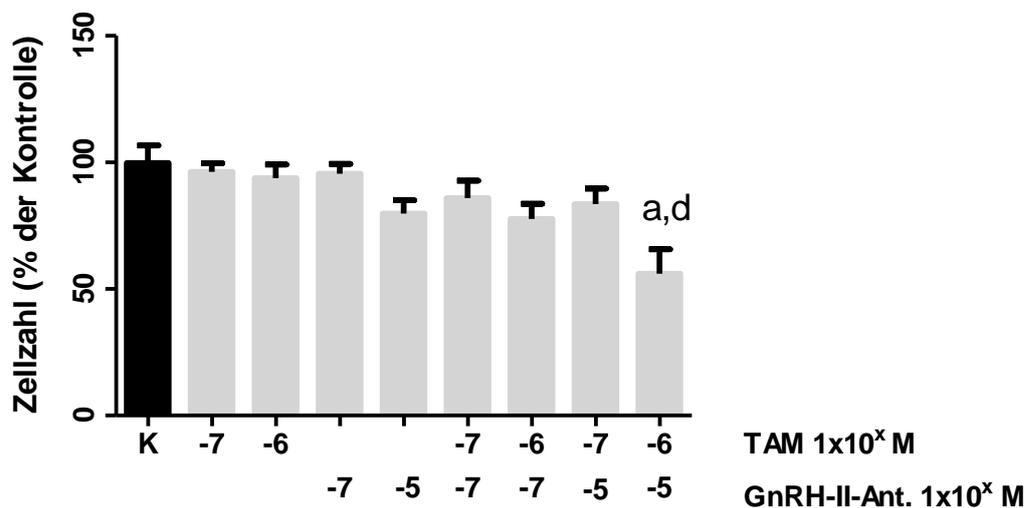


Abb. 3.1: Einfluss der Behandlung mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten allein und in Kombination auf die Proliferation der Zelllinie OVCAR-3 (in unterschiedlichen Konzentrationen): Die Zellen wurden nach einmaliger Zugabe 168 h mit den Substanzen inkubiert. Die Zugabe erfolgte 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test. a, $p < 0,01$ vs. Kontrolle ($n=3$). **Vergleich der Zellzahl (% der Kontrolle) der Zelllinie OVCAR-3 behandelt mit Tamoxifen (1×10^{-6} M TAM) in einzelner Anwendung und in Kombination mit dem GnRH-II-Antagonisten (1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.):** Die Zellen wurden nach einmaliger Zugabe 168 h mit den Substanzen inkubiert. Die Zugabe erfolgte 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Bedingungen erfolgte mittels t-test. d, $p < 0,05$: 1×10^{-6} M TAM vs 1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. ($n=3$).

3.1.2 Proliferationsfähigkeit der Zelllinie SKOV-3 nach Behandlung mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)]

Die alleinige Behandlung der Zelllinie SKOV-3 mit Tamoxifen in unterschiedlichen Konzentrationen, bewirkte, wie auch bei der Zelllinie OVCAR-3, keine signifikante Reduktion der Zellzahl (SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM: $96,25 \pm 4,57$ % (n.s. vs K); SKOV-3, 1×10^{-6} M TAM: $92 \pm 4,92$ % (n.s. vs. K)).

Bei Inkubation der Zelllinie SKOV-3 mit dem GnRH-II-Antagonisten einzeln in unterschiedlichen Konzentrationen angewandt, zeigte sich ebenfalls keine signifikante Reduktion der Zellzahl (SKOV-3, 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant: $101,3 \pm 2,78$ % (n.s. vs. K); SKOV-3, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant: $98,38 \pm 5,28$ % (n.s. vs. K)).

Auch bei Behandlung der Zelllinie SKOV-3 mit der Kombination von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten ergab sich bei keiner Konzentration eine signifikante Reduktion der Zellzahl (SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant.: $99,25 \pm 4,33$ % (n.s. vs. K); SKOV-3, 1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant.: $90,5 \pm 4,29$ % (n.s. vs. K); SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $97 \pm 6,12$ % (n.s. vs. K)).

Bei der Zelllinie SKOV-3 zeigte sich dennoch auch die tendenziell stärkste Verminderung der Proliferation bei Behandlung mit 1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant (SKOV-3, 1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $84,75 \pm 17,73$ % (n.s. vs. K)) nach 168 h Inkubation. Zudem bewirkte auch bei dieser Zelllinie die Behandlung der Zellen mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH II-Antagonist eine tendenziell stärkere Reduktion der Zellzahl als die Behandlung mit Tamoxifen in entsprechender Konzentration einzeln angewandt (SKOV-3, 1×10^{-6} M TAM: $92 \pm 4,92$ % vs. SKOV-3, 1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $84,75 \pm 17,73$ % (n.s.)) (Abb 3.2).

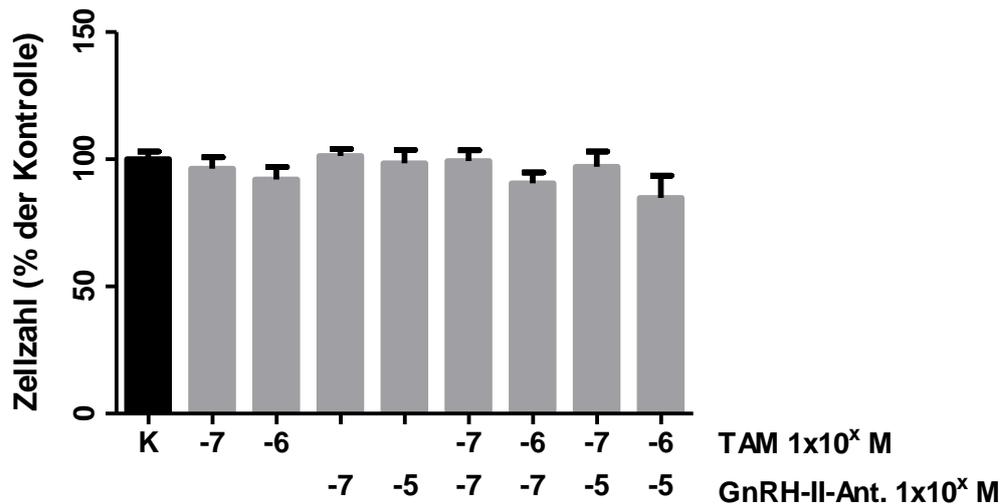


Abb. 3.2: Einfluss der Behandlung mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten allein und in Kombination auf die Proliferation der Zelllinie SKOV-3 (in unterschiedlichen Konzentrationen): Die Zellen wurden nach einmaliger Zugabe 168 h mit den Substanzen inkubiert. Die Zugabe erfolgte 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

3.1.3 Proliferationsfähigkeit der Zelllinie EFO-21 nach Behandlung mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)]

Die Behandlung der Zelllinie EFO-21 mit Tamoxifen einzeln in unterschiedlichen Konzentrationen angewandt, zeigte wie auch bei den zuvor genannten Zelllinien keine signifikante Reduktion der Zellzahl (EFO-21, 1×10^{-7} M TAM: $96,67 \pm 7,69\%$ (n.s. vs K); EFO-21, 1×10^{-6} M TAM: $98,33 \pm 6,39\%$ (n.s. vs. K)).

Bei Inkubation der Zelllinie EFO-21 mit dem GnRH-II-Antagonisten einzeln in unterschiedlichen Konzentrationen angewandt, ergab sich ebenfalls keine signifikante Reduktion der Zellzahl (EFO-21, 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant: $98,67 \pm 4,33\%$ (n.s. vs. K); EFO-21, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant: $90,83 \pm 6,67\%$ (n.s. vs. K)).

Auch bei Behandlung der Zelllinie EFO-21 mit der Kombination von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten zeigte sich bei keiner Konzentration eine signifikante Reduktion der Zellzahl (EFO-21, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant.: $94,67 \pm 3,84\%$ (n.s. vs. K); EFO-21, 1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant.: $102,3 \pm 5,78\%$ (n.s. vs. K); EFO-21, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $100 \pm 4,16\%$ (n.s. vs. K); EFO-21, 1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $102,7 \pm 5,36\%$ (n.s. vs. K)) (Abb. 3.3).

Um eine eventuelle zeitliche Wirkungsabnahme des GnRH-II-Antagonisten auszuschließen, wurde für den Versuch mit der Zelllinie EFO-21 zusätzlich eine mehrmalige Substratzugabe des GnRH-II-Antagonisten durchgeführt. Folgende Abbildungen (Abb. 3.3 und 3.4) stellen die Versuche gegenüber, in welchem die Zelllinie EFO-21 einmalig mit dem GnRH-II-Antagonisten für 168 h behandelt wurde (Abb. 3.3) und in welchem die Zelllinie EFO-21 nach 24 h, nach 48 h, nach 96 h und nach 144 h, nach dem in Methoden (Kapitel 2.2.1.2 AlamarBlue-Assay) beschriebenen Schema, behandelt worden ist.

Bei Behandlung der Zelllinie EFO-21 mit Tamoxifen für 168 h einzeln angewandt und den gleichen Konzentrationen wie im ersten Versuchsteil, zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Die Zellzahl wurde wie auch zuvor nicht signifikant reduziert (EFO-21, 1×10^{-7} M TAM: $126 \pm 17,39$ % (n.s. vs K); EFO-21, 1×10^{-6} M TAM: $132 \pm 23,18$ % (n.s. vs. K)).

Bei Inkubation der Zelllinie EFO-21 mit dem GnRH-II-Antagonisten einzeln in unterschiedlichen Konzentrationen und jeweils nach Zugabe nach 24 h, nach 48 h, nach 96 h und nach 144 h, ergab sich ebenfalls keine signifikante Reduktion der Zellzahl (EFO-21, 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant: $128,7 \pm 17,13$ % (n.s. vs. K); EFO-21, 1×10^{-4} M GnRH-II-Ant: $124,3 \pm 20,5$ % (n.s. vs. K)).

Auch die Behandlung der Zelllinie EFO-21 mit der Kombination von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten führte bei keiner Konzentration zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl. Der GnRH-II-Antagonist wurde nach 24 h, nach 48 h, nach 96 h und nach 144 h hinzugegeben. (EFO-21, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant.: $127 \pm 17,06$ % (n.s. vs. K); EFO-21, 1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant.: $124,3 \pm 24,26$ % (n.s. vs. K); EFO-21, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-4} M GnRH-II-Ant.: $115,7 \pm 27,53$ % (n.s. vs. K); EFO-21, 1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-4} M GnRH-II-Ant.: $100,7 \pm 13,64$ % (n.s. vs. K)) (Abb 3.4).

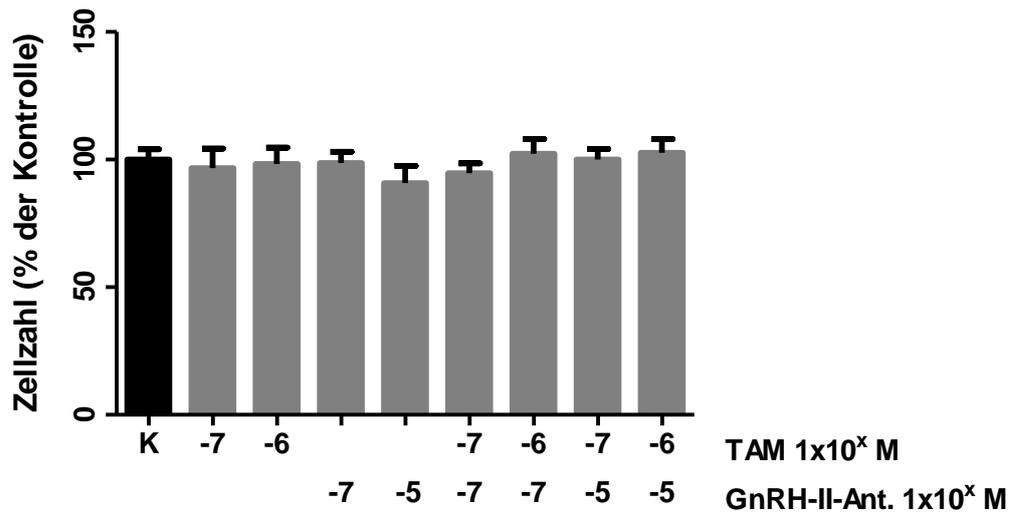


Abb. 3.3: Einfluss der Behandlung mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten allein und in Kombination auf die Proliferation der Zelllinie EFO-21 (in unterschiedlichen Konzentrationen): Die Zellen wurden nach einmaliger Zugabe 168 h mit den Substanzen inkubiert. Die Zugabe erfolgte 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

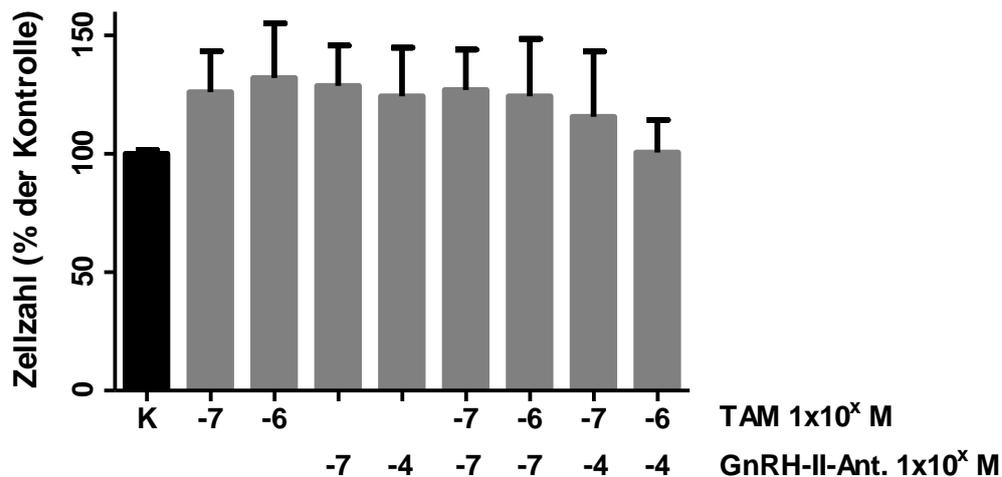


Abb. 3.4: Einfluss der Behandlung mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten allein und in Kombination auf die Proliferation der Zelllinie EFO-21 (in unterschiedlichen Konzentrationen) und unter mehrmaliger Zugabe des GnRH-II-Antagonisten: Die Zellen wurden für 168 h inkubiert, eine Zugabe des GnRH-II-Ant. erfolgte nach 24 h, 48 h, 96 h und nach 144 h. Die Zugabe von Tamoxifen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

3.1.4 Proliferationsfähigkeit der Zelllinie EFO-27 nach Behandlung mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)]

Die Behandlung der Zelllinie EFO-27 mit Tamoxifen einzeln in unterschiedlichen Konzentrationen angewandt, führte, wie auch bei den zuvor genannten Zelllinien zu keiner signifikanten Reduktion der Zellzahl (EFO-27, 1×10^{-7} M TAM: $96 \pm 4,51$ % (n.s. vs K); EFO-27, 1×10^{-6} M TAM: $89,33 \pm 11,72$ % (n.s. vs. K)).

Bei Inkubation der Zelllinie EFO-27 mit dem GnRH-II-Antagonisten einzeln in unterschiedlichen Konzentrationen angewandt, ergab sich ebenfalls keine signifikante Reduktion der Zellzahl (EFO-27, 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant: $96 \pm 10,02$ % (n.s. vs. K); EFO-27, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant: $90,33 \pm 6,23$ % (n.s. vs. K)).

Auch bei Behandlung der Zelllinie EFO-27 mit der Kombination von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten zeigte sich bei keiner Konzentration eine signifikante Reduktion der Zellzahl (EFO-27, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant.: $94,17 \pm 13,45$ % (n.s. vs. K); EFO-27, 1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant.: $95,5 \pm 9,25$ % (n.s. vs. K); EFO-27, 1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $91,33 \pm 14,17$ % (n.s. vs. K)).

Bei der Zelllinie EFO-27 ergab sich dennoch die größte antiproliferative Tendenz bei Inkubation mit der Kombination von 1×10^{-7} M TAM und 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. (EFO-27, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $89,17 \pm 10,11$ % (n.s. vs. K)) (Abb 3.5).

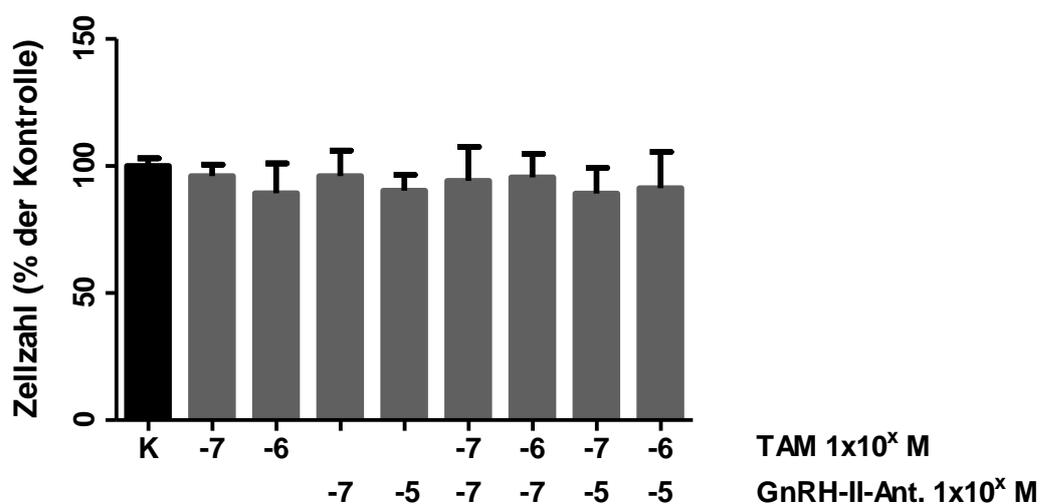


Abb. 3.5: Einfluss der Behandlung mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten allein und in Kombination auf die Proliferation der Zelllinie EFO-27 (in unterschiedlichen Konzentrationen): Die Zellen wurden nach einmaliger Zugabe 168 h mit den Substanzen inkubiert. Die Zugabe erfolgte 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

3.1.5 Vergleich des Proliferationsverhaltens der Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3, EFO-21 und EFO-27 nach Behandlung mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)]

Die Proliferation der Zellen wurde bei der Zelllinie OVCAR-3 bei Behandlung mit der Kombination von 1×10^{-6} M TAM und 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. signifikant reduziert, bei der Zelllinie SKOV-3 und EFO-27 erfolgte eine nicht signifikante Reduktion der Proliferationsfähigkeit nach Behandlung mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist und die Zelllinie EFO-21 reagierte nicht mit einer Abnahme der Zellzahl, weder auf die einzelnen Substanzen, noch auf die Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist. Die Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist führt bei drei von vier Zelllinien zu einer tendenziellen Abnahme der Zellzahl.

Folgende Abbildung fasst die Unterschiede des Proliferationsverhaltens der verschiedenen Zelllinien nach Behandlung mit der Kombination von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten zusammen, beide in der höchsten angewandten Konzentration von 1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.

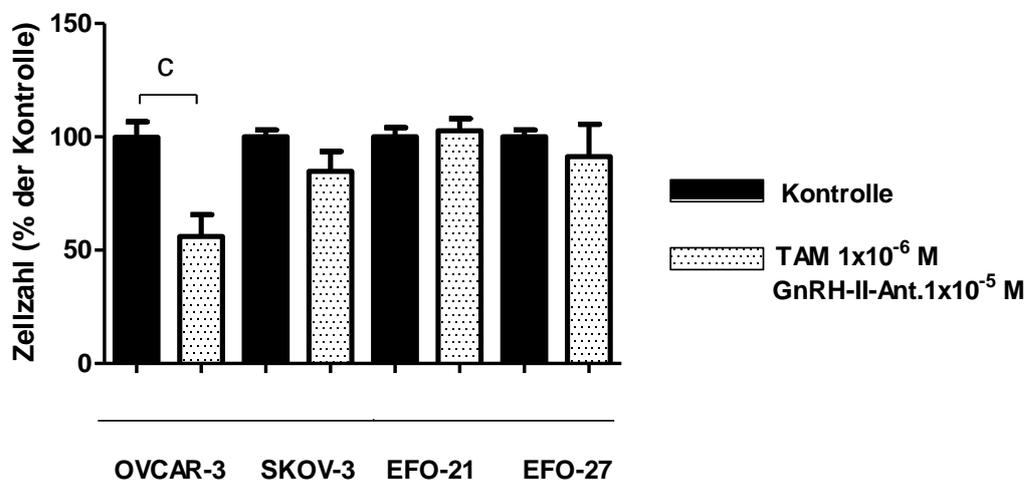


Abb. 3.6: Zellzahl (% der Kontrolle) der Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3, EFO-21 und EFO-27 behandelt mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist in jeweils höchster Konzentration von 1×10^{-6} M TAM und 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: Die Zellen wurden nach einmaliger Zugabe 168 h mit den Substanzen inkubiert. Die Zugabe erfolgte 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels t-Test (ungepaart). c, $p < 0,01$ vs. Kontrolle (n=3).

3.2 Einfluss von Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Proliferationsfähigkeit humaner Ovarialkarzinomzellen

Der zweite Teil des Versuches erfolgte durch Zugabe von Fulvestrant in Kombination mit dem GnRH-II-Antagonisten zu den Ovarialkarzinomzelllinien in unterschiedlichen Konzentrationen für eine Inkubationsdauer von 168 h. Die unten genannten Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen erhoben.

3.2.1 Proliferationsfähigkeit der Zelllinie OVCAR-3 nach Behandlung mit Fulvestrant und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)]

Die Behandlung der Zelllinie OVCAR-3 mit Fulvestrant einzeln in unterschiedlichen Konzentrationen angewandt, zeigte keine signifikante Reduktion der Zellzahl (OVCAR-3, 1×10^{-9} M Fulv.: $106,6 \pm 3,43$ % (n.s. vs K); OVCAR-3, 1×10^{-7} M Fulv.: $99,8 \pm 3,37$ % (n.s. vs. K)).

Die Inkubation der Zelllinie OVCAR-3 mit dem GnRH-II-Antagonisten einzeln in unterschiedlichen Konzentrationen angewandt, führte ebenfalls zu keiner signifikanten Reduktion der Zellzahl (OVCAR-3, 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant: $104 \pm 4,04$ % (n.s. vs. K); OVCAR-3, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant: $92,0 \pm 2,0$ % (n.s. vs. K)).

Bei der Zelllinie OVCAR-3 zeigte sich die größte antiproliferative Wirkung bei der Kombination von 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. nach 168 h Inkubation. Die Proliferationsfähigkeit der Zelllinie OVCAR-3 wurde bei einer Konzentration von 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. verglichen mit der Kontrolle signifikant reduziert (OVCAR-3, 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant: $83 \pm 1,53$ % ($p < 0,01$)).

Bei Inkubation der Zelllinie OVCAR-3 mit der Kombination von Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist in niedrigeren Konzentrationen ergab sich keine signifikante Reduktion der Zellzahl (OVCAR-3, 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant.: $95 \pm 3,61$ % (n.s. vs. K); OVCAR-3, 1×10^{-9} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $94,67 \pm 3,84$ % (n.s. vs. K)).

Bei Behandlung der Zellen mit der Kombination von 1×10^{-9} M Fulv./ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant. zeigte sich eine signifikante Steigerung der Zellzahl verglichen mit der Kontrolle (OVCAR-3, 1×10^{-9} M Fulv./ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant.: $113,3 \pm 2,91$ % ($p < 0,05$)).

Die Kombination von Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist führte bei der Zelllinie OVCAR-3 zu einer signifikanten Steigerung des antiproliferativen Effekts verglichen mit der einzelnen Anwendung von Fulvestrant (OVCAR-3, 1×10^{-7} M Fulv.: $99,8 \pm 5,84$ % vs. OVCAR-3, 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $83 \pm 1,53$ % ($p < 0,05$)) (Abb 3.7).

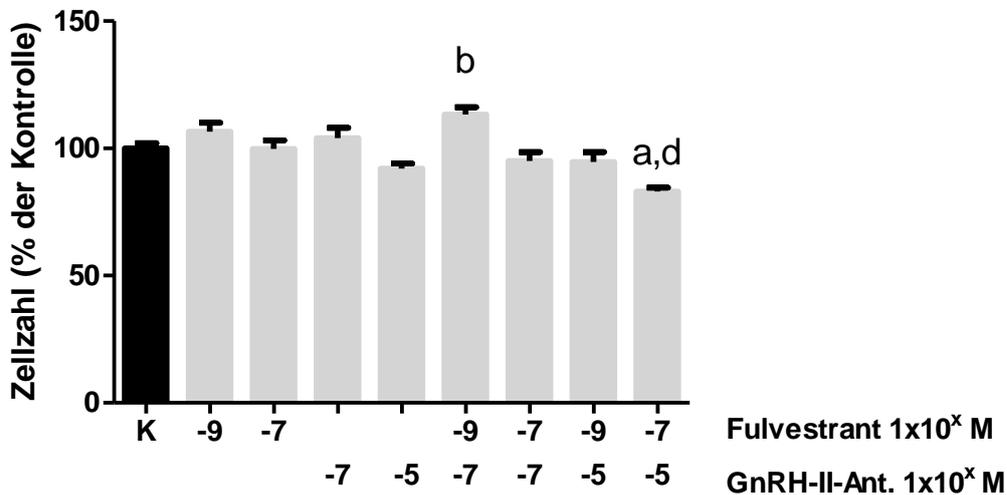


Abb. 3.7: Einfluss der Behandlung mit Fulvestrant und dem GnRH-II-Antagonisten allein und in Kombination auf die Proliferation der Zelllinie OVCAR-3 (in unterschiedlichen Konzentrationen): Die Zellen wurden nach einmaliger Zugabe 168 h mit den Substanzen inkubiert. Die Zugabe erfolgte 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test. a, $p < 0,01$ vs. Kontrolle, b, $p < 0,05$ vs. Kontrolle ($n=3$). **Vergleich der Zellzahl (% der Kontrolle) der Zelllinie OVCAR-3 behandelt mit Fulvestrant (1×10^{-7} M Fulv.) in einzelner Anwendung und in Kombination mit dem GnRH-II-Antagonisten (1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.):** Die Zellen wurden nach einmaliger Zugabe 168 h mit den Substanzen inkubiert. Die Zugabe erfolgte 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Bedingungen erfolgte mittels t-test. d, $p < 0,05$: 1×10^{-7} M Fulv. vs. 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. ($n=3$).

3.2.2 Proliferationsfähigkeit der Zelllinie SKOV-3 nach Behandlung mit Fulvestrant und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)]

Die Behandlung der Zelllinie SKOV-3 mit Fulvestrant einzeln in unterschiedlichen Konzentrationen angewandt, zeigte wie auch bei der Zelllinie OVCAR-3 keine signifikante Reduktion der Zellzahl (SKOV-3, 1×10^{-9} M Fulv.: $101,4 \pm 1,82$ % (n.s. vs K); SKOV-3, 1×10^{-7} M Fulv.: $97 \pm 3,51$ % (n.s. vs. K)).

Auch in diesem Versuchsteil ergab die alleinige Behandlung der Zelllinie SKOV-3 mit dem GnRH-II-Antagonisten keine signifikante Reduktion der Zellzahl (SKOV-3, 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant: $97 \pm 2,31$ % (n.s. vs. K); SKOV-3, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant: $86,33 \pm 5,81$ % (n.s. vs. K)).

Die Inkubation der Zelllinie SKOV-3 mit der Kombination von Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist in unterschiedlichen Konzentrationen führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl bei Behandlung der Zellen mit 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. (SKOV-3, 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant: $78,43 \pm 4,94$ % ($p < 0,05$)). Bei Behandlung der Zellen mit niedrigeren Konzentrationen der Kombination von Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist zeigte sich keine signifikante Reduktion der Zellzahl (SKOV-3, 1×10^{-9} M Fulv./ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant.: $100 \pm 1,16$ % (n.s. vs. K); SKOV-3, 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant.: $98,33 \pm 1,45$ % (n.s. vs. K); SKOV-3, 1×10^{-9} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $88,0 \pm 4,0$ % (n.s. vs. K)).

Auch bei der Zelllinie SKOV-3 ergab die Behandlung mit der Kombination von Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist eine signifikant stärkere Proliferationsminderung verglichen mit der alleinigen Anwendung von Fulvestrant (SKOV-3, 1×10^{-7} M Fulv.: $97 \pm 3,51$ % vs. SKOV-3, 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $78,43 \pm 4,94$ % ($p < 0,05$)) (Abb 3.8).

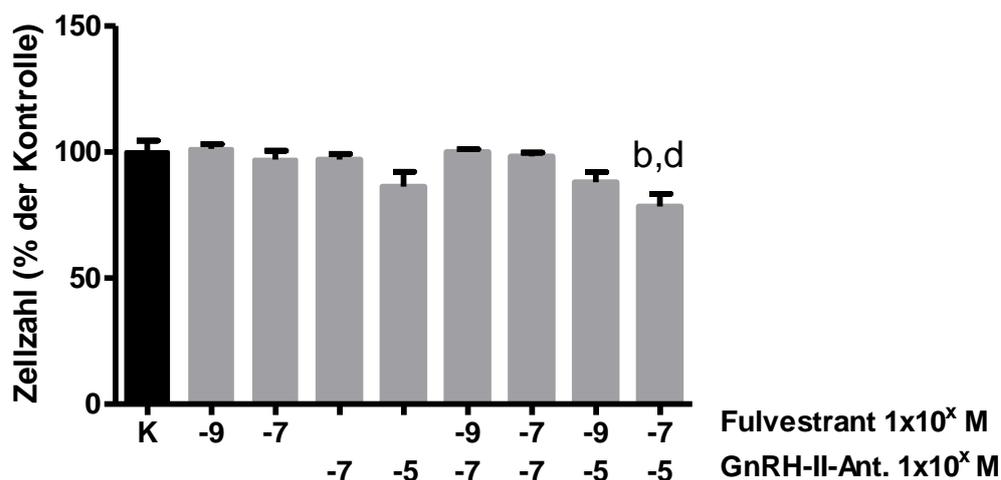


Abb. 3.8: Einfluss der Behandlung mit Fulvestrant und dem GnRH-II-Antagonisten allein und in Kombination auf die Proliferation der Zelllinie SKOV-3 (in unterschiedlichen Konzentrationen): Die Zellen wurden nach einmaliger Zugabe 168 h mit den Substanzen inkubiert. Die Zugabe erfolgte 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test. b, $p < 0,05$ vs. Kontrolle (n=3). **Vergleich der Zellzahl (% der Kontrolle) der Zelllinie SKOV-3 behandelt mit Fulvestrant (1×10^{-7} M Fulv.) in einzelner Anwendung und in Kombination mit dem GnRH-II-Antagonisten (1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.):** Die Zellen wurden nach einmaliger Zugabe 168 h mit den Substanzen inkubiert. Die Zugabe erfolgte 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Bedingungen erfolgte mittels t-test. d, $p < 0,05$: 1×10^{-7} M Fulv. vs. 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. (n=3).

3.2.3 Proliferationsfähigkeit der Zelllinie EFO-21 nach Behandlung mit Fulvestrant und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)]

Die Behandlung der Zelllinie EFO-21 mit Fulvestrant einzeln in unterschiedlichen Konzentrationen angewandt, zeigte wie auch bei den zuvor genannten Zelllinien keine signifikante Reduktion der Zellzahl. Die Behandlung der Zellen mit Fulvestrant in einzelner Anwendung führte zu einer Steigerung der Zellzahl. Bei Behandlung der Zellen mit 10^{-7} M Fulv. stellte sich die Steigerung der Zellzahl verglichen mit der Kontrolle signifikant dar (EFO-21, 1×10^{-9} M Fulv.: $111,0 \pm 10,12$ % (n.s. vs. K); EFO-21, 1×10^{-7} M Fulv.: $125,4 \pm 6,32$ % ($p < 0,05$)).

Die alleinige Behandlung der Zelllinie EFO-21 mit dem GnRH-II-Antagonisten zeigte eine signifikante Steigerung der Zellzahl, verglichen mit der Kontrolle (EFO-21, 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant: $124,3 \pm 1,18$ % ($p < 0,05$); EFO-21, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant: $122,0 \pm 8,24$ % ($p < 0,05$)).

Bei Inkubation der Zelllinie EFO-21 mit der Kombination von Fulvestrant und dem GnRH-II-Antagonisten in unterschiedlichen Konzentrationen ergab sich keine signifikante Reduktion der Zellzahl (EFO-21, 1×10^{-9} M Fulv./ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant.: $119,6 \pm 8,09$ % (n.s. vs. K); EFO-21, 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant.: $117,8 \pm 2,93$ % (n.s. vs. K); EFO-21, 1×10^{-9} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $110,9 \pm 2,24$ % (n.s. vs. K); EFO-21, 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant: $94,96 \pm 4,95$ % (n.s. vs. K)).

Erneut war die Proliferationsminderung bei Behandlung mit der Kombination von Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist signifikant stärker, verglichen mit der Behandlung der Zellen mit Fulvestrant allein (EFO-21, 1×10^{-7} M Fulv: $125,4 \pm 6,32$ % vs. EFO-21, 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $94,96 \pm 4,95$ % ($p < 0,01$)).

Auch der Vergleich der alleinigen Behandlung mit dem GnRH-II-Antagonisten mit der Kombiantion von GnRH-II-Antagonist und Fulvestrant ergab eine signifikante Verminderung der Proliferationsfähigkeit (EFO-21, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $122,0 \pm 8,24$ % vs. EFO-21, 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $94,96 \pm 4,95$ % ($p < 0,01$)) (Abb. 3.9).

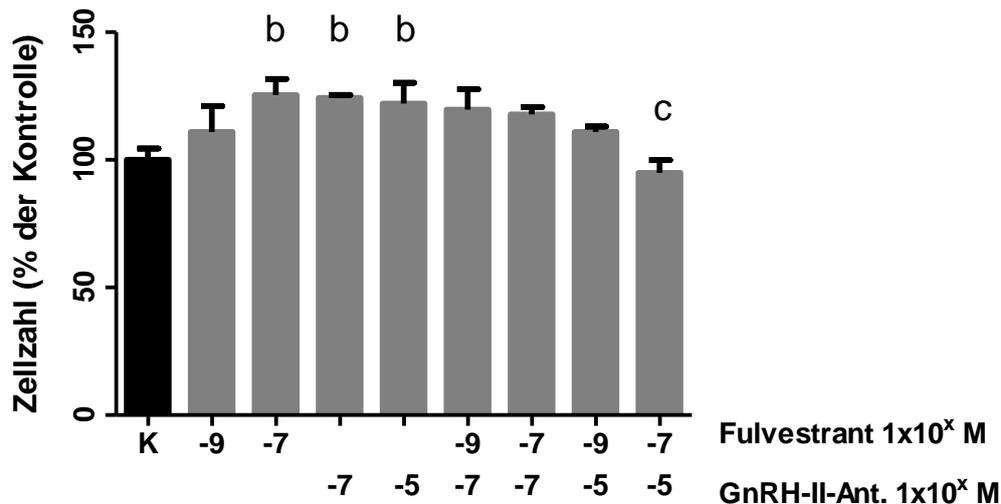


Abb. 3.9: Einfluss der Behandlung mit Fulvestrant und dem GnRH-II-Antagonisten allein und in Kombination auf die Proliferation der Zelllinie EFO-21 (in unterschiedlichen Konzentrationen): Die Zellen wurden nach einmaliger Zugabe 168 h mit den Substanzen inkubiert. Die Zugabe erfolgte 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test. b, $p < 0,05$ vs. Kontrolle ($n=3$). **Vergleich der Zellzahl (% der Kontrolle) der Zelllinie EFO-21 behandelt mit Fulvestrant (1×10^{-7} M Fulv.) in einzelner Anwendung und in Kombination mit dem GnRH-II-Antagonisten (1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.):** Die Zellen wurden nach einmaliger Zugabe 168 h mit den Substanzen inkubiert. Die Zugabe erfolgte 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Bedingungen erfolgte mittels t-test. c, $p < 0,01$: 1×10^{-7} M Fulv. vs. 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. ($n=3$). **Vergleich der Zellzahl (% der Kontrolle) der Zelllinie EFO-21 behandelt mit dem GnRH-II-Antagonisten (1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.) in einzelner Anwendung und in Kombination mit Fulvestrant (1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.):** Die Zellen wurden nach einmaliger Zugabe 168 h mit den Substanzen inkubiert. Die Zugabe erfolgte 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Bedingungen erfolgte mittels t-test. c, $p < 0,01$: 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. vs. 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. ($n=3$).

3.2.4 Proliferationsfähigkeit der Zelllinie EFO-27 nach Behandlung mit Fulvestrant und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)]

Die Behandlung der Zelllinie EFO-27 mit Fulvestrant einzeln in unterschiedlichen Konzentrationen angewandt, zeigte wie auch bei den zuvor genannten Zelllinien keine signifikante Reduktion der Zellzahl. (EFO-27, 1×10^{-9} M Fulv.: $102,0 \pm 7,04$ % (n.s. vs. K); EFO-27, 1×10^{-7} M Fulv.: $108,3 \pm 5,42$ % (n.s. vs. K)).

Erneut führte auch die alleinige Behandlung der Zelllinie EFO-27 mit dem GnRH-II-Antagonisten zu keiner signifikanten Reduktion der Zellzahl. Bei Behandlung der Zellen mit 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant. kam eine signifikante Steigerung der Zellzahl, verglichen mit der Kontrolle, zur Darstellung (EFO-27, 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant: $122,4 \pm 6,05$ % ($p < 0,05$); EFO-27, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant: $108,4 \pm 4,08$ % (n.s. vs. K)).

Bei Inkubation der Zelllinie EFO-27 mit der Kombination von Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist in unterschiedlichen Konzentrationen zeigte sich ebenfalls keine signifikante Reduktion der Zellzahl (EFO-27, 1×10^{-9} M Fulv./ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant.: $110,3 \pm 3,79$ % (n.s. vs. K); EFO-27, 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-7} M GnRH-II-Ant.: $114,3 \pm 3,59$ % (n.s. vs. K); EFO-27, 1×10^{-9} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $103,8 \pm 6,01$ % (n.s. vs. K).

Für die Zelllinie EFO-27 zeigte sich wie auch bei den Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3 und EFO-21 eine abnehmende Proliferationstendenz nach Behandlung der Zellen mit der Kombination von Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist, welche bei 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. am stärksten ausgeprägt aber dennoch nicht signifikant war (EFO-27, 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $88 \pm 0,71$ %, (n.s. vs. K)).

Bei der Zelllinie EFO-27 ergab sich wie auch bei allen anderen Zelllinien eine signifikante Verminderung der Proliferation bei Behandlung mit der Kombination von Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist, verglichen mit der alleinigen Behandlung mit Fulvestrant (EFO-27, 1×10^{-7} M Fulv.: $108,3 \pm 5,42$ % vs. EFO-27, 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $88 \pm 0,71$ % ($p < 0,01$)).

Auch der Vergleich der alleinigen Behandlung mit dem GnRH-II-Antagonisten mit der Behandlung mit der Kombination von GnRH-II-Antagonist und Fulvestrant ergab eine signifikante Verminderung der Proliferationsfähigkeit (EFO-27, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. $108,4 \pm 4,08$: vs. EFO-27, 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $88 \pm 0,71$ % ($p < 0,01$)) (Abb. 3.10).

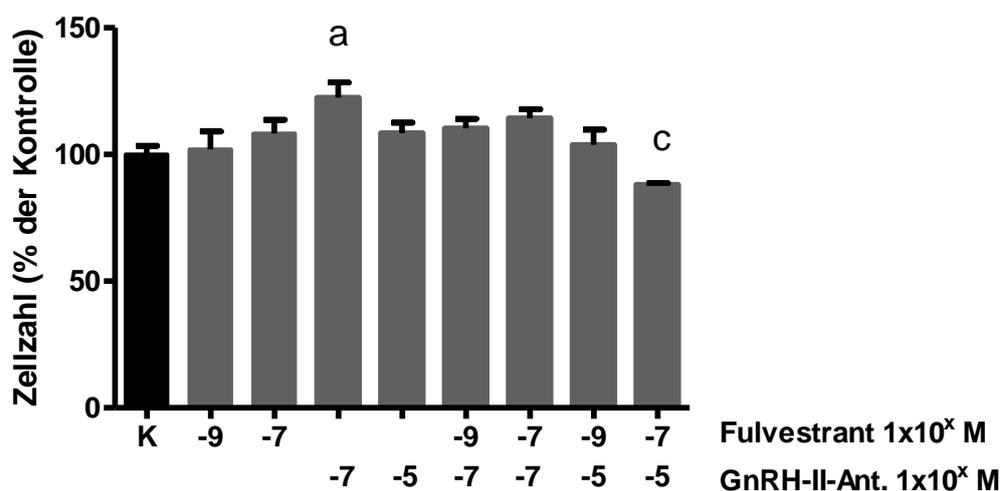


Abb. 3.10: Einfluss der Behandlung mit Fulvestrant und dem GnRH-II-Antagonisten allein und in Kombination auf die Proliferation der Zelllinie EFO-27 (in unterschiedlichen Konzentrationen): Die Zellen wurden nach einmaliger Zugabe 168 h mit den Substanzen inkubiert. Die Zugabe erfolgte 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test. a, $p < 0,01$ vs. Kontrolle (n=3). **Vergleich der Zellzahl (% der Kontrolle) der Zelllinie EFO-27 behandelt mit Fulvestrant (1×10^{-7} M Fulv.) in einzelner Anwendung und in Kombination mit dem GnRH-II-Antagonisten (1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.):** Die Zellen wurden nach einmaliger Zugabe 168 h mit den Substanzen inkubiert. Die Zugabe erfolgte 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Überprüfung auf

signifikante Unterschiede zwischen zwei Bedingungen erfolgte mittels t-test. c, $p < 0,01$: 1×10^{-7} M Fulv. vs. 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. ($n=3$). **Vergleich der Zellzahl (% der Kontrolle) der Zelllinie EFO-27, behandelt mit dem GnRH-II-Antagonisten (1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.) in einzelner Anwendung und in Kombination mit Fulvestrant (1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.):** Die Zellen wurden nach einmaliger Zugabe 168 h mit den Substanzen inkubiert. Die Zugabe erfolgte 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Bedingungen erfolgte mittels t-test. c, $p < 0,01$: 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. vs. 1×10^{-7} M Fulv./ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. ($n=3$).

3.2.5 Vergleich des Proliferationsverhaltens der Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3, EFO-21 und EFO-27 nach Behandlung mit Fulvestrant und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)]

Die Proliferation der Zellen wurde bei der Zelllinie OVCAR-3 bei Behandlung mit der Kombination von 1×10^{-7} M Fulv. und 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. signifikant reduziert, bei der Zelllinie SKOV-3 zeigt sich ebenfalls eine signifikante Reduktion der Zellzahl verglichen mit der Kontrolle und bei der Zelllinie EFO-27 erfolgte eine nicht signifikante Reduktion der Proliferationsfähigkeit.

Die Kombination von Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist führt bei drei von vier Zelllinien zu einer abnehmenden Tendenz der Zellzahl.

Folgende Abbildung fasst die Unterschiede der Zellzahlreduktion der verschiedenen Zelllinien bei Behandlung mit der Kombination aus 1×10^{-7} M Fulv. und 1×10^{-5} M GnRH-II Ant. zusammen.

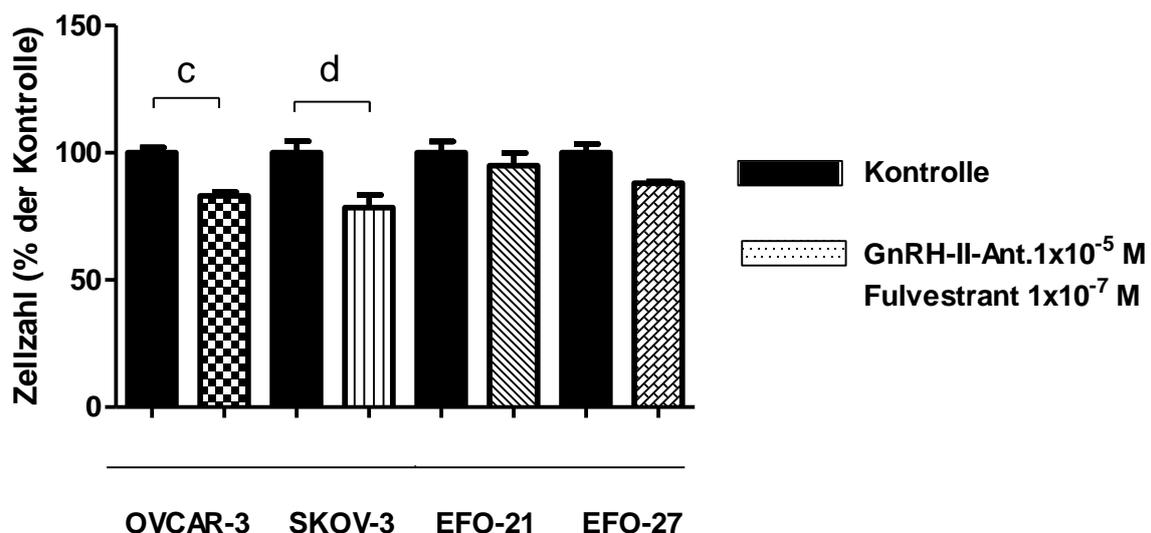


Abb. 3.11: Zellzahl (% der Kontrolle) der Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3, EFO-21 und EFO-27, behandelt mit der Kombination von Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist in jeweils höchster Konzentration von 1×10^{-7} M Fulv. und 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: Die Zellen wurden für 168 h inkubiert, die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels t-Test (ungepaart). c, $p < 0,01$, d, $p < 0,05$ vs. der jeweiligen Kontrolle ($n=3$).

3.3 ER- α -Expression humaner Ovarialkarzinomzellen

Die Untersuchung der Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3, EFO-21 und EFO-27 auf die Expression des ER- α erfolgte mittels RT-PCR in Bezug auf das *housekeeping gene* L7 auf molekularbiologischer Ebene. Die Versuche wurden in drei unabhängigen Experimenten mit drei verschiedenen Passagen wiederholt.

Der ER- α konnte mit den verwendeten Primern nur für die Zelllinie SKOV-3 detektiert werden. Auch mit einem weiteren Primerpaar (ER- α (kurz)) gelang die Darstellung des ER- α nur für die Zelllinie SKOV-3.

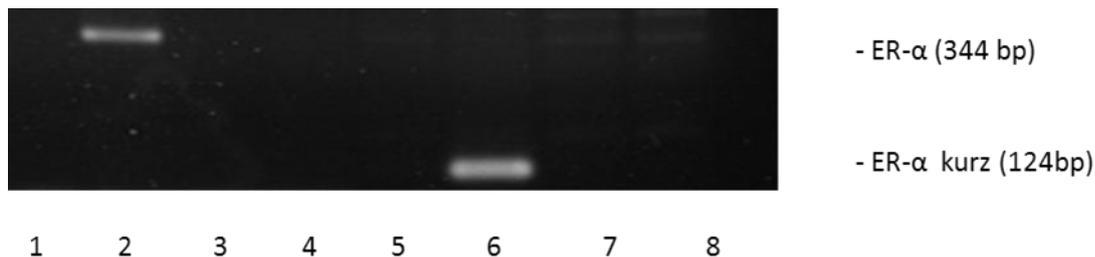
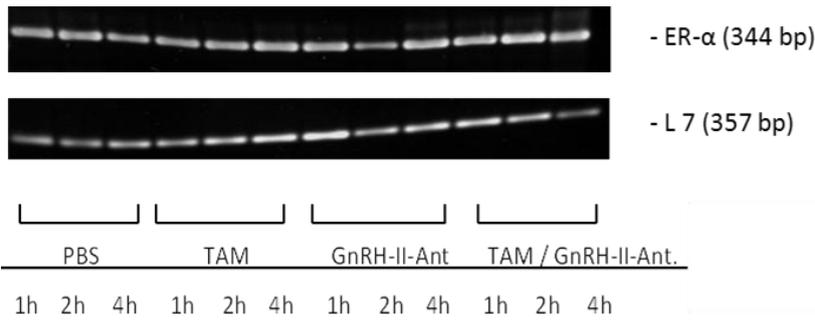


Abb. 3.12: ER- α -Expression in den untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien. Von links nach rechts wurden die Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR-3 (1), SKOV-3 (2), EFO-21 (3) und EFO-27 (4) mit dem Primer für ER- α , welcher bei 344 bp. bindet, aufgetragen. Die Banden 5 bis 8 zeigen ebenfalls die Expression des ER- α der Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3, EFO-21 und EFO-27. Die Primer binden jedoch im Abstand von 124 bp. Für beide Primerpaare ließ sich lediglich bei der Zelllinie SKOV-3 (2;6) eine Expression des ER- α nachweisen.

3.3.1 Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die ER- α -mRNA-Expression von SKOV-3-Zellen

Die Expression des ER- α in der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 zeigte die größten Veränderungen nach 4 h Behandlung mit den Substanzen. Sowohl nach vierstündiger Behandlung mit Tamoxifen als auch mit der Kombination aus Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist ergab sich eine stärkere Rezeptorexpression, verglichen mit der PBS-Kontrolle (K) nach 4 h. Die ER- α -Expression zeigte sich bei Behandlung der Zellen mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist signifikant im Vergleich zur Kontrolle. (SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM: $1,48 \pm 0,27$ (n.s. vs. K); SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $2,87 \pm 0,86$ ($p < 0,05$)). Die Behandlung der Zelllinie SKOV-3 mit dem GnRH-II-Antagonisten einzeln angewandt, führte tendenziell eher zu einer abnehmenden ER- α -Expression (SKOV-3, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $0,92 \pm 0,13$ (n.s. vs. K)) (Abb. 3.13).

A



B

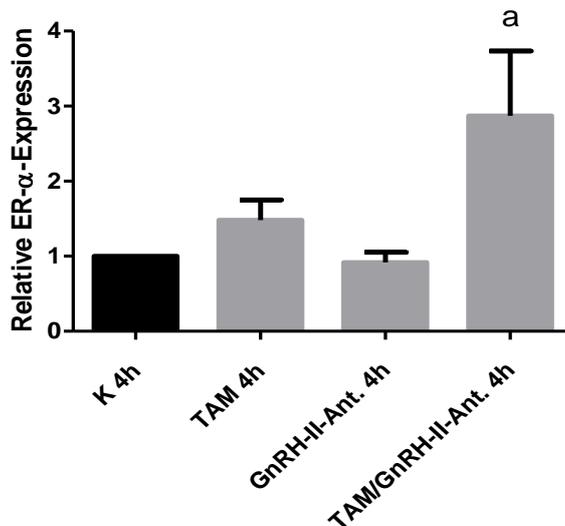


Abb. 3.13 A: Semiquantitativer Nachweis der ER- α -Expression der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 nach Behandlung der Zellen mit den einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 1 h, 2 h und 4 h.

B: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 4 h auf das ER- α -Expressionsverhalten der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3: Die Zellen wurden für 24 h inkubiert, die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der RNA wurde 4 h nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test. a, $p < 0,05$ vs. Kontrolle (n=3).

3.3.2 Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die ER- α -Protein-Expression in der Zelllinie EFO-27

Die Expression des ER- α konnte in der Zelllinie EFO-27 mit Hilfe der PCR nicht nachgewiesen werden. Um im Verlauf bessere Vergleichsmöglichkeiten der Zelllinien zu haben und darzustellen, dass nicht die Existenz bzw. das Fehlen des ER- α für das unterschiedliche Verhalten der Zelllinien verantwortlich ist, wurde für diese Zelllinie der ER- α anhand von Western-Blots qualitativ nachgewiesen.

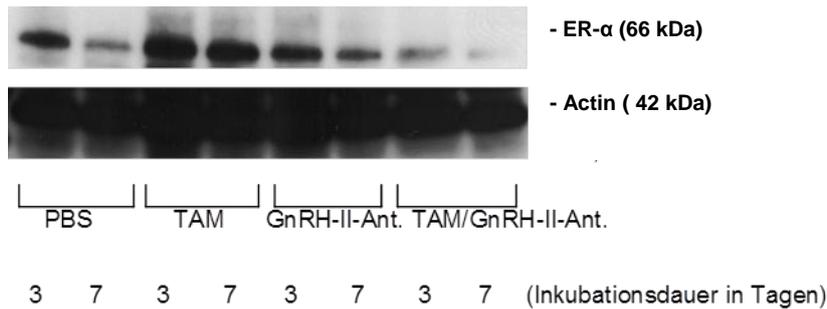


Abb. 3.14: Nachweis der ER- α -Expression der Zelllinie EFO-27. Es erfolgte lediglich ein qualitativer Nachweis.

3.4 ER- β -Expression humaner Ovarialkarzinomzellen

Die Untersuchung der Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3, EFO-21 und EFO-27 auf die Expression des ER- β erfolgte mittels RT-PCR in Bezug auf das *housekeeping gene* L7 auf molekularbiologischer Ebene. Die Versuche wurden in drei unabhängigen Experimenten mit drei verschiedenen Passagen wiederholt.

3.4.1 Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die ER- β -mRNA-Expression von SKOV-3-Zellen

Die Expression des ER- β zeigte bei der Zelllinie SKOV-3 seinen größten Anstieg nach 4 h Behandlungsdauer mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist (SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $2,87 \pm 0,91$ (n.s. vs. K)). Jedoch ergab sich kein Unterschied, welcher eine Signifikanz gegenüber der Kontrolle nach 4 h aufwies. Die Inkubation der Zelllinie SKOV-3 mit 1×10^{-7} M TAM bzw. 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der ER- β -Expression, verglichen mit der PBS-Kontrolle (SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM: $1,68 \pm 0,33$ (n.s. vs. K); SKOV-3, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $1,5 \pm 0,82$ (n.s. vs. K)) (Abb. 3.15).

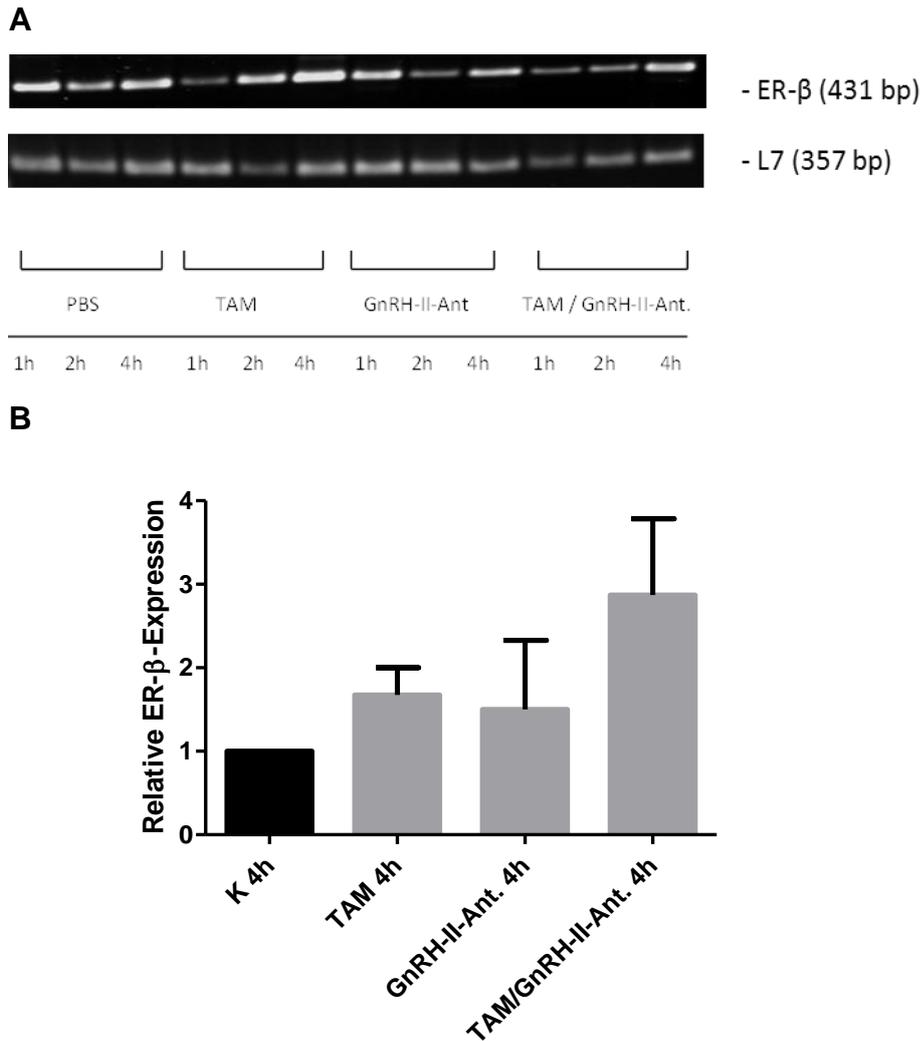


Abb. 3.15 A: Semiquantitativer Nachweis der ER- β -Expression der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 nach Behandlung der Zellen mit den einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 1 h, 2 h und 4 h.

B: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 4 h auf das ER- β -Expressionsverhalten der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3: Die Zellen wurden für 24 h anwachsen gelassen, die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der RNA wurde 4 h nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

3.4.2 Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die ER- β -mRNA-Expression von EFO-27-Zellen

Während die Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist bei der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 vor allem einen Anstieg der Expression aller untersuchten Rezeptoren vermittelte, zeigte die Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27 ein nahezu gegensätzliches Verhalten. Die größten Verminderungen der ER- β -Expression zeigten sich

nach 4 h Behandlung mit den einzelnen Substanzen Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist. Die Abnahme der ER- β -Expression erwies sich für die Inkubation mit Tamoxifen und mit dem GnRH-II-Antagonist für 4 h als signifikant, verglichen mit der Kontrolle (EFO-27, 1×10^{-7} M TAM: $0,45 \pm 0,2$ ($p < 0,05$ vs. K)); EFO-27, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $0,35 \pm 0,02$ ($p < 0,01$ vs. K)). Die Behandlung der Zellen mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist bewirkte eine tendenziell abnehmende, jedoch nicht signifikante ER- β -Expression (EFO-27, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant: $0,67 \pm 0,18$ (n.s. vs. K)) (Abb. 3.16).

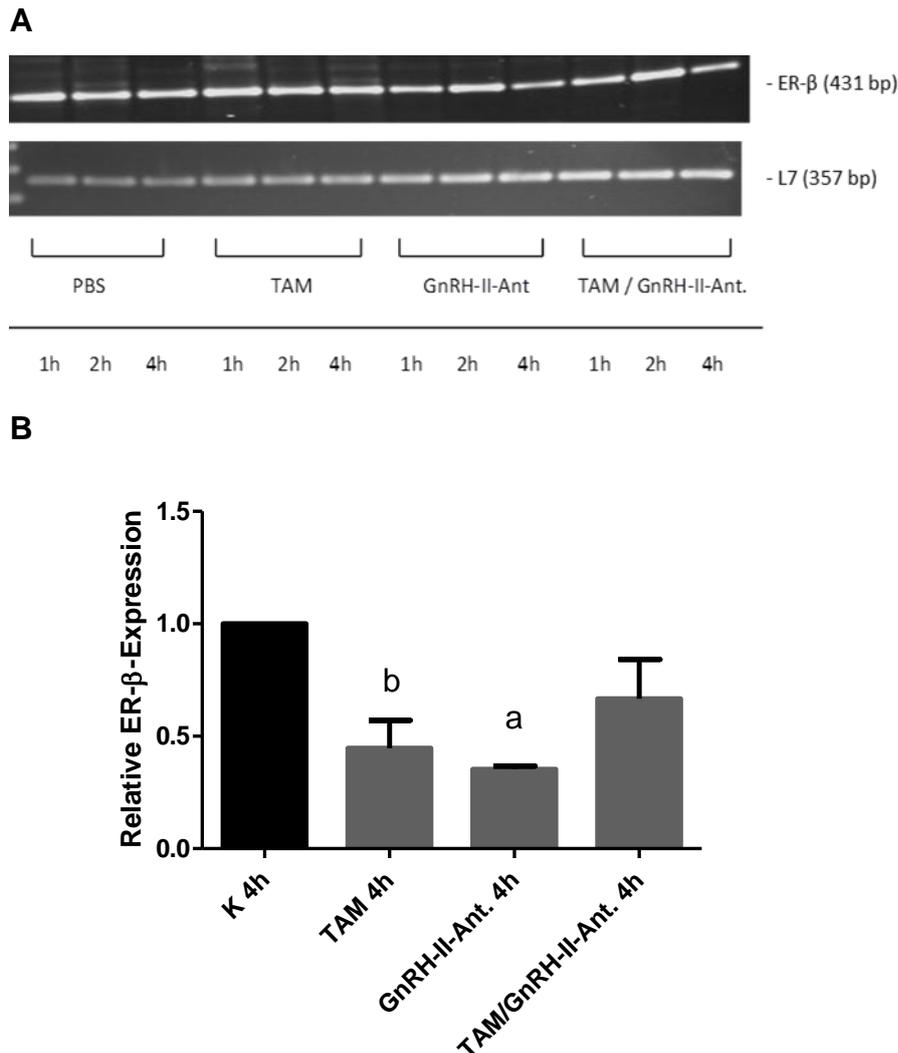


Abb. 3.16 A: Semiquantitativer Nachweis der ER- β -Expression der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27 nach Behandlung der Zellen mit den einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 1 h, 2 h und 4 h.

B: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 4 h auf das ER- β -Expressionsverhalten der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27: Die Zellen wurden für 24 h inkubiert, die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der RNA wurde 1 h, 2 h und 4 h nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test. a, $p < 0,01$ vs. Kontrolle; b, $p < 0,05$ vs. Kontrolle ($n=3$).

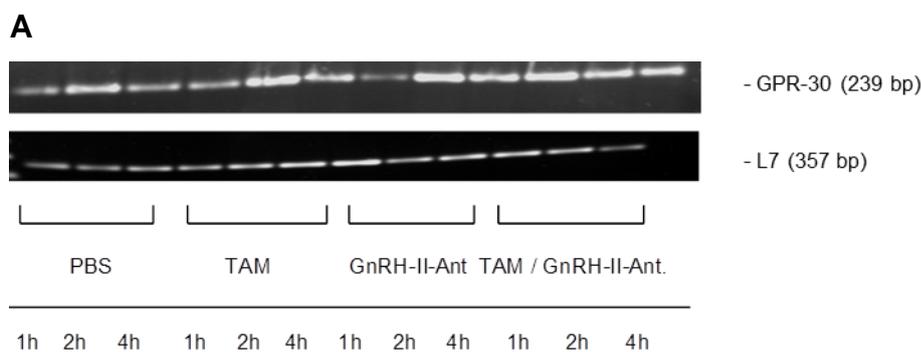
3.5 GPR-30-Expression humaner Ovarialkarzinomzellen

Die Untersuchung der Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3, EFO-21 und EFO-27 auf die Expression des GPR-30 erfolgte mittels RT-PCR in Bezug auf das *housekeeping gene* L7 auf molekularbiologischer Ebene. Die Versuche wurden in drei unabhängigen Experimenten mit drei verschiedenen Passagen wiederholt.

3.5.1 Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die GPR-30-mRNA-Expression von SKOV-3-Zellen

Bei Behandlung der Zelllinie SKOV-3 mit 1×10^{-7} M TAM und 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. in einzelner Anwendung zeigten sich nahezu keine Unterschiede bezüglich der GPR-30-Expression, verglichen mit der Kontrolle (SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM: $1,24 \pm 0,35$ (n.s. vs. K); SKOV-3, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $1,06 \pm 0,35$ (n.s. vs. K)).

Für die Zelllinie SKOV-3 ergab sich nach 4 h eine tendenziell vermehrte Expression des GPR-30 bei Inkubation mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist (SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $3,97 \pm 2,34$ (n.s.)). Es ergab sich keine Signifikanz bezogen auf die Kontrolle (Abb. 3.17).



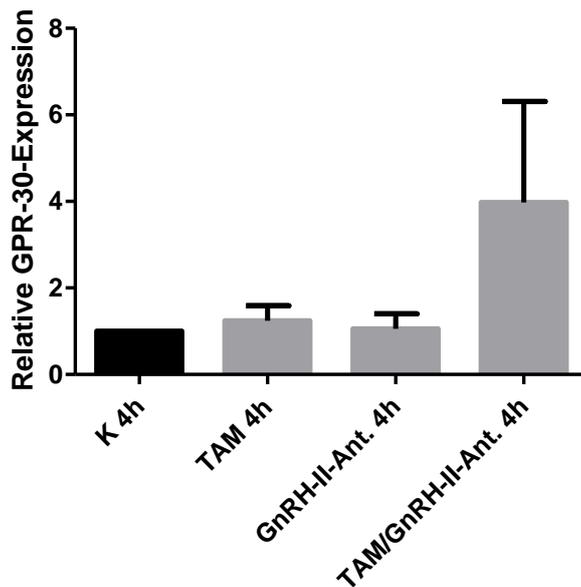
B

Abb. 3.17 A: Semiquantitativer Nachweis der GPR-30-Expression der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 nach Behandlung der Zellen mit den einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 1 h, 2 h und 4 h.

B: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 4 h auf das GPR-30-Expressionsverhalten der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert, die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der RNA wurde 4 h nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

3.5.2 Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die GPR-30-mRNA-Expression von EFO-27-Zellen

Bei der Zelllinie EFO-27 stellte sich nach 2 h Inkubationszeit mit Tamoxifen eine deutliche Tendenz zum Anstieg der GPR-30-Expression dar (EFO-27, 1×10^{-7} M TAM: $2,34 \pm 0,88$ (n.s. vs. K)).

Bei Inkubation der Zelllinie mit dem GnRH-II-Antagonisten in einzelner Anwendung kam es zu nahezu keiner Veränderung der GPR-30-Expression verglichen mit der Kontrolle (EFO-27, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $0,91 \pm 0,33$ (n.s. vs. K)).

Die GPR-30-Expression der Zelllinie EFO-27 zeigte im Gegensatz zur Zelllinie SKOV-3 eine abnehmende Tendenz bei Behandlung der Zellen mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist, welche nach 2 h Behandlungsdauer am stärksten ausgeprägt, jedoch nicht signifikant war (EFO-27, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $0,51 \pm 0,21$ (n.s. vs K)) (Abb. 3.18).

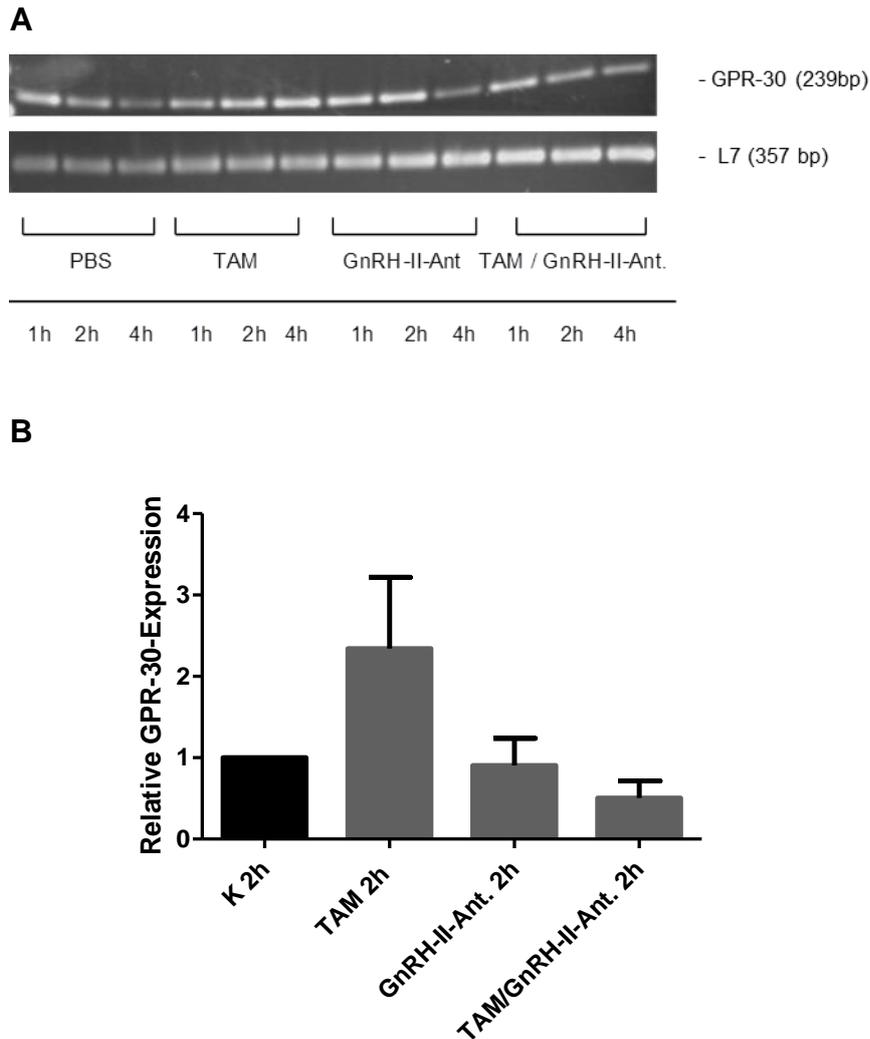


Abb. 3.18 A: Semiquantitativer Nachweis der GPR-30-Expression der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27 nach Behandlung der Zellen mit den einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 1 h, 2 h und 4 h.

B: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 2 h auf das GPR-30-Expressionsverhalten der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert, die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der RNA wurde 2 h nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

3.6 GnRH-II-Rezeptor-Expression humaner Ovarialkarzinomzellen

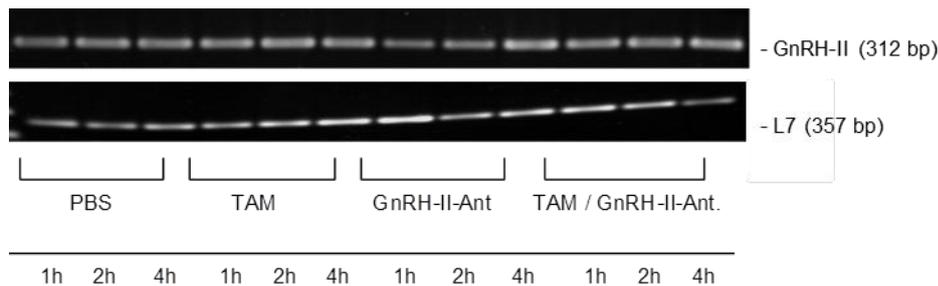
Die Untersuchung der Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3, EFO-21 und EFO-27 auf die Expression des GnRH-II-Rezeptors erfolgte mittels RT-PCR in Bezug auf das housekeeping gene L7 auf molekularbiologischer Ebene. Die Versuche wurden in drei unabhängigen Experimenten mit drei verschiedenen Passagen wiederholt.

3.6.1 Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die GnRH-II-mRNA-Expression von SKOV-3-Zellen

Bei Behandlung der Zelllinie SKOV-3 mit 1×10^{-7} M TAM und 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. in einzelner Anwendung zeigten sich nahezu keine Unterschiede bezüglich der GnRH-II-Rezeptor-Expression, verglichen mit der Kontrolle (SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM: $0,79 \pm 0,2$ (n.s. vs. K); SKOV-3, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $0,66 \pm 0,22$ (n.s. vs. K)).

Die Expression des GnRH-II-Rezeptors zeigte die größten Veränderungen nach 1 h Inkubation mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist. Hier kam es tendenziell zu einer stärkeren Expression des GnRH-II-Rezeptors verglichen mit der Kontrolle, welche jedoch nicht signifikant war (SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant: $2,85 \pm 1,34$ (n.s. vs. K)) (Abb. 3.19).

A



B

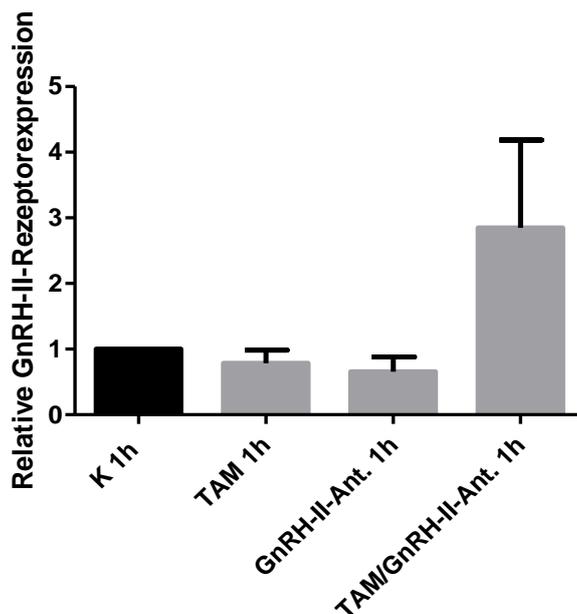
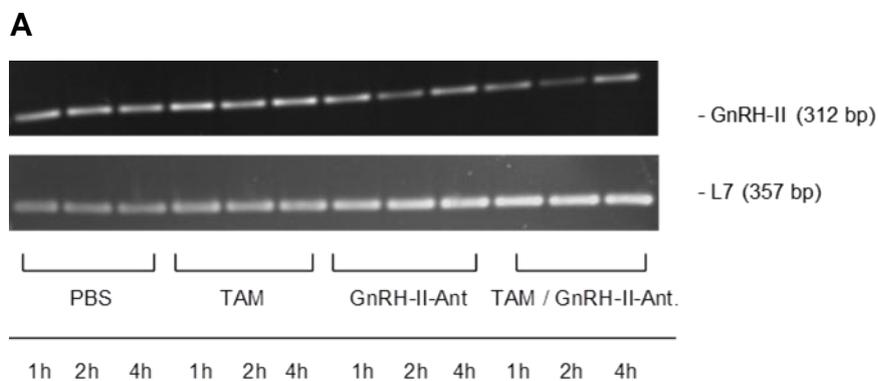


Abb. 3.19 A: Semiquantitativer Nachweis der GnRH-II-Expression der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 nach Behandlung der Zellen mit den einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 1 h, 2 h und 4 h.

B: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 1 h auf das GnRH-II-Rezeptor-Expressionsverhalten der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert, die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der RNA wurde 1 h nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

3.6.2 Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die GnRH-II-mRNA-Expression von EFO-27-Zellen

Die GnRH-II-Rezeptorexpression zeigte sich bei der Zelllinie EFO-27 im Gegensatz zur Zelllinie SKOV-3 bei Inkubation mit den einzelnen Substanzen, am meisten jedoch bei Inkubation mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist tendenziell abnehmend. Nach 4 h Inkubationszeit, ergab sich für die einzelnen Substanzen und für die Kombination der Wirkstoffe eine signifikante Abnahme der Rezeptorexpression (EFO-27, 1×10^{-7} M TAM: $0,62 \pm 0,1$ ($p < 0,05$ vs. K); EFO-27, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant. $0,43 \pm 0,1$ ($p < 0,01$ vs. K); EFO-27, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $0,47 \pm 0,03$ ($p < 0,01$ vs. K)) (Abb. 3.20).



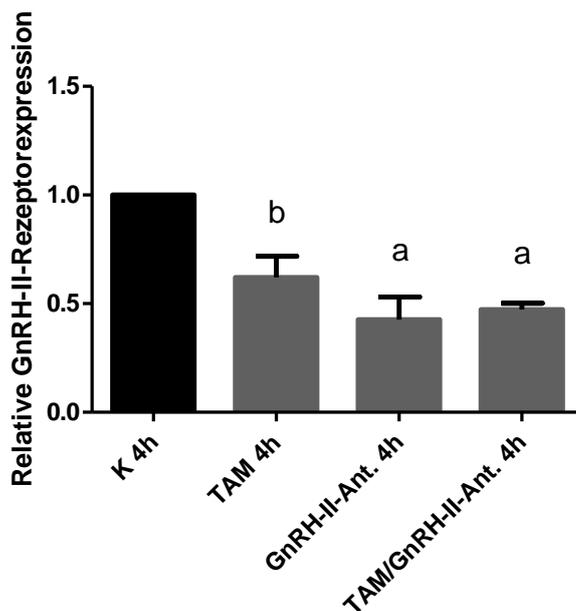
B

Abb. 3.20 A: Semiquantitativer Nachweis der GnRH-II-Expression der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27 nach Behandlung der Zellen mit den einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 1 h, 2 h und 4 h.

B: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 4 h auf das GnRH-II-Rezeptor-Expressionsverhalten der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert, die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der RNA wurde 4 h nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test. a, $p < 0,01$ vs. Kontrolle, b, $p < 0,05$ vs. Kontrolle (n=3).

3.7 Rezeptorexpression der Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3, eine zusammenfassende Übersicht

Für die Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3 stellte sich eine ansteigende Tendenz der ER- β -Expression bei Inkubation mit den Substanzen dar, welche nach 2 h Inkubationszeit am deutlichsten zu beobachten war. Unter den verschiedenen angewandten Substanzen ließ sich der deutlichste Anstieg bei einer Inkubationsdauer von 2 h mit Tamoxifen beobachten (OVCAR-3, 1×10^{-7} M TAM: $1,58 \pm 0,34$ (n.s. vs. K); OVCAR-3, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $1,47 \pm 0,21$ (n.s. vs. K); OVCAR-3, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $1,19 \pm 0,31$ (n.s. vs. K)).

Die GPR-30-Expression zeigte ebenfalls eine ansteigende Tendenz, welche am stärksten bei Inkubation mit Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist in einzelner Anwendung und leicht vermindert bei Inkubation mit der Kombination von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten nach 4 h Inkubationszeit zu erkennen war (OVCAR-3, 1×10^{-7} M TAM:

1,66 ± 0,87 ; OVCAR-3, 1x10⁻⁵ M GnRH II-Ant.: 1,83 ± 0,87; OVCAR-3, 1x10⁻⁷ M TAM/ 1x10⁻⁵ M GnRH-II-Ant: 0,79 ± 0,23 (n.s. vs. K) .

Die Expression des GnRH-II-Rezeptors zeigte sich relativ konstant verglichen mit der PBS-Kontrolle bei Behandlung der Zellen mit den einzelnen Substanzen Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist (OVCAR-3, 1x10⁻⁷ M TAM: 0,8 ± 0,21; OVCAR-3, 1x10⁻⁵ M GnRH-II-Ant. 0,88 ± 0,37 (n.s. vs. K)). Nach 4 h Inkubationsdauer mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist kam es zu einer tendenziell ansteigenden Expression des GnRH-II-Rezeptors (OVCAR-3, 1x10⁻⁷ M TAM/1x10⁻⁵ M GnRH-II-Ant.: 1,13 ± 0,4 (n.s. vs. K)) (Abb. 3.21).

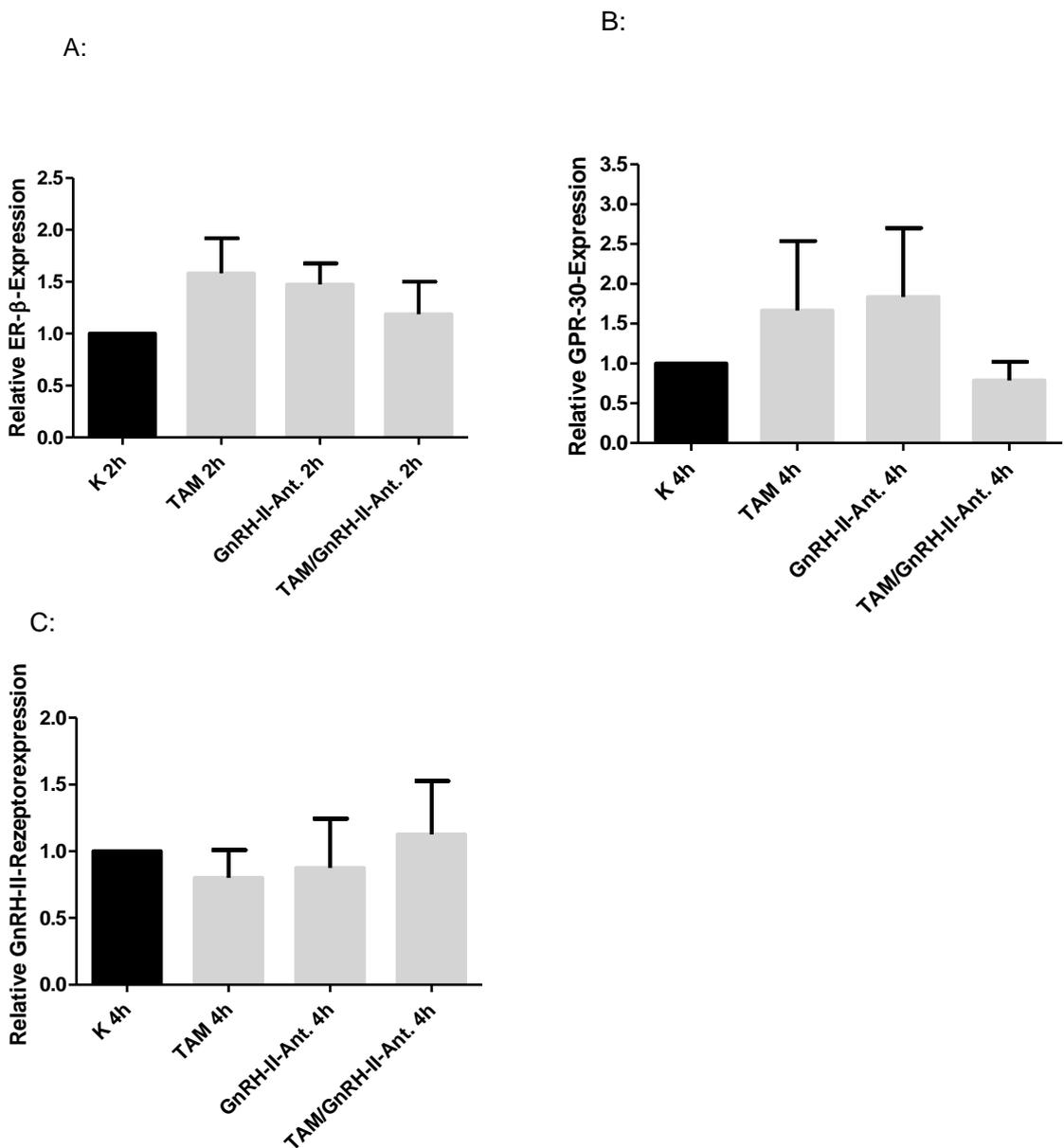


Abb. 3.21: A: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 2 h auf das ER-β-Expressionsverhalten der

Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert, die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der RNA wurde 2 h nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

B: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 4 h auf das GPR-30-Expressionsverhalten der Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert, die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der RNA wurde 4 h nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

C: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 4 h auf das GnRH-II-Rezepto-Expressionsverhalten der Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert, die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der RNA wurde 4 h nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

3.8 Rezeptorexpression der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-21, eine zusammenfassende Übersicht

Bei der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-21 kam es wie bei der SKOV-3 Zelllinie eher zu einem Anstieg der ER- β -Expression mit dem größten Anstieg nach 1 h Inkubation mit der Kombination aus Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist (EFO-21, 1×10^{-7} M TAM: $1,43 \pm 0,14$ (n.s. vs. K); EFO-21, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant: $1,52 \pm 0,27$ (n.s. vs. K); EFO-21, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant: $1,79 \pm 0,36$ (n.s. vs. K)).

Für die GPR-30-Expression ließ sich eine tendenziell ansteigende Rezeptorexpression bei Inkubation mit Tamoxifen für 1 h und 2 h, sowie bei Inkubation mit dem GnRH-II-Antagonisten nach 1 h beobachten. Nach 4 h Behandlungsdauer zeigte sich die Rezeptorexpression bei Behandlung mit allen Substanzen vermindert, am stärksten jedoch bei der Behandlung mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist (EFO-21, 1×10^{-7} M TAM: $0,81 \pm 0,26$ (n.s. vs. K); EFO-21, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $0,86 \pm 0,32$ (n.s. vs. K); EFO-21, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $0,68 \pm 0,19$ (n.s. vs. K)).

Die GnRH-II-Rezeptorexpression zeigte unabhängig von der Zeit jeweils die größte ansteigende Tendenz bei Inkubation mit Tamoxifen im Vergleich zu der Kontrolle. Nach 4 h Behandlungsdauer kam es bei Inkubation mit allen Substanzen zu einem leichten Rezeptorexpressionsanstieg (EFO-21, 1×10^{-7} M TAM: $1,35 \pm 0,37$ (n.s. vs. K); EFO-21, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $1,12 \pm 0,4$ (n.s. vs. K); EFO-21, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $1,23 \pm 0,32$ (n.s. vs. K)) (Abb. 3.22).

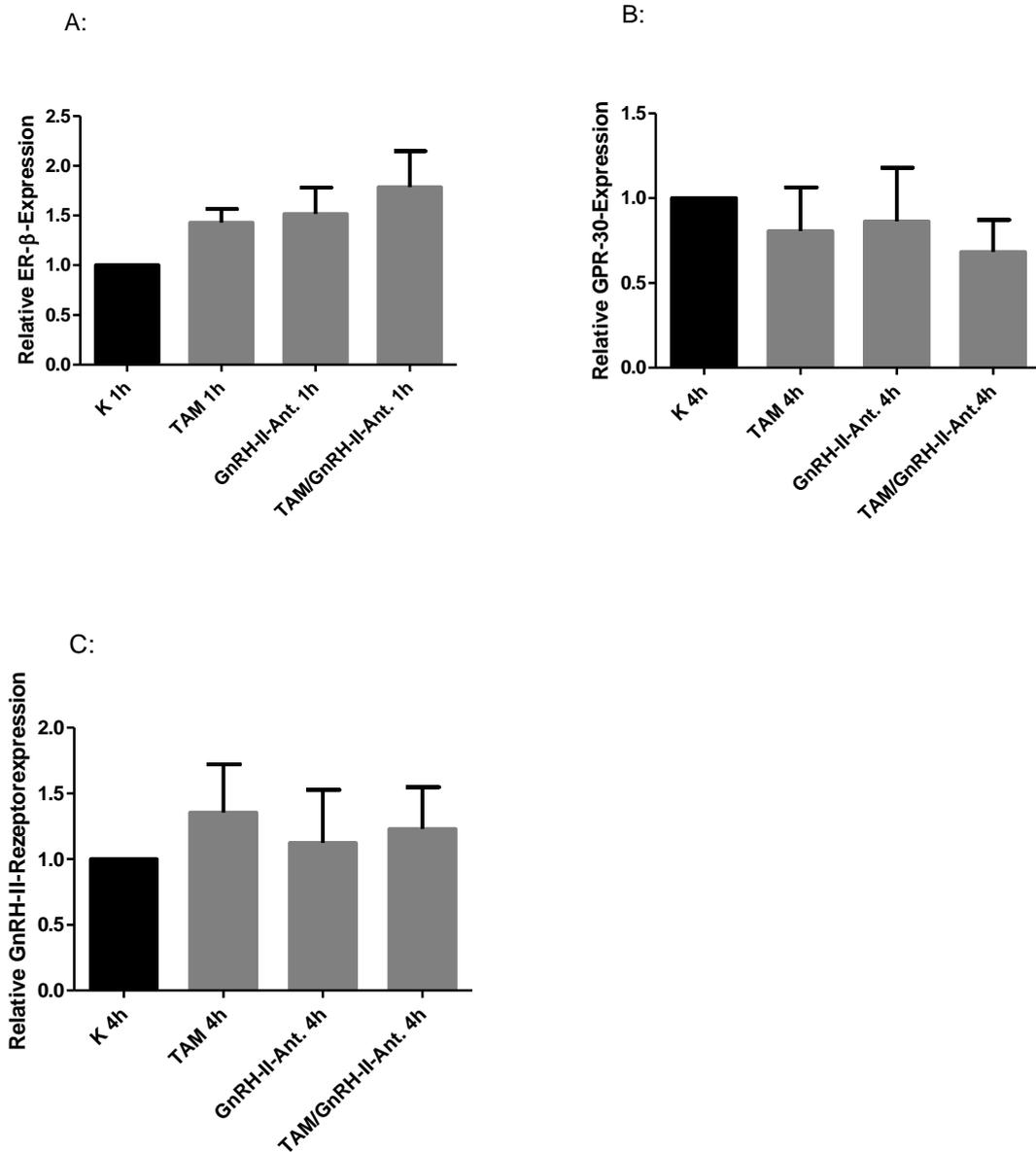


Abb. 3.22: A: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 1 h auf das ER-β-Expressionsverhalten der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-21. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert, die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der RNA wurde 1 h nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

B: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 4 h auf das GPR-30-Expressionsverhalten der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-21. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert, die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der RNA wurde 4 h nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

C: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 4 h auf das GnRH-II-Rezeptor-Expressionsverhalten der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-21. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert, die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der RNA wurde 4 h nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

3.9 Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Phosphorylierung der Apoptoseproteine p38 und JNK humaner Ovarialkarzinomzellen

Bei den Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3 und EFO-27 zeigten sich sowohl bei Behandlung mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist als auch bei der Kombination von Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist Tendenzen zur Reduktion der Zellzahl. Da die deutlichsten Unterschiede der Rezeptorexpression bei den Zelllinien SKOV-3 und EFO-27 beobachtet wurden, sollten diese nun noch bezüglich des apoptotischen Verhaltens anhand des Nachweises der apoptosetypischen Proteine p38 und JNK untersucht werden. Diese wurden mit Hilfe des Western-Blots nachgewiesen und in Bezug auf das zytosolische Aktin ausgewertet. Der Versuchsteil wurde mit Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist einzeln angewandt und mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist durchgeführt.

Die Daten wurden aus mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen erhoben.

Die phosphorylierten Proteine pp38 und pJNK bewirken eine Phosphorylierung von Bax, die zur Ausführung der Apoptose führt. pp38 und p38, sowie pJNK und JNK liegen normalerweise im Gleichgewicht vor. Bei verstärkter Apoptose liegen pp38 und pJNK jedoch im Überschuss vor. Es sind 10 Isoformen von JNK bekannt, welche von den drei Genen JNK-1, JNK-2 und JNK-3 kodiert werden und durch alternatives Splicing entstehen (Gupta et al. 1996; Coffey et al. 2002). JNK-1 besitzt eine Größe von 46 kDa, während JNK-2 eine Größe von 55 kDa aufweist (Sluss et al. 1994). JNK-2 besitzt eine deutlich höhere Bindungsaffinität für c-Jun als JNK-1 (Kallunki et al. 1994). JNK-3 weist eine Größe von 57 kDa auf.

Die Western-Blots wurden anhand des unter Methoden „2.2.4 Western Blot“ beschriebenen Schemas durchgeführt. Es wurde das Verhältnis von pp38 zu p38 sowie pJNK zu JNK untersucht. Dabei wurde jeweils nach 5, 10 und 20 min Inkubationsdauer mit der Gewinnung der Proteine aus den Zellen und in weiteren Schritten mit der Anfertigung der Western-Blots begonnen.

Insgesamt ließ sich nachweisen, dass Apoptose stattfand, jedoch bei keiner Bedingung wurde eine signifikante Steigerung, verglichen mit der jeweiligen PBS-Kontrolle, beobachtet.

3.9.1 Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Phosphorylierung des p38-Proteins von SKOV-3-Zellen

Das Verhältnis von pp38 zu p38 nahm für keine der untersuchten Zelllinien bei der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist zu. Bei der Zelllinie SKOV-3 zeigte Tamoxifen einzeln angewandt eine leichte Tendenz zur Zunahme des Verhältnisses von pp38 zu p38. Auch der GnRH-II-Antagonist zeigte einzeln angewandt nach 10 min eine leichte Steigerungstendenz des Verhältnisses von pp38 zu p38. Die Behandlung der Zelllinie SKOV-3 mit Kombination der Substanzen Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist bewirkte nahezu keine Veränderung des Verhältnisses von pp38 zu p38 (SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM: $1,12 \pm 0,16$ (n.s. vs. K); SKOV-3, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $1,21 \pm 0,22$ (n.s. vs. K); SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $1,21 \pm 0,33$ (n.s. vs. K)). Keine der Bedingungen ergab eine Signifikanz (Abb. 3.24).

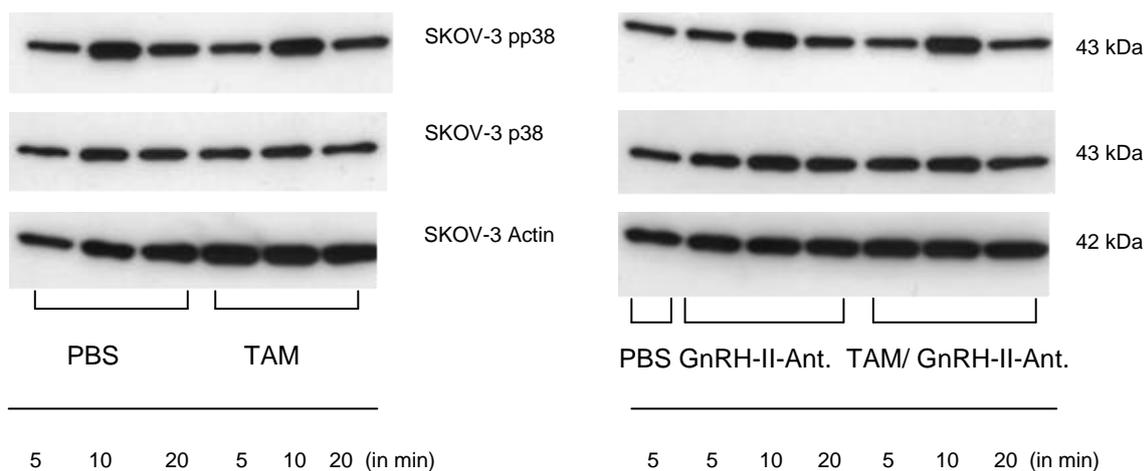


Abb. 3.23: Nachweis der Phosphorylierung des p38-Proteins von SKOV-3-Zellen bei Behandlung der Zellen mit den einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 5 min, 10 min und 20 min.

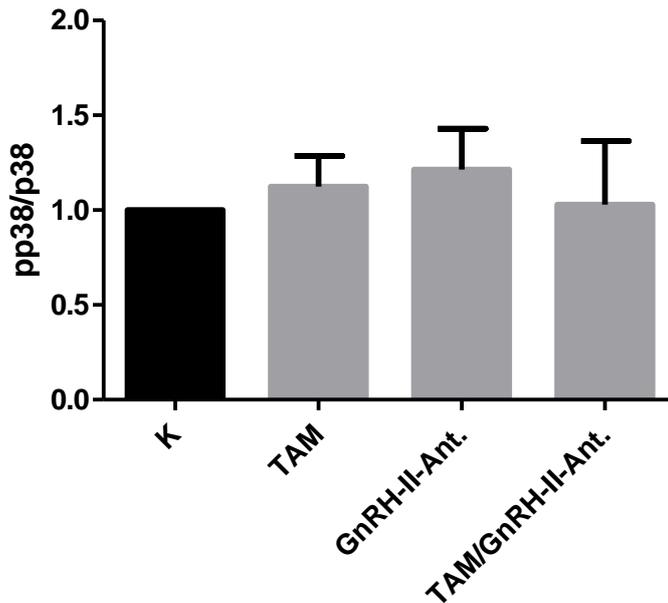


Abb. 3.24: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 10 min auf das Verhältnis der Apoptoseproteine pp38/p38 der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3. Die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der Proteine wurde 10 min nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

3.9.2 Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Phosphorylierung des p38-Proteins von EFO-27-Zellen

Bei der Zelllinie EFO-27 zeigte Tamoxifen einzeln angewandt keine Zunahme des Verhältnisses von pp38 zu p38. Auch der GnRH-II-Antagonist führte einzeln angewandt nach 10 min zu keiner Steigerung des Verhältnisses von pp38 zu p38. Die Behandlung der Zelllinie EFO-27 mit der Kombination der Substanzen Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist bewirkte ebenso nahezu keine Veränderung des Verhältnisses von pp38 zu p38 (EFO-27, 1×10^{-7} M TAM: $0,68 \pm 0,08$ (n.s. vs. K); EFO-27, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $0,91 \pm 0,13$ (n.s. vs. K); EFO-27, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $0,89 \pm 0,27$ (n.s. vs. K)). Keine der Bedingungen ergab eine Signifikanz (Abb. 3.26).

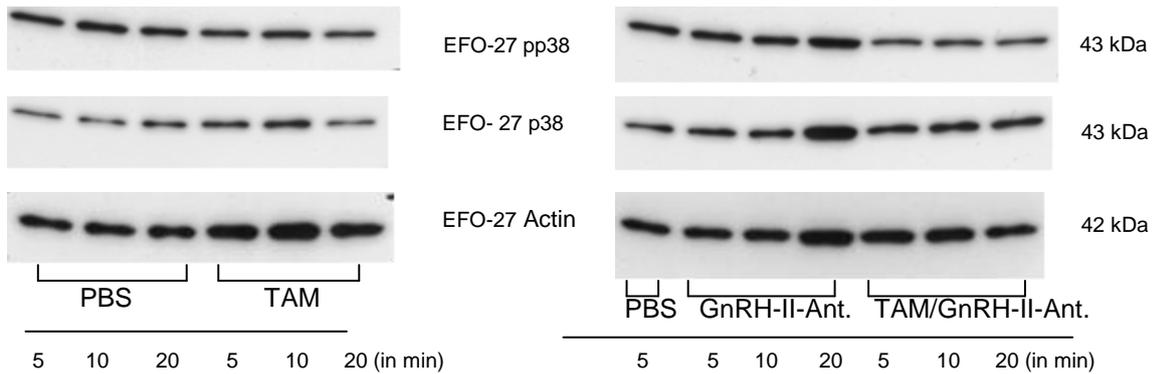


Abb. 3.25: Nachweis der Phosphorylierung des p38-Proteins von EFO-27-Zellen bei Behandlung der Zellen mit den einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 5 min, 10 min und 20 min.

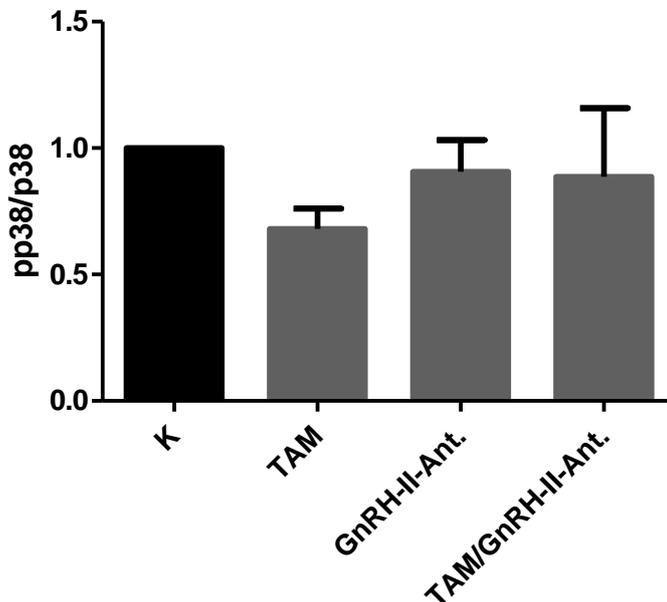


Abb. 3.26: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 10 min auf das Verhältnis der Apoptoseproteine pp38/p38 der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27. Die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der Proteine wurde 10 min nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

3.9.3 Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pa13), (D-3Pa16), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Phosphorylierung des JNK-Proteins von SKOV-3-Zellen

pJNK stieg in der Zelllinie SKOV-3 im Verhältnis zu JNK an. Bezüglich des Verhältnisses von pJNK-3 zu JNK-3 war dieser Anstieg am stärksten nach 10 min bei Behandlung der Zelllinie mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist zu beobachten (SKOV-3,

1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $4,32 \pm 2,93$ (n.s. vs. K)). Die Behandlung mit Tamoxifen einzeln angewandt, zeigte nach 10 min nahezu keine Veränderung des Verhältnisses pJNK-3/JNK-3 (SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM: $1,41 \pm 0,59$ (n.s. vs. K)). Auch die Behandlung mit dem GnRH-II-Antagonisten einzeln angewandt zeigte eine schwächere Tendenz der Steigerung von pJNK-3 im Verhältnis zu JNK-3 als die Behandlung der Zellen mit der Kombination von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten (SKOV-3, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $3,01 \pm 1,43$ (n.s. vs. K)) (Abb. 3.28).

Je länger die Zellen inkubiert wurden, desto mehr stieg das Verhältnis von pJNK zu JNK auch bei Inkubation mit dem GnRH-II-Antagonisten allein an. Nach 20 min stellte sich das Verhältnis von pJNK-3 zu JNK-3 bei Inkubation mit dem GnRH-II-Antagonisten und bei Inkubation mit der Kombination aus Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist ähnlich dar, wobei die Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist weiterhin zu einer stärkeren Steigerung des Verhältnisses von pJNK-3 zu JNK-3 führte. (SKOV-3, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $2,93 \pm 1,76$ (n.s. vs. K); SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $3,11 \pm 2,09$ (n.s. vs. K)). Die Behandlung der Zellen mit Tamoxifen einzeln angewandt zeigte auch nach 20 min weiterhin die schwächste Tendenz einer Steigerung des Verhältnisses von pJNK-3/JNK-3 (SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM: $1,37 \pm 0,44$ (n.s. vs. K)) (Abb. 3.29).

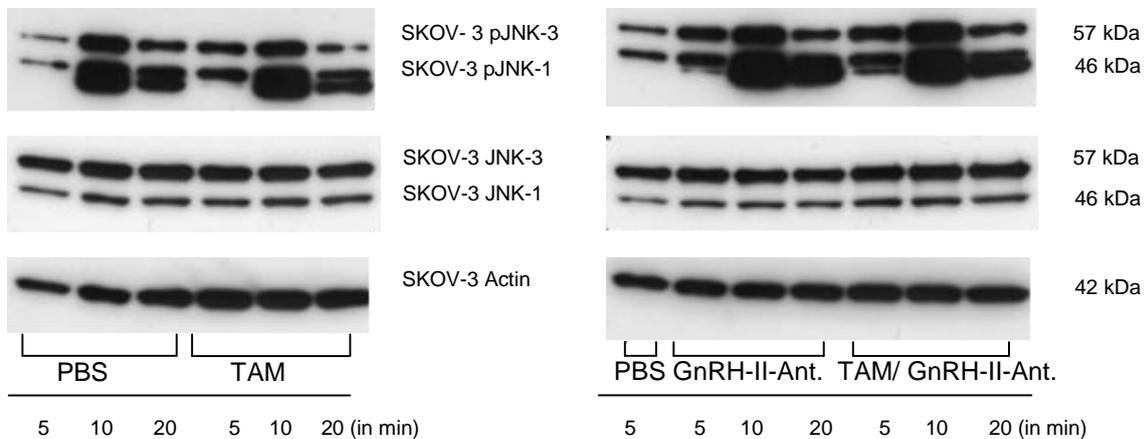


Abb. 3.27: Nachweis der Phosphorylierung des JNK-Proteins von SKOV-3-Zellen bei Behandlung der Zellen mit den einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 5 min, 10 min und 20 min.

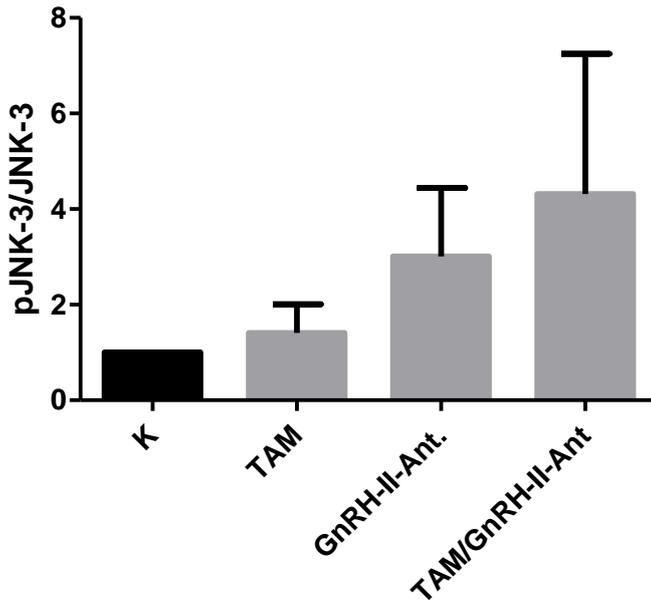


Abb. 3.28: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 10 min auf das Verhältnis der Apoptoseproteine pJNK-3/JNK-3 der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3. Die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der Proteine wurde 10 min nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

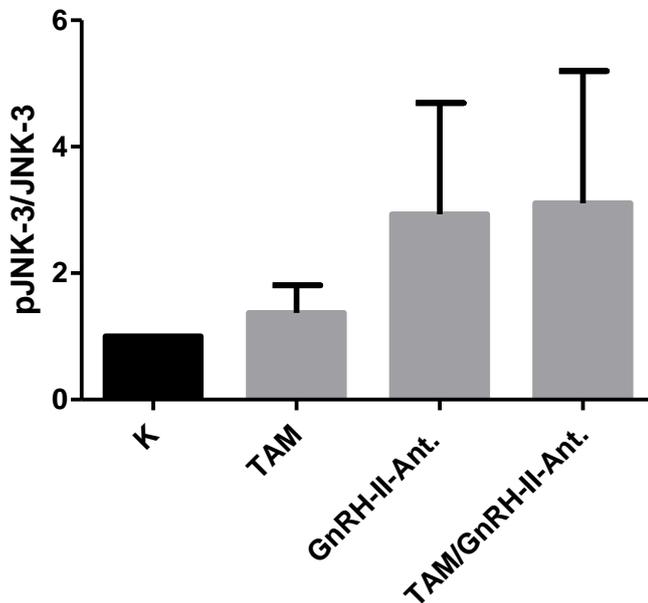


Abb. 3.29: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 20 min auf das Verhältnis der Apoptoseproteine pJNK-3/JNK-3 der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3. Die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der Proteine wurde 20 min nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

JNK-1 zeigte ihren stärksten Anstieg von pJNK-1 im Verhältnis zu JNK-1 ebenfalls nach 10 min Behandlung mit Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist (SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $4,460 \pm 3,81$ (n.s. vs. K)). Die Behandlung der Zellen mit Tamoxifen allein bewirkte erneut die schwächste Tendenz einer Steigerung von pJNK-1/JNK-1, und auch die Behandlung mit dem GnRH-II-Antagonisten in einzelner Anwendung zeigte eine schwächere Steigerungstendenz des Verhältnisses von pJNK-1/JNK-1 als die Behandlung mit der Kombination beider Substanzen (SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM $1,79 \pm 1,05$ (n.s. vs. K); SKOV-3, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $2,66 \pm 1,63$ (n.s. vs. K)) (Abb. 3.30).

Nach 20 min zeigte die Behandlung mit dem GnRH-II-Antagonisten in einzelner Anwendung bei pJNK-1/JNK-1 wie auch bei pJNK-3/JNK-3 einen zunehmenden Anstieg des Verhältnisses von pJNK/JNK, das Verhältnis war jedoch erneut am stärksten bei der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist ausgeprägt (SKOV-3, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $3,16 \pm 2,32$ (n.s. vs. K); SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $4,05 \pm 3,5$ (n.s. vs. K)). Am schwächsten war die Steigerungstendenz von pJNK-1/JNK-1 erneut bei der Behandlung der Zellen mit Tamoxifen in einzelner Anwendung (SKOV-3, 1×10^{-7} M TAM: $1,81 \pm 1,04$ (n.s. vs. K)) (Abb. 3.31).

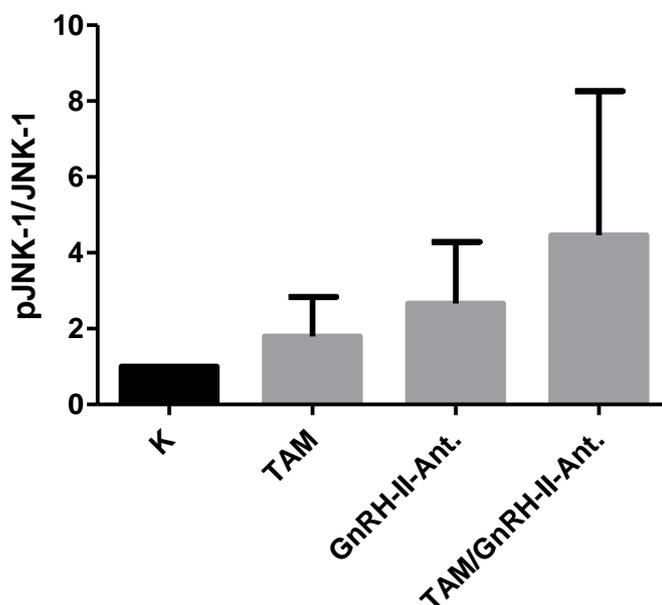


Abb. 3.30: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 10 min auf das Verhältnis der Apoptoseproteine pJNK-1/JNK-1 der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3. Die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der Proteine wurde 10 min nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

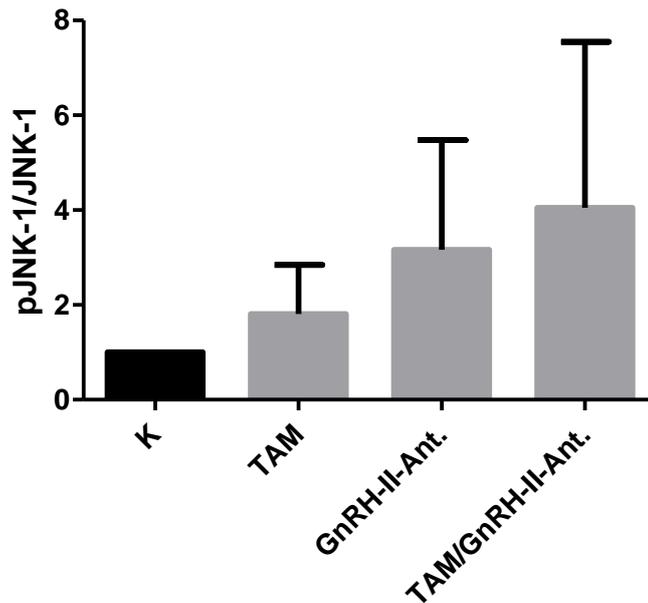


Abb. 3.31: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von TAM und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 20 min auf das Verhältnis der Apoptoseproteine pJNK-1/JNK-1 der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3. Die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der Proteine wurde 20 min nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

3.9.4 Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pa13), (D-3Pa16), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Phosphorylierung des JNK-Proteins von EFO-27-Zellen

Bei der Zelllinie EFO-27 zeigte sich anders als bei SKOV-3 schon nach 5 min ein stärkerer Anstieg von pJNK im Verhältnis zu JNK bei Behandlung der Zellen mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist (EFO-27, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $1,43 \pm 0,59$ (n.s. vs. K)). Die Behandlung der Zellen mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist zeigte erneut die tendenziell stärkste Zunahme des Verhältnisses von pJNK zu JNK. Die Behandlung der Zelllinie EFO-27 mit Tamoxifen in einzelner Anwendung zeigte wie auch bei SKOV-3 die kleinste Steigerung des Verhältnisses von pJNK/JNK (EFO-27, 1×10^{-7} M TAM: $1,09 \pm 0,28$ (n.s. vs. K)). Die Behandlung mit dem GnRH-II-Antagonisten allein zeigte nach 5 min ebenfalls eine schwächere Steigerungstendenz des Verhältnisses pJNK/JNK als die Behandlung der Zellen mit der Kombination der Substanzen (EFO-27, 10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $1,19 \pm 0,31$ (n.s. vs. K)) (Abb. 3.33).

Bei der Zelllinie EFO-27 zeigte sich jedoch genau wie auch bei der Zelllinie SKOV-3, dass es in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer auch zu einem tendenziell ansteigenden

Verhältnis von pJNK zu JNK nach alleiniger Behandlung mit dem GnRH-II-Antagonist kam. Nach 20 min war diese stärker ausgeprägt als bei der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist (EFO-27, 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $2,38 \pm 1,73$ (n.s. vs. K); EFO-27, 1×10^{-7} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.: $1,33 \pm 0,63$ (n.s. vs. K)). Die alleinige Behandlung der Zellen mit Tamoxifen zeigte auch nach 20 min Inkubationsdauer erneut die schwächste Veränderung des Verhältnisses pJNK/JNK (EFO-27, 1×10^{-7} M TAM: $0,99 \pm 0,27$ (n.s. vs. K)) (Abb. 3.34). Bei der Zelllinie EFO-27 wurde im Gegensatz zur Zelllinie SKOV-3 nur eine JNK-Kinase (JNK-1) nach der Behandlung phosphoryliert.

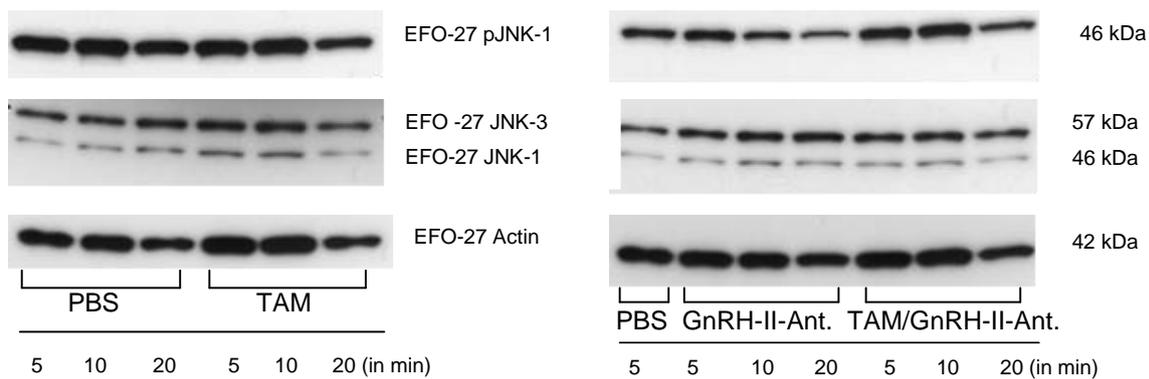


Abb. 3.32: Nachweis der Phosphorylierung des JNK-Proteins von EFO-27-Zellen bei Behandlung der Zellen mit den einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 5 min, 10 min und 20 min.

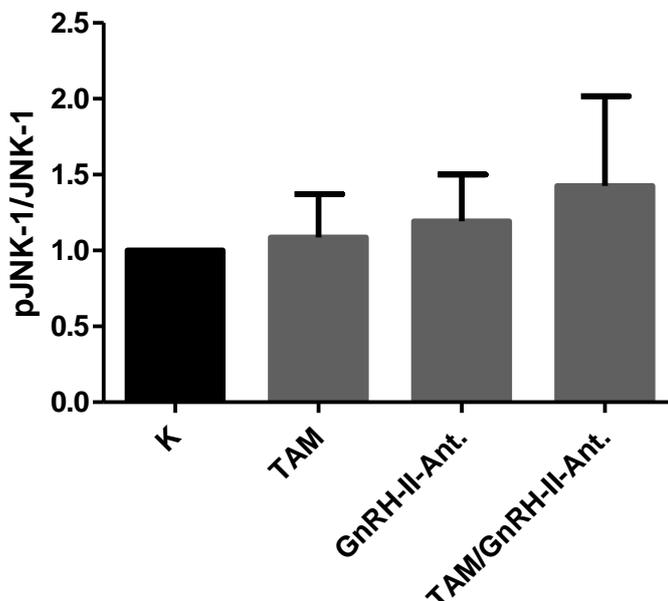


Abb. 3.33: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 5 min auf das Verhältnis der Apoptoseproteine pJNK-1/JNK-1 der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27. Die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der Proteine wurde 5 min nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

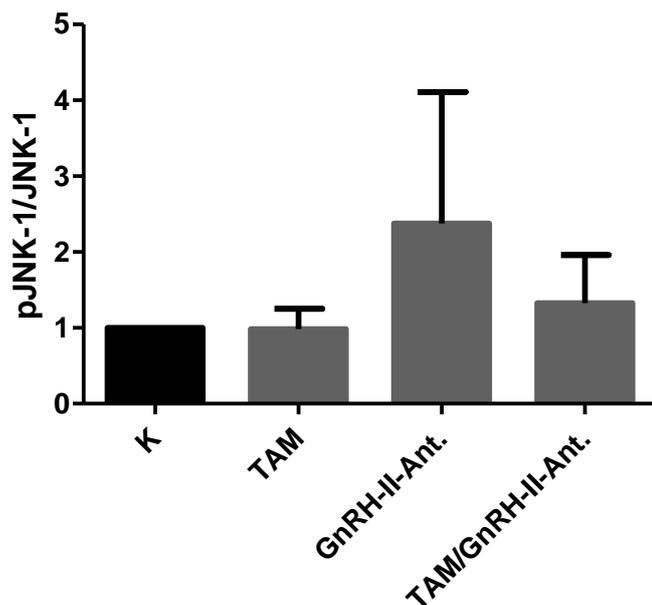


Abb. 3.34: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 20 min auf das Verhältnis der Apoptoseproteine pJNK-1/JNK-1 der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27. Die Zugabe der Substanzen erfolgte einmalig 24 h nach Aussäen der Zellen. Die Isolation der Proteine wurde 20 min. nach Zugabe der Substanzen vorgenommen. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels one-way ANOVA, gefolgt von Dunnett's multiple comparison test: n.s. vs. Kontrolle (n=3).

3.10 Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Spaltung von Caspase-3 in humanen Ovarialkarzinomzellen

3.10.1 Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Spaltung von Caspase-3 in SKOV-3-Zellen

Bei der Zelllinie SKOV-3 zeigte sich ein Anstieg der Spaltung von Caspase-3, sowohl bei Behandlung mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist als auch bei Behandlung mit dem GnRH-II-Antagonisten allein, verglichen mit der Kontrolle. Die Inkubation mit Tamoxifen einzeln angewandt wies die schwächere Spaltungstendenz auf (Abb. 3.35).

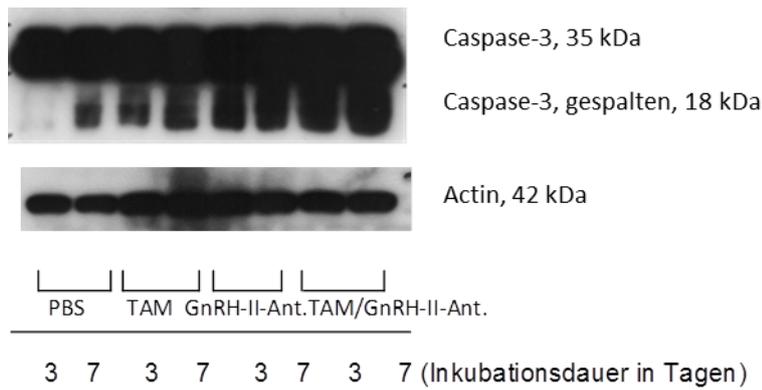


Abb. 3.35: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 3 und 7 d auf die Spaltung von Caspase-3 der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3. Die Zugabe der Substanzen erfolgte 24 h nach Aussäen der Zellen und ein weiteres Mal nach 96 h. Die Isolation der Proteine wurde 72 h und 168 h nach Zugabe der Substanzen vorgenommen.

3.10.2 Einfluss von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten [(AcD-2-Nal1), (D-4Cpa2), (D-3Pal3), (D-3Pal6), (D-Leu8), (D-Ala10)] auf die Spaltung von Caspase-3 in EFO-27-Zellen

Bei der Zelllinie EFO-27 zeigte sich eine vermehrte Tendenz der Spaltung von Caspase-3 bei Inkubation mit Tamoxifen allein und mit dem GnRH-II-Antagonisten allein, verglichen mit der Kontrolle. Die Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist führte im Gegensatz zur Zelllinie SKOV-3 zu keiner vermehrten Spaltung (Abb. 3.36).

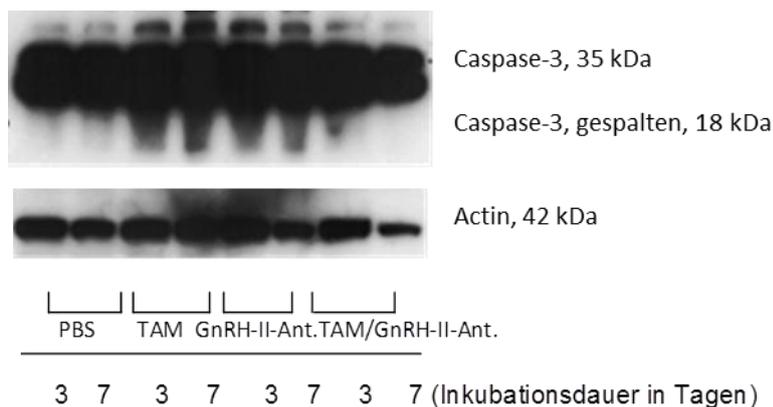


Abb. 3.36: Effekte der einzelnen Substanzen sowie der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist nach einer Inkubationsdauer von 3 und 7 d auf die Spaltung von Caspase-3 der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27.

Die Zellen wurden für 24 h inkubiert, die Zugabe der Substanzen erfolgte 24 h nach Aussäen der Zellen und ein weiteres Mal nach 96 h. Die Isolation der Proteine wurde 72 h und 168 h nach Zugabe der Substanzen vorgenommen.

4 Diskussion

Die Funktion des GnRH-II-Rezeptors und die Interaktion mit seinen Liganden wurden von vielen Arbeitsgruppen untersucht und stellen einen essentiellen Angriffspunkt in der endokrinen Therapie gynäkologischer Tumore dar.

Neben dem GnRH-I-System existiert das GnRH-II-System, das sowohl in gesundem Gewebe als auch in Karzinomen des Reproduktionstraktes vorkommt. Das GnRH-II-System findet sich in Uterus und Ovar (Gründker et al. 2002; Leung et al. 2004) sowie in anderen von Steroidhormonen abhängigen Organen wie der Brust (Günthert et al. 2005) und der Prostata (Darby et al. 2007).

GnRH-II bewirkt antiproliferative Effekte über den GnRH-II-Rezeptor (Gründker et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass GnRH-II-Antagonisten sogar noch stärker antiproliferativ wirken (Fister et al. 2007).

GnRH-II-Antagonisten lösen bereits in nanomolaren Konzentrationen Apoptose in vitro und in vivo in Endometriums-, Mamma- und Ovarialkarzinomen aus (Fister et al. 2009). Zudem wird von einem *cross-talk* zwischen dem GnRH-I- und dem GnRH-II-System ausgegangen. Der GnRH-II-Antagonist bindet dabei auch am GnRH-I-Rezeptor, wodurch die EGF-induzierte Signaltransduktion gehemmt wird (Eicke et al. 2006; Fister 2007; Fister et al. 2009).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die GnRH-II-Antagonisten in Kombination mit einem SERM oder einem SERD eine stärkere antiproliferative Wirkung erzielen. Denn gerade für sehr aggressive Tumore könnte es sinnvoll sein, die Therapie gegen mehr als nur einen Signalweg zu richten.

Als selektiver Estrogen-Rezeptor-Modulator (SERM) kann Tamoxifen abhängig vom Zielgewebe sowohl agonistisch als auch antagonistisch wirken (Prossnitz et al. 2008). Tamoxifen bindet mit einer hohen Affinität an die AF-2 Domäne des ER und verhindert damit die Bindung von Estrogenen (Ball et al. 2008; McInerney und Katzenellenbogen 1996). Zudem wird die Funktionsfähigkeit des Rezeptors verhindert und die Transkription von Genen supprimiert (Robertson 2001; Ball et al. 2008).

Fulvestrant wird als „reines Antiestrogen“ bezeichnet, da es die Effekte von Estrogenen komplett supprimiert. Fulvestrant verhindert die Dimerisierung des Estrogenrezeptors und bewirkt eine proteolytische Degradation des Estrogenrezeptors (Robertson 2001; Ishii et al. 2011; Carlson 2005).

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Kombinationstherapie mit Tamoxifen bzw. Fulvestrant und dem GnRH-II-Antagonisten auf die Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR-3, SKOV-3, EFO-21 und EFO-27 des Ovarialkarzinoms untersucht.

Für das Ovarialkarzinom gehört die endokrine Therapie mit SERMs - anders als beim Mamma-Karzinom - nicht zum therapeutischen Standard. Harries und Kaye (2001) beschrieben die Ansprechrate von Ovarialkarzinomen auf Tamoxifen als niedrig, aber dennoch signifikant.

Obwohl bis zu 60 % der Ovarialkarzinome ER- α exprimieren, sprechen nur 7-18 % davon auf eine Therapie mit Tamoxifen an, die auf die Blockade des Estrogen-Rezeptors gerichtet ist (Yap et al. 2009; Choi et al. 2011; Nowak-Markwitz et al. 2010). Nach den Leitlinien von 2013 (Leitlinie Ovarialkarzinom 2013) sind endokrine Therapien sogar beim Platin-resistenten Rezidiv des Ovarialkarzinoms einer Monotherapie unterlegen. Bei dieser Art von Tumorrezidiv untersuchten einige Arbeitsgruppen zuvor, ob Tamoxifen nicht sogar die Sensitivität der Tumore auf Cisplatin steigern könne (Nowak-Markwitz et al. 2010; McClay et al. 1994; Ferlini et al. 1999); sie kamen dabei jedoch nicht zu eindeutigen Ergebnissen. In der Studie von Nowak-Markwitz et al. (2010) zeigten einige der untersuchten Zelllinien eine höhere Ansprechrate, aber einige reagierten auch nicht auf die Behandlung mit Tamoxifen. McClay et al. (1994) zeigten mit ihrer Studie, dass die Entwicklung von Cisplatinresistenzen durch eine Behandlung mit Tamoxifen erst später auftritt. Ercoli et al. (1999) stellten heraus, dass Tamoxifen und Cisplatin synergistisch bezüglich ihrer antiproliferativen Wirkung auf Zelllinien des Ovarialkarzinoms wirken.

Derzeit werden weitere endokrine Therapien mit Tamoxifen oder GnRH-Analoga untersucht, aber die niedrigen Ansprechraten auf Tamoxifen von 7-18 % (Nowak-Markwitz et al. 2010) bzw 8 % im Mittel (Makar 2000) zeigen, dass die Möglichkeiten der endokrinen Therapie noch verbessert werden müssen. Dennoch profitieren bis 20–75 % der Patienten zumindest für eine kurze Zeit von einer endokrinen Therapie mit Tamoxifen (Makar 2000). Rzepka-Górska et al. zeigten in ihrer Studie auf, dass ein endokriner Therapieansatz mit GnRH-Analoga als Kombinationspartner bei der medikamentösen Therapie von Ovarialkarzinomen in späteren Stadien Vorteile bringen könnten (Rzepka-Górska et al. 2003).

4.1 Wirkung der Substanzen auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen und mögliche Signalwege

Um in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung des GnRH-II-Antagonisten in Kombination mit Tamoxifen beziehungsweise Fulvestrant näher zu beleuchten, wurden zunächst Alamar-Blue-Assays angefertigt.

Bei den Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3 und EFO-27 zeigte sowohl die Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist als auch von Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist eine tendenziell stärkere Antitumorwirkung als die Substanzen einzeln angewandt. Die Behandlung der Zelllinie OVCAR-3 mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist (1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.) und mit der Kombination von Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist (1×10^{-7} M Fulvestrant/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.) ergab eine signifikante Reduktion der Zellzahl (in % der Kontrolle), verglichen mit der Kontrolle. Auch verglichen mit den Substanzen in einzelner Anwendung (1×10^{-6} M TAM, 1×10^{-7} M Fulvestrant), zeigte die Zelllinie OVCAR-3 nach Behandlung mit den Kombinationen von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist (1×10^{-6} M TAM/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.) und Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist (1×10^{-7} M Fulvestrant/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant.) eine signifikante Reduktion der Zellzahl.

Die Zelllinie EFO-21 reagierte als einzige Zelllinie nicht auf die Behandlung mit der Kombination von Tamoxifen bzw. Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist, so dass der Versuchsaufbau dahin verändert wurde, dass die Zellen mehrmals mit dem GnRH-II-Antagonisten behandelt wurden, um eine eventuelle zeitlich bedingte Wirkungsabnahme des GnRH-II-Antagonisten auszuschließen. Diese mehrmalige Behandlung der Zellen führte zu keiner Reduktion der Zellzahl. Der Versuchsteil wurde somit lediglich für die Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist durchgeführt.

Sowohl bei der Zelllinie OVCAR-3 als auch bei den Zelllinien SKOV-3 und EFO-27 erwies die Kombination von Tamoxifen bzw. Fulvestrant und dem GnRH-II-Antagonisten eine tendenziell stärkere Reduktion der Zellzahl als die Substanzen in einzelner Anwendung. Die Zellzahlreduktion nahm bei den Zelllinien OVCAR-3 und SKOV-3 mit der Konzentration der Substanzen zu, wobei die Konzentration von Tamoxifen dabei eine wichtige Rolle spielte. Der Zusammenhang von stärkerer Apoptosereaktion bzw. größerer antiproliferativer Wirkung bei einer höheren Konzentration von Tamoxifen ist bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden (Brandt et al. 2004; Zhang et al. 1999).

Fulvestrant bewirkte in den untersuchten Zelllinien bei einzelner Anwendung entweder keine Abnahme der Zellzahl (OVCAR-3, SKOV-3) oder sogar eine signifikante Steigerung der Zellzahl (in % der Kontrolle) (EFO-21, EFO-27), welche durch die Zugabe des GnRH-II-Antagonisten unterdrückt wurde. Auch der GnRH-II-Antagonist ergab bei den Zelllinien EFO-

21 und EFO-27 teilweise in einzelner Anwendung eine signifikante Steigerung der Zellzahl (in % der Kontrolle) verglichen mit der Kontrolle. Bei jeder Zelllinie konnte eine signifikante Reduktion der Zellzahl (in % der Kontrolle) bei Behandlung der Zellen mit der Kombination von 1×10^{-7} M Fulvestrant/ 1×10^{-5} M GnRH-II-Ant., verglichen mit Fulvestrant in einzelner Anwendung dargestellt werden. Da die Zelllinien jedoch auf die alleinige Behandlung mit Fulvestrant teilweise mit einer Zunahme der Zellzahl (in % der Kontrolle) reagierten, führte diese Erkenntnis dazu, dass weitere Versuche lediglich mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist weitergeführt wurden.

4.1.1 Der Kombinationseffekt von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist

Der beobachtete verstärkte Antitumoreffekt bei Kombination der Substanzen Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist setzt sich aus Apoptosereaktionen und aus proliferationsmindernden Reaktionen zusammen. Sowohl Tamoxifen als auch der GnRH-II-Antagonist verursachen diese Effekte über verschiedene Signalkaskaden.

Bindet der GnRH-II-Antagonist an den GnRH-II-Rezeptor, führt dies zur Auslösung von Apoptose durch die MAP-Kinasen JNK und p38 und durch Spaltung von Caspase-3 (Fister et al. 2009). Der GnRH-II-Antagonist bindet jedoch zu einem gewissen Anteil vermutlich auch an den GnRH-I-Rezeptor (Fister et al. 2007; Fister et al. 2009) und bewirkt dort eine Hemmung der EGF-induzierten mitogenen Signaltransduktion. Somit findet also auch eine Hemmung der Proliferation statt (Eicke et al. 2006).

Bindet Tamoxifen an den ER- α , führt dies unter anderem zur Rekrutierung von Co-Repressor-Proteinen, was wiederum über Histonacetylierung und Chromatinumwandlungen die Transkription von Genen supprimiert (Ball et al. 2008). Durch diese Hemmung des Signalwegs kommt es zu Apoptose und zu verminderter Zellproliferation. Darüber hinaus ist bekannt, dass Tamoxifen auch in Estrogen-Rezeptor-negativen Tumorzellen der Brust und auch der Ovarien zu Apoptose führen kann (Ferlini et al. 1999; Weng et al. 2008). Hierbei spielen die Erzeugung von oxidativem Stress und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B eine Rolle (Ferlini et al. 1999). NF- κ B steigert dabei die c-myc-Aktivität, welche ihrerseits zu Zytostase und Apoptose führen kann (Ferlini et al. 1999).

Möglicherweise wirken Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist bei der Verstärkung des Antitumoreffekts synergistisch, was die stärkere Antitumorwirkung bei simultaner Anwendung von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist erklären würde.

4.2 Die Rezeptorexpression der untersuchten Zelllinien

Darüber hinaus sollte in dieser Arbeit geklärt werden, inwiefern die unterschiedlichen Rezeptorantworten auf die Stimulation durch die Liganden bei der Signaltransduktion eine Rolle spielen. Die Zelllinien wurden daher in Bezug auf das Expressionsverhalten ihrer Rezeptoren (ER- α , ER- β , GPR-30, GnRH-II-Rezeptor) nach Behandlung mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten weiter charakterisiert.

Der ER- α konnte selbst mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren nur für die Zelllinie SKOV-3 detektiert werden. Es gibt zwar Arbeiten, die zeigen, dass auch die anderen Zelllinien OVCAR-3 (Brasseur et al. 2013) und EFO-21 (Hermann et al. 2008) immunhistochemisch nachgewiesenen ER- α aufweisen, dennoch kam es auch in anderen Arbeitsgruppen vor, dass der ER- α anhand der Durchführung von PCRs oder auch immunhistochemischen Methoden nicht dargestellt werden konnte. Halon et al. (2011) wiesen in ihrer Studie eine ER- α -Expression mittels Immunhistochemie lediglich in einer von elf Ovarialkarzinomzelllinien nach. Die Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3, EFO-21 und EFO-27 waren bei dieser Untersuchung ER- α negativ und nur die Zelllinie A2780P zeigte eine ER- α -Expression.

In der Studie von Kolkova et al. (2012) wurden sieben Ovarialkarzinomzelllinien untersucht, wobei nur drei davon mRNA des ER- α exprimierten. Der ER- α konnte hier in der Zelllinie OVCAR-3 wie auch in dieser Arbeit nicht dargestellt werden. Auch in der Arbeitsgruppe von O'Donnell et al. (2005) konnte der ER- α bei der Zelllinie OVCAR-3 nicht detektiert werden. Eine Ursache für das unterschiedliche Vorkommen der Rezeptoren bei Zelllinien gleicher Abstammung könnte darin zu finden sein, dass sich die Zellen im Laufe der Kultivierung verändern und somit auch zwischen den verschiedenen Laboratorien Unterschiede zeigen.

Für die Zelllinie EFO-27 wurden in dieser Arbeit zusätzlich Western-Blots angefertigt, um auf Protein-Ebene den ER- α nachzuweisen und um auszuschließen, dass dieser bzw. sein Fehlen für die unterschiedlichen Reaktionen der Zelllinien verantwortlich sein könnte. Anhand dieser Methode war der ER- α in der Zelllinie EFO-27 detektierbar.

Die mRNA-Expression von ER- β , GPR-30-Rezeptor und GnRH-II-Rezeptor ließ sich in allen Zelllinien nachweisen. Da die Zelllinien SKOV-3 und EFO-27 bezüglich ihrer Rezeptorexpression sehr unterschiedlich auf die Behandlung mit den Substanzen Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist reagierten, wurden die Apoptosewege dieser Zelllinien näher charakterisiert.

4.2.1 Das Proliferations- und Rezeptorexpressionsverhalten der einzelnen Zelllinien nach Behandlung mit Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist

Bei den durchgeführten Versuchen wurden die Zelllinien mit den Substanzen mit unterschiedlicher Behandlungsdauer (1h, 2 h, 4 h) behandelt. Im Folgenden wird jeweils auf die Ergebnisse mit den größten Expressionsunterschieden bei Behandlung mit den einzelnen Substanzen Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist und bei der Kombination der beiden Wirkstoffe eingegangen.

4.2.1.1 Die Expression des ER- α nach Behandlung der Zelllinien mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonist

In den durchgeführten Versuchen ließ sich der ER- α lediglich für die Zelllinie SKOV-3 darstellen. Die Zunahme der Rezeptorexpression war signifikant bei Behandlung der Zellen mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist. Der ER- α spielt vermutlich eine Rolle bei der Antitumorwirkung auf die Ovarialkarzinomzellen bei Behandlung der Zellen mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist.

Zum einen ist eine vermehrte Expression des ER- α nützlich, da somit eine Therapie mit Tamoxifen besser am Rezeptor greifen kann, zum anderen könnte hierbei auch eine durch den GnRH-II-Antagonisten verhinderte Tamoxifen-Resistenz eine Rolle spielen. Unter Langzeitanwendung von Tamoxifen kommt es normalerweise zum ER- α -Abbau (Dorssers et al. 2001; Ring und Dowsett 2004; Zhou et al. 2005). Möglicherweise wirkt die simultane Anwendung eines GnRH-II-Antagonisten dieser Resistenz entgegen.

4.2.1.2 Die Expression des ER- β nach Behandlung der Zelllinien mit Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist

Bei den Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3 und EFO-21 zeigte sich eine tendenziell vermehrte Expression des ER- β bei Behandlung der Zellen mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist, verglichen mit der Kontrolle. Die Zelllinien SKOV-3 und EFO-21 zeigten eine stärkere Expression des ER- β nach Behandlung mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist als bei der Behandlung mit den einzelnen Substanzen.

Dem ER- β werden in der Literatur vor allem antiproliferative Eigenschaften zugeordnet (Zhao et al 2010; Bossard et al 2012).

Bei der Zelllinie SKOV-3 könnte zusätzlich die Wechselwirkung mit dem ER- α eine Rolle spielen (Zhao et al. 2010). Demnach könnte die Proliferation, welche durch Aktivierung des ER- α erfolgt, gehemmt werden.

Lediglich bei der Zelllinie EFO-27 kam sowohl bei einzelner Behandlung als auch bei der Behandlung mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist eine verminderte Expression zur Darstellung. Die Expressionsverminderung war bei Behandlung mit den einzelnen Substanzen Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist signifikant.

4.2.1.3 Die Expression des GPR-30 nach Behandlung mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonist

Bei den Zelllinien EFO-21 und EFO-27 kam es nach Behandlung der Zellen mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist tendenziell zu einer verminderten Expression des GPR-30.

Die Zelllinie OVCAR-3 zeigte bei Behandlung mit den einzelnen Substanzen Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist eine tendenziell vermehrte Expression des GPR-30. Die Behandlung mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist führte zu keiner vermehrten Expression.

Die proliferationssteigernde Wirkung durch Aktivierung des GPR-30 (Smith et al. 2010) könnte somit durch die Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist bei den Zelllinien EFO-21 und EFO-27 reduziert und bei der Zelllinie OVCAR-3 zumindest nicht begünstigt werden.

Lediglich bei der Zelllinie SKOV-3 zeigte sich eine tendenzielle gesteigerte Expression des GPR-30. Der proliferationsverstärkende Effekt durch den GPR-30 scheint jedoch durch andere antiproliferative Effekte ausgeglichen oder überlagert zu werden. Die Expression des GPR-30 zeigt sich nach Smith et al. positiv korreliert mit der EGF-Rezeptorexpression (Smith et al. 2010). Über den GPR-30 kommt es wiederum zu einer Freisetzung von EGF, welcher an den EGF-Rezeptor bindet und über weitere Signalkaskaden zur Proliferation führt. Diesem Vorgang wird in den vorliegenden Versuchen die proliferative Wirkung teilweise genommen. Dies könnte durch die Bindung des GnRH-II-Antagonisten an den GnRH-I-Rezeptor erfolgen, denn hier wird die EGF-induzierte Signaltransduktion gehemmt (Eicke et al. 2006). Eventuell liegt hier eine Querverbindung der Signalkaskaden vor.

Für die Zelllinie SKOV-3 ist bekannt, dass die Expression des GnRH-I-Rezeptors teilweise nicht erfolgt (Gründker et al. 2002). Von anderen Arbeitsgruppen konnte der Rezeptor in der Zelllinie SKOV-3 nachgewiesen werden (Chen et al. 2007; Poon et al. 2009). Selbst wenn der Rezeptor in der untersuchten Zelllinie von SKOV-3 nicht existieren sollte, ist bekannt, dass auch ohne Aktivierung des GnRH-I-Rezeptors die antiproliferative Wirkung durch eine Hemmung der EGF-Rezeptor-gesteuerten Signaltransduktion erfolgen kann (Gründker et al. 2004; Eicke et al. 2006). Dies könnte dann auch durch die Aktivierung des GnRH-II-Rezeptors geschehen.

4.2.1.4 Die Expression des GnRH-II-Rezeptors nach Behandlung der Zelllinien mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonist

Die Zelllinien OVCAR-3, und SKOV-3 zeigten die stärkste tendenzielle Expression des GnRH-II-Rezeptors nach Behandlung der Zellen mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist. Die Zelllinie EFO-21 zeigte eine vermehrte Expressionstendenz des GnRH-II-Rezeptors sowohl bei Behandlung mit den einzelnen Substanzen Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist als auch bei Behandlung mit der Kombination beider Substanzen.

Die durch den GnRH-II-Rezeptor ausgelösten antiproliferativen Eigenschaften können somit für die Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3 und EFO-21 begünstigt werden.

Bei der Zelllinie EFO-27 kam es bei allen Bedingungen zu einer signifikant verminderten Expression des GnRH-II-Rezeptors. Hier steht eventuell die antiproliferative Wirkung über den GnRH-I-Rezeptor im Vordergrund.

Insgesamt zeigt sich, dass die Kombinationstherapie von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist auch auf Rezeptorbasis Vorteile mit sich bringt und tendenziell einer Monotherapie mit Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist überlegen ist.

Die genetische Veränderung und die damit verbundene Rezeptorausstattung erklären möglicherweise die Unterschiede der antiproliferativen Effekte zwischen den verschiedenen Zelllinien.

Um genauer zu beleuchten, welchen Anteil die apoptotische Wirkung der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist bei der antiproliferativen Wirkung ausmacht, wurden die apoptosetypischen Proteine p38, JNK und Caspase-3 via Western-Blot in den Zelllinien SKOV-3 und EFO-27 untersucht, da die genannten Zelllinien in den Vorversuchen am unterschiedlichsten auf die Substanzen reagierten.

4.3 Auswirkung der Substanzen auf die Apoptoseproteine p38 und JNK und die Spaltung von Caspase-3

Bereits 2002 konnte durch Gründker et al. dargestellt werden, dass die antiproliferativen Effekte von GnRH-II auf Zellen des Ovarial-, Endometrium- und Mammakarzinoms signifikant höher sind als die von GnRH-I. Eicke et al. (2006) stellten heraus, dass GnRH-II die EGF-induzierte Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors und die Induktion der mitogen aktivierten Proteinkinase ERK-1/2 (extracellular-signal regulated kinases) hemmt.

Kim et al. (2004; 2005) beschrieben ebenfalls eine Beteiligung der MAP-Kinasen ERK-1/2 und p38, nicht jedoch von JNK durch GnRH-II-Agonisten.

Fister et al. (2007) konnten daraufhin zeigen, dass GnRH-II-Antagonisten, im Gegensatz zu GnRH-II-Agonisten, zu einer Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs über einen Anstieg der Caspase-3 und einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials in Mamma-, Ovarial- und Endometriumskarzinomen führen. Fister et al. (2009) stellten außerdem dar, dass GnRH-II-Antagonisten durch die Aktivierung der stressaktivierten MAP-Kinasen p38 und JNK zu Apoptose in Zellen des Endometriums-, Mamma- und Ovarial-Karzinoms *in vitro* und *in vivo* führen.

Die MAP-Kinasen p38 und JNK bewirken dabei durch Phosphorylierung die Aktivierung von Bax, welches zur mitochondrialen Membran transloziert und dort zu einer Freisetzung von Cytochrom C führt. Cytochrom C bildet zusammen mit ATP, Inhibitor Caspase-9 und Apaf-1 das Aptosom, welches daraufhin die Effektorcaspase-3 aktiviert (Fister et al. 2009).

Ein Anstieg der phosphorylierten Formen von p38 und JNK löst somit eine erhöhte Apoptoserate aus.

In der vorliegenden Arbeit wurden via Western Blot in den Zelllinien SKOV-3 und EFO-27 die phosphorylierten Formen der MAP-Kinasen pp38 und pJNK und die unphosphorylierten Formen detektiert sowie deren Verhältnisse quantitativ bestimmt und dargestellt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob auch eine Spaltung der Caspase-3 als Zeichen für stattfindende Apoptose erfolgt. Es sollte vor allem untersucht werden, ob die Kombination aus Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist zu einem stärkeren Anstieg der Apoptoseproteine führt, als dies bei einzelner Anwendung der Substanzen der Fall ist.

4.3.1 Wirkung der Substanzen auf das Verhältnis von phosphoryliertem p38 zu unphosphoryliertem p38 und von phosphoryliertem JNK zu unphosphoryliertem JNK

Sowohl bei der Zelllinie SKOV-3 als auch bei der Zelllinie EFO-27 ließ sich kein erhöhtes Verhältnis von pp38 zu p38 darstellen. Es lässt sich also vermuten, dass dieser Signalweg keine große Beteiligung an der antiproliferativen Wirkung von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist bei diesen beiden Zelllinien hat.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Zelllinie SKOV-3 für pJNK 3 und pJNK1 im Verhältnis zu den unphosphorylierten Formen JNK-1 und JNK-3 eine ansteigende Tendenz. Dieser Anstieg war nach 10 min Behandlung mit der Kombination von Tamoxifen und dem

GnRH-II-Antagonisten am größten. Bei der Zelllinie EFO-27 ließ sich nach 5 min der größte Anstieg des Verhältnisses von phosphoryliertem JNK-1 zum unphosphorylierten JNK bei Behandlung der Zellen mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist beobachten. Obwohl keiner der Anstiege im Vergleich zur Kontrolle signifikant war, lässt sich dennoch feststellen, dass die auftretenden Veränderungen bei der Kombination von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten bei den beiden Zelllinien SKOV-3 und EFO-27 markanter waren, als bei alleiniger Anwendung der Substanzen. Bei beiden Zelllinien kam es nach alleiniger Inkubation mit dem GnRH-II-Antagonisten zu einem Anstieg von phosphoryliertem JNK in Abhängigkeit von der Zeit. Dieser war hier nach 20 min am stärksten.

Die Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist scheint also nach kurzer Zeit schon sein Wirkmaximum bei der Auslösung von Apoptose via JNK zu haben, während der GnRH-II-Antagonist erst später sein Wirkmaximum erreicht. Ein Grund hierfür könnte in der apoptotischen Wirkung von Tamoxifen zu sehen sein, wobei genau wie auch bei den GnRH-II-Antagonisten Apoptosewege über die MAP-Kinasen JNK und auch p38 genutzt werden (Mandlekar und Kong 2001). Somit kann es in kürzerer Zeit zu einer stärkeren Wirkung bei der Kombination der Substanzen kommen. Es lässt sich also ein Apoptoseverstärkender und beschleunigender Effekt für beide Zelllinien erkennen. Auch nach diesen Versuchen lässt sich somit ein Vorteil in der Behandlung mit der Kombination von Tamoxifen mit dem GnRH-II-Antagonisten, verglichen mit der einzelnen Anwendung von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten, *in vitro* feststellen.

Fister et al. (2009) stellten in ihrer Studie dar, dass es bei den von ihnen untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien sowohl durch p38 als auch durch JNK zu Apoptose der Zellen kam. In dieser Arbeit wurden die Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3 und EFO-27 bezüglich ihres Apoptoseverhaltens untersucht. In diesen Zelllinien trägt eher die Phosphorylierung von JNK zur Apoptose bei.

4.3.2 Wirkung der Substanzen auf die Spaltung von Caspase-3

Fister et al. beschrieben 2009 eine vermehrte Spaltung der Caspase-3 bei Zelllinien des Endometrium, Mamma- und Ovarialkarzinoms nach Behandlung mit GnRH-II-Antagonisten. Für die Zelllinien EFO-27 und SKOV-3 sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob Apoptose auch durch die Spaltung von Caspase-3 stattfinden könnte. Es wurden dazu Western-Blots für drei unterschiedliche Passagen der Zelllinien angefertigt. Bei den untersuchten Zelllinien SKOV-3 und EFO-27 ließ sich jeweils nur für eine Passage

eine Spaltung der Caspase-3 darstellen, und diese konnte somit lediglich qualitativ beurteilt werden.

Bei der Zelllinie SKOV-3 zeigte sich eine vermehrte Spaltung der Caspase-3 bei Inkubation mit der Kombination von Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten. Auch bei Behandlung mit dem GnRH-II-Antagonisten scheint die Caspase-3 stärker gespalten zu werden, als bei der Kontrolle und nach der Behandlung mit Tamoxifen allein.

Bei der Zelllinie EFO-27 scheint dem einen Versuch nach eine stärkere Spaltung der Caspase-3 nach Behandlung mit Tamoxifen und dem GnRH-II-Antagonisten, jeweils einzeln angewandt, zu erfolgen. Dennoch lässt sich feststellen, dass sowohl bei den einzelnen Substanzen als auch bei der Behandlung mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist eine Spaltung erfolgt.

4.4 *Der prognostische Wert der Rezeptoren für das Ovarialkarzinom*

In dieser Arbeit wurde bereits mehrfach deutlich, dass die genetische Veränderung der Zelllinien und deren Rezeptorausstattung eine beträchtliche Rolle bezüglich des Ansprechens der unterschiedlichen Zelllinien auf eine Therapie mit den angewandten Substanzen Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist spielen. In der Literatur werden die Rezeptoren des Ovarialkarzinoms häufig als Prognosefaktoren beschrieben (Hecht et al. 2009). Die Reaktion der Rezeptoren auf eine Behandlung mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist könnte somit ebenfalls eine prognostische Relevanz haben.

Dieser Abschnitt soll das Expressionsverhalten der für das Ovarialkarzinom wichtigen Rezeptoren (ER- α , ER- β , GPR-30 und GnRH-II-Rezeptor), in Verbindung gebracht mit heute bekannten Thesen zur Langzeitprognose des Ovarialkarzinoms, behandeln.

4.4.1 *Die ER- α -und ER- β -Expression als mögliche Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms*

Kolkova et al. (2012) berichteten, dass in bösartigen Ovarialtumoren, verglichen mit gutartigen Tumoren, die Expression des ER- α höher ist als die des ER- β . Die Tumorpheriferation wird hier durch Bindung von Estrogenen an den ER- α weiter gesteigert.

Zusätzlich wird die apoptotische Aktivität durch die Akt-gesteuerte Heraufregulation vom antiapoptotischem bcl-2 gesenkt.

Pujol et al. (1998) zeigten ebenfalls, dass im Gewebe von Ovarialkarzinomen ein Anstieg von ER- α -mRNA verglichen mit ER- β -mRNA zu beobachten ist. Rutherford et al. (2000) stellten in ihrer Studie dar, dass in Ovarialkarzinom-Gewebe deutlich niedrigere ER- β -Expressionslevel als in gesundem Gewebe nachgewiesen werden. Eine vermehrte ER- α -Rezeptorexpression war hingegen vor allem in malignem Gewebe und in metastasierenden Tumoren zu finden.

Park et al. (2008) stimmten in ihrer Studie mit dieser Erkenntnis überein. Sie stellten dar, dass der ER- α - und darüber ausgelöste proliferative Prozesse bei der Metastasierung von Ovarialkarzinomen eine entscheidende Rolle spielen.

Eine Studie von Chan et al. (2008) zeigt, dass in frühen Stadien des Ovarialkarzinoms die Messung der ER- β -Level dafür genutzt werden könnte, zu entscheiden, ob eine adjuvante Chemotherapie sinnvoll ist. Auch diese Studie zeigte, dass die Expression des ER- β ein Prognosefaktor für längeres krankheitsfreies Überleben beim Ovarialkarzinom ist.

O'Donnel et al. (2005) stellten in ihrer Studie dar, dass die Proliferation der Ovarialkarzinomzellen durch die Estrogenstimulation des ER- α und nicht durch die Stimulation des ER- β erfolgt, wodurch die zuvor genannten Beobachtungen unterstützt werden.

Das Vorhandensein von ER- α in Ovarialkarzinomen scheint mit einer schlechteren Prognose einherzugehen, während eine vermehrte Expression des ER- β für eine günstigere Prognose spricht. In der Zelllinie SKOV-3 ließ sich die Expression des ER- α via PCR nachweisen. Anhand dieser Zelllinie lässt sich verdeutlichen, dass gerade das Vorhandensein des Rezeptors auch Vorteile bringen könnte, wenn man ihn als Ansatzpunkt der Therapie betrachtet. Da dies bisher durch die alleinige Anwendung von Tamoxifen keinen Erfolg brachte, könnte die Kombination mit dem GnRH-II-Antagonisten eine Prognoseverbesserung bedeuten. In den Versuchen wurde deutlich, dass die Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist zu einer stärkeren ER- α -Expression führt als die Behandlung der Zellen mit Tamoxifen allein.

Die Expression des ER- β wurde bei der Zelllinie EFO-27 sowohl durch die Behandlung mit Tamoxifen als auch durch die Behandlung mit dem GnRH-II-Antagonisten signifikant vermindert. Die Kombination der Substanzen bewirkte als einzige Behandlung keine signifikante Verminderung des ER- β , was prognostisch gesehen von Vorteil sein könnte. Bei den anderen Zelllinien zeigten sich Tendenzen zur vermehrten Expression des Rezeptors, sowohl bei der Inkubation mit den einzelnen Substanzen, vor allem aber bei der Behandlung mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist. Dies könnte ebenfalls zu einer verbesserten Prognose beitragen.

4.4.2 Die GPR-30-Expression als möglicher Prognosefaktor des Ovarialkarzinoms

In malignen Tumoren wurden, verglichen mit gesundem Gewebe, von mehreren Arbeitsgruppen erhöhte Expressionsraten des GPR-30 festgestellt. Eine Überexpression des GPR-30 deutete auf eine schlechtere Prognose hin und war mit niedrigeren Überlebensraten assoziiert (Long et al. 2012; Smith et al. 2010).

Smith et al. (2010) zeigten, dass die GPR-30-Expression invers mit der ER- und PR- und positiv mit der EGF-Rezeptor-Expression korreliert. Es wurde daraufhin vermutet, dass GPR-30 vor allem in high grade Ovarialkarzinomen, welche öfter ER-negativ sind, exprimiert wird.

Die Kombination von GnRH-II-Antagonist und Tamoxifen zeigte in dieser Arbeit im Gegensatz zur alleinigen Behandlung mit Tamoxifen bei den Zelllinien EFO-21, OVCAR-3 und EFO-27 einen weniger starken Anstieg der Expression des GPR-30. Möglicherweise unterdrückt die Kombinationsbehandlung mit den beiden Substanzen die proliferierende Funktion des GPR-30 und bewirkt eine günstigere Langzeitprognose.

4.4.3 Die GnRH-II-Rezeptorexpression als möglicher Prognosefaktor des Ovarialkarzinoms

GnRH-II-Analoga haben einen antiproliferativen Effekt auf Zellen des Ovarialkarzinoms (Gründker et al. 2002). GnRH-II-Antagonisten haben damit verglichen sogar eine noch stärkere antiproliferative Wirkung auf Zellen des Ovarialkarzinoms und wirken dabei über den GnRH-II-Rezeptor, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Induktion zusätzlich auch über den GnRH-I-Rezeptor ausgelöst wird (Fister et al. 2007; Fister et al. 2009). Eine vermehrte Expression des GnRH-II-Rezeptors stellt also einen antiproliferativen bzw. apoptosefördernden Therapieansatzpunkt dar und kann somit als positiver Prognosefaktor gedeutet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei den Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3 und EFO-21 eine vermehrte GnRH-II-Rezeptorexpression bei der Behandlung mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist beobachtet. Bei der Zelllinie EFO-27 stellte sich eine signifikant verminderte Rezeptorexpression des GnRH-II-Rezeptors dar, die sowohl nach Behandlung mit den Substanzen Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist allein als auch bei der Kombination beider Substanzen beobachtet wurde. Dieser Effekt scheint jedoch durch die Wirkung am GnRH-I-Rezeptor kompensiert zu werden. Es konnte bei dieser Zelllinie auch eine verminderte Expression des GPR-30-Rezeptors dargestellt werden. Eine Verminderung der GnRH-II-Rezeptorexpression scheint somit keinen massiven prognostischen Nachteil zu

erbringen. Die Expression des GnRH-I- und des GnRH-II-Rezeptors können vermutlich eher zusammen betrachtet als positive Prognosefaktoren und Therapieansatzpunkte gesehen werden.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist auch in prognostischer Hinsicht Vorteile bei der Therapie von Ovarialkarzinomen bringen könnte, da sie neue Therapieansatzpunkte bereitstellt.

4.5 Fazit

Es lässt sich feststellen, dass drei von vier Zelllinien eine stärkere Proliferationsminderung als Reaktion auf die Kombinationsbehandlung mit den Substanzen Tamoxifen bzw. Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist als bei Behandlung mit den einzelnen Substanzen zeigten. Die untersuchten Zelllinien reagierten zudem mit einer stärkeren Phosphorylierung von JNK als Zeichen von verstärkter Apoptose bei Behandlung der Zellen mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist als bei Behandlung mit der jeweiligen Monotherapie. Auch auf Rezeptorebene ließen sich Vorteile der Kombinationstherapie verglichen mit der Monotherapie von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist darstellen. Dies lässt die allgemein bekannten Daten zur endokrinen Therapie bei Ovarialkarzinomen, die ähnlich einem „Ganz oder gar nicht“ - Prinzip zu sehen ist, in einer anderen Sichtweise erscheinen, da sich bei allen untersuchten Zelllinien zumindest auf einer Ebene ein effektiver Angriffspunkt bei der Kombinationstherapie von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist vermuten lässt. Die Kombinationstherapie erschien in allen Versuchen effektiver als eine alleinige Therapie mit Tamoxifen. Harries et al. (2011) beschrieben die Wirkung von Tamoxifen als niedrig, aber dennoch signifikant. Diese als niedrig eingestufte Wirkweise kann nach den durchgeführten Versuchen durch eine Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist gesteigert werden. Nach diesen ersten Versuchen einer Kombinationstherapie lässt sich dennoch vermuten, dass ein endokriner Therapieansatz allein noch immer keinen so großen Therapieerfolg verspricht, wie dies bei der Anwendung von Tamoxifen beim Mammakarzinom der Fall ist. Dennoch versprechen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass beim Ovarialkarzinom die Kombinationstherapie von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist zusammen mit einer Chemotherapie, beispielsweise mit Cisplatin, einen größeren Erfolg erbringen könnte als Tamoxifen allein. GnRH-II-Antagonisten können somit einen wirkungsverbessernden Kombinationspartner bei der endokrinen Therapie von Ovarialkarzinomen darstellen.

5 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom stellt als fünfthäufigste krebsassoziierte Todesursache der Frau einen der tödlichsten gynäkologischen Tumoren weltweit dar. Trotz moderner Behandlungsansätze ist die Prognose aufgrund geringer Frühsymptome und später Diagnosestellung noch immer sehr schlecht, so dass das Ovarialkarzinom die schlechteste Überlebensrate unter den gynäkologischen Tumoren aufweist. In den letzten Jahren wurde zwar eine Verbesserung bezüglich der Überlebensrate, jedoch keine deutliche Verbesserung der Heilungsrate erzielt (Engel et al. 2002). Die endokrine Therapie des Ovarialkarzinoms stellt somit weiterhin einen möglichen Kombinationspartner bei der Verbesserung der medikamentösen Therapie des Ovarialkarzinoms dar.

Während der letzten Jahre stellten GnRH-II-Antagonisten einen Interessenschwerpunkt bei der endokrinen Therapie gynäkologischer Tumoren, jedoch auch anderer Tumorarten wie des Prostatakarzinoms dar (Fister et al. 2009; Park et al. 2014).

2009 konnte durch Fister et al. dargestellt werden, dass GnRH-II-Antagonisten schon in nanomolaren Konzentrationen *in vitro* und *in vivo* zu Apoptose von Mamma-, Endometriums- und auch Ovarialkarzinomzellen führen. Auch Park et al. beschreiben in ihrer Studie eine Auslösung von Apoptose durch GnRH-II-Antagonisten in Prostatakarzinomzellen (Park et al. 2014).

Da wenige Patientinnen mit Ovarialkarzinomen auch auf eine Behandlung mit Tamoxifen ansprechen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob eine Wirkungssteigerung durch die Kombination des GnRH-II-Antagonisten mit Tamoxifen erzielt werden kann.

Das Proliferationsverhalten der Ovarialkarzinomzelllinien bei Inkubation mit den Substanzen Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist bzw. Fulvestrant und GnRH-II-Antagonist ergab für die Zelllinie OVCAR-3 eine signifikante antiproliferative Wirkung und auch bei der Zelllinie SKOV-3 wurde eine stärkere Tendenz zur verminderten Proliferation, verglichen mit der einzelnen Anwendung von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist, beobachtet. Bei der Zelllinie EFO-27 fiel die Wirkung der Kombinationstherapie ähnlich aus wie eine einzelne Behandlung mit Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist, bewirkte aber auch eine stärkere antiproliferative Tendenz. Die Zelllinie EFO-21 reagierte kaum auf die Behandlung mit der Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist. Bei Inkubation mit Fulvestrant kombiniert mit dem GnRH-II-Antagonisten fielen die Ergebnisse ähnlich aus.

Anhand der Versuchsergebnisse wurde deutlich, dass die endokrine Therapie mit Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist an unterschiedlichen Signalkaskaden der Zellen eingreift und somit auf unterschiedlichen Ebenen antiproliferativ wirkt. Es stellte sich heraus, dass sowohl auf Proliferationsebene als auch auf Rezeptorbasis eine Kombinationstherapie von Tamoxifen

und GnRH-II-Antagonist einer Monotherapie mit Tamoxifen überlegen war. Auch auf proteinbiochemischer Ebene erwies sich die Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist als wirkungsvoller. In den untersuchten Zelllinien SKOV-3 und EFO-27 fand eine Apoptoseinduktion vor allem durch den Weg der Phosphorylierung von JNK statt. Der Anstieg von pJNK im Verhältnis zu JNK erfolgte in kürzerer Zeit und fiel zudem intensiver aus als bei einzelner Anwendung der Substanzen Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist.

Die Zelllinien reagierten zwar teilweise unterschiedlich auf die Kombination von Tamoxifen und GnRH-II-Antagonist, dennoch zeigte sich im Gesamtbild eine Verbesserung bezüglich des antiproliferativen Verhaltens bei Kombination der Substanzen. Es wurde deutlich, dass der GnRH-II-Antagonist kombiniert mit Tamoxifen eine neue Kombinationseinheit bei der Therapie von Ovarialkarzinomen bilden könnte.

6 Literaturverzeichnis

- Ahmed SA, Gogal RM, Walsh JE (1994): A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 170, 211-224
- Al Rawahi T, Lopes AD, Bristow RE, Bryant A, Elattar A, Chattopadhyay S, Galaal K (2013): Surgical cytoreduction for recurrent epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 28 (Epub ahead)
- Arnal JF, Gourdy P, Lenfant F (2013): In vivo dissection of the estrogen receptor alpha: Uncoupling of its physiological effects and medical perspectives. *Ann Endocrinol (Paris)* 74, 82-89
- Ball LJ, Levy N, Zhao X, Griffin C, Tagliaferri M, Cohen I, Ricke WA, Speed TP, Firestone GL, Leitman DC (2008): Cell type- and estrogen receptor-subtype specific regulation of selective estrogen receptor modulator regulatory elements. *Mol Cell Endocrinol* 299, 204-211
- Bilimoria MM, Assikis VJ, Muenzner HD, Wolf DM, Satyaswaroop PG, Jordan VC (1996): An analysis of tamoxifen-stimulated human carcinomas for mutations in the AF-2 region of the estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58, 479-488
- Block M: Mechanismen der Durchbrechung der sekundären Antiöstrogenresistenz durch GnRH-Analoga in Mammakarzinomzellen. *Rer. Nat. Diss. Göttingen* 2009
- Bossard C, Busson M, Vindrieux D, Gaudin F, Machelon V, Brigitte M, Jacquard C, Pillon A, Balaguer P, Balabanian K, Lazennec G (2012): Potential Role of Estrogen Receptor Beta as a Tumor Suppressor of Epithelial Ovarian Cancer. *PLoS One.* 2012, 7, e44787
- Brandt S, Heller H, Schuster KD, Grote J (2004): Tamoxifen induces suppression of cell viability and apoptosis in the human hepatoblastoma cell line HepG2 via down-regulation of telomerase activity. *Liver int* 1, 46-54

- Brasseur K, Leblanc V, Fabi F, Parent S, Descôteaux C, Bérubé G, Asselin E (2013): ER α -Targeted Therapy in Ovarian Cancer Cells by a Novel Estradiol-Platinum(II) Hybrid. *Endocrinol* 154, 2281–2295
- Carlson RW (2005): The history and mechanism of activation of fulvestrant. *Clin Breast Cancer* 1, 5-8
- Chambers SK, Martinez JD (2012): The significance of p53 isoform expression in serous ovarian cancer. *Future Oncol* 8, 683-686
- Chan KK, Wie N, Liu SS, Xiao-Yun L, Cheung AN, Ngan HY (2008): Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation. *Obstet Gynecol* 111, 144-151
- Chen CL, Cheung LW, Lau MT, Choi JH, Auersperg N, Wang HS, Wong AS, Leung PC (2007): Differential role of gonadotropin-releasing hormone on human ovarian epithelial cancer cell invasion. *Endocrine* 31, 311-20
- Cheng CK, Leung PCK (2005): Molecular Biology of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their Receptors in Humans. *Endocr Rev* 26, 283-306
- Choi JH, Wong AST, Huang HF, Leung PCK (2007): Gonadotropins and Ovarian Cancer. *Endocr Rev* 28, 440-461
- Choi JH, Lee KT, Leung PCK (2011): Estrogen Receptor alpha pathway is involved in leptin-induced ovarian cancer cell growth. *Carcinogenesis* 32, 589-596
- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159
- Coffey ET, Smiciene G, Hongisto V, Cao J, Brecht S, Herdegen T, Courtney MJ (2002): c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) 2/3 is specifically activated by stress, mediating c-Jun activation, in the presence of constitutive JNK1 activity in cerebellar neurons. *J Neurosci* 22, 4335-4345
- Colombo N, Peiretti M, Parma G, Lapresa M, Mancari R, Carinelli S, Sessa C, Castiglione M (2010): Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow up. *Ann Oncol* 21, 23-30

Daniilidis A, Karagiannis V (2007): Epithelial ovarian cancer. Risk factors, screening and the role of prophylactic oophorectomy. *Hippokratia*, 11, 63–66

Darby S, Stockley J, Khan MM, Robson CN, Leung HY, Gnanapragasam VJ (2007): Expression of GnRH type II is regulated by the androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 14, 613-624

Dorssers LC, Van der Flier S, Brinkmann A, van Agthoven T, Veldscholte J, Berns EM, Klijn JG, Beex LV, Foekens JA (2001): Tamoxifen resistance in breast cancer: elucidating mechanisms. *Drugs* 61, 1721-1733

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000): Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.

Eicke N, Günthert AR, Viereck V, Siebold D, Béhé M, Becker T, Emons G, Gründker C (2005): GnRH-II receptor-like antigenicity in human placenta and cancers of the human reproductive organs. *Eur J Endocrinol* 153, 605-612

Eicke N., Günthert AR, Emons G, Gründker C (2006): GnRH-II agonist [D-Lys⁶]GnRH-II inhibits the EGF-induced mitogenic signal transduction in human endometrial and ovarian cancer cells. *Int J Oncol* 29, 1223-1229

Engel J, Eckel R, Schubert-Fritschle G, Kerr J, Kuhn W, Diebold J, Kimmig R, Rehbock J, Hölzel D (2002): Moderate progress for ovarian cancer in the last 20 years: prolongation of survival, but no improvement in the cure rate. *Eur J Cancer* 38, 2435-45

Ercoli A, Scambia G, De Vincenzo R, Alimonti A, Petrucci F, Fattorossi A, Isola G, Benedetti Panici P, Caroli S, Mancuso S (1999): Tamoxifen synergizes the antiproliferative effect of cisplatin in human ovarian cancer cells: enhancement of DNA platination as a possible mechanism. *Cancer Lett* 12, 108, 7-14

Fathalla MF (1971): Incessant ovulation-a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971, 163

Ferlini C, Scambia G, Marone M, Distefano M, Gaggini C, Ferrandina G, Fattorossi A, Isola G, Benedetti Panici P, Mancuso S (1999): Tamoxifen induces oxidative stress and apoptosis in oestrogen receptor-negative human cancer cell lines. *Br J Cancer* 79, 257–263

- Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR (2000): Estrogen-Induced Activation of Erk-1 and Erk-2 Requires the G Protein-Coupled Receptor Homolog, GPR30, and Occurs via Trans Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor through Release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 14, 1649-1660
- Fister S: Induktion von Apoptose in gynäkologischen Karzinomen in vitro und in vivo durch Antagonisten des Gonadotropin-Releasing Hormons Typ II. *Rer. nat. Diss. Göttingen* 2007
- Fister S, Günthert AR, Emons G, Gründker C (2007): Gonadotropin-Releasing Hormone Type II Antagonists Induce Apoptotic Cell Death in Human Endometrial and Ovarian Cancer Cells In vitro and In vivo. *Cancer Res* 67, 1750-1756
- Fister S, Günthert AR, Aicher B, Paulini KW, Emons G, Gründker C (2009): GnRH-II Antagonists Induce Apoptosis in Human Endometrial, Ovarian, and Breast Cancer Cells via Activation of Stress-Induced MAPKs p38 and JNK and Proapoptotic Protein Bax. *Cancer Res* 69, 6473-6481
- Fujiwara S, Terai Y, Kawaguchi H, Takai M, Yoo S, Tanaka Y, Tanaka T, Tsunetoh S, Sasaki H, Kanemura M, Tanabe A, Yamashita Y, Ohmichi M (2012): GPR30 regulates the EGFR-Akt cascade and predicts lower survival in patients with ovarian cancer. *J Ovarian Res* 5, 35
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P (1986): Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134-139.
- Gründker C, Günthert AR, Millar RP, Emons G (2002): Expression of gonadotropin-releasing hormone II (GnRH-II) receptor in human endometrial and ovarian cancer cells and effects of GnRH-II on tumor cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1427-1430
- Gründker C, Schlotawa L, Viereck V, Eicke N, Horst A, Kairies B, Emons G (2004): Antiproliferative effects of the GnRH antagonist cetrorelix and of GnRH-II on human endometrial and ovarian cancer cells are not mediated through the GnRH type I receptor. *Eur J Endocrinol* 151, 141-149
- Günthert AR, Gründker C, Olota A, Läsche J, Eicke N, Emons G (2005): Analogs of GnRH-I and GnRH-II inhibit epidermal growth factor-induced signal transduction and resensitize resistant human breast cancer cells to 4OH-tamoxifen. *Eur J Endocrinol* 153, 613-625

- Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Dérijard B, Davis RJ (1996): Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *The EMBO J* 15, 2760-2770.
- Gynecologic Oncology (2014): FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. *Gynecol Oncol* 133, 401-404
- Halon A, Materna V, Drag-Zalesinska M, Nowak-Markwitz E, Gansukh T, Donizy P, Spaczynski M, Zabel M, Dietel M, Lage H, Surowiak P (2011) Estrogen receptor alpha expression in ovarian cancer predicts longer overall survival. *Pathol Oncol Res* 17, 511-518
- Harper MJ, Walpole AL (1967): A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of activation in rats. *J Reprod Fertil Suppl* 13, 101-119
- Harries M, Kaye SB (2001): Recent advances in the treatment of epithelial ovarian cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 10, 1715-1724
- Hecht JL, Kotsopoulos J, Hankinson SE, Tworoger SS (2009): Relationship between epidemiological risk and hormone receptor Expression in ovarian cancer: Results from the Nurses' health study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 1624-1630
- Hermann RM, Wolff HA, Jarry H, Thelen P, Gruendker C, Rave-Fraenk M, Schmidberger H, Christiansen H (2008): In vitro studies on the modification of low-dose hyper-radiosensitivity in prostate cancer cells by incubation with genistein and estradiol. *Radiat Oncol* 3, 19
- Ho SM (2003): Estrogen, Progesterone and Epithelial Ovarian Cancer. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 73
- Hong IS, Cheung AP, Leung PCK (2008): Gonadotropin- Releasing Hormones I and II induce Apoptosis in Human Granulosa Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 3179-3185
- Hong IS, Klausen C, Cheung AP, Leung PC (2012): Gonadotropin I-or -II interacts with IGF-I/Akt but not Connexin 43 in Human granulosa Cell Apoptosis. *J Clin Endocrinol Meatab* 97, 525-534

- Ishii Y, Papa L, Bahadur U, Yue Z, Aguirre-Ghiso J, Shioda T, Waxman S, Germain D (2011): Bortezomib Enhances the Efficacy of Fulvestrant by Amplifying the Aggregation of the Estrogen Receptor, Which Leads to a Proapoptotic Unfolded Protein Response. *Clin Cancer Res* 17, 2292-2300
- Issa RM, Lebeau A, Grob T, Holst F, Moch H, Terracciano L, Choschzick M, Sauter G, Simon R (2009): Estrogen Receptor Gene Amplification Occurs Rarely in Ovarian Cancer. *Mod Pathol* 22, 191-196
- Johnston SR, Martin LA, Head J, Smith I, Dowsett M (2005): Aromatase inhibitors: combinations with fulvestrant or signal transduction inhibitors as a strategy to overcome endocrine resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 95, 173-181
- Jordan VC (1988): The development of tamoxifen for breast cancer therapy: A tribute to the late Arthur L. Walpole. *Breast Cancer Res Treat* 11, 197-209
- Kaku T, Ogawa S, Kawano Y, Ohishi Y, Kobayashi H, Hirakawa T, Nakano H (2003): Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc* 36, 9-17
- Kallunki T, Su B, Tsigelny I, Sluss HK, Dérijard B, Moore G, Davis R, Karin M. (1994): JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev* 8, 2996-3007
- Kim A, Ueda Y, Naka T, Enomoto T (2012): Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 31, 14
- Kim KY, Choi KC, Park SH, Chou CS, Auersperg N, Leung PC (2004): Type II Gonadotropin-Releasing Hormone Stimulates p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Apoptosis in Ovarian Cancer Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 3020-3026
- Kim KY, Choi KC, Park SH, Auersperg N, Leung, PCK. (2005): Extracellular Signal- Regulated Protein Kinase, But Not c-Jun N- Terminal Kinase, Is Activated by Type II Gonadotropin-Releasing Hormone Involved in the Inhibition of Ovarian Cancer Cell Proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 1670–1677

Kolkova Z, Noskova V, Ehinger A, Hansson S, Casslén B (2010): G protein coupled estrogen receptor (GPER, GPR-30) in normal human endometrium and early pregnancy decidua. *Mol Hum Reprod* 16, 743-751

Kolkova Z, Casslén V, Henic E, Ahmadi S, Ehinger A, Jirstrom K, Casslén B (2012): The G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER/GPR30) does not predict survival in patients with ovarian cancer. *J Ovarian Res* 18, 9

Leitlinie Ovarialkarzinom 2007 siehe Leitlinienprogramm Onkologie 2007

Leitlinie Ovarialkarzinom 2013 siehe Leitlinienprogramm Onkologie 2013

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Leitlinienreport zur S2-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. Langversion 1.0, AWMF Registrierungsnummer: 032-035OL, Mai 2007

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Leitlinienreport zur S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. Langversion 1.0, AWMF Registrierungsnummer: 032-035OL, Juni 2013

Leung PC, Cheng CK, Zhu XM (2004): Multi-factorial role of GnRH-I and GnRH-II in the human ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 202, 145-153

Li LY, Luo X, Wang X (2001): Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99

Long L, Cao Y, Tang LD (2012): Transmembrane estrogen receptor GPR-30 is more frequently expressed in malignant than in benign ovarian endometriotic cysts and correlates with MMP-9 expression. *Int J Gynecol Cancer* 22, 539-545

Mabuchi S, Wakabayashi A, Kimura T: VEGF Targeting Agents in Ovarian Cancer, *Ovarian Cancer-Basic Science Perspective*, InTech, Osaka 2012

Makar AP (2000): Hormone therapy in epithelial ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer* 7, 85-93

- Mandlekar S, Kong AN (2001): Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis* 6, 469-477
- Matthews J, Gustafsson JA (2003): Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* 3, 281-292
- McClay EF, Albright KD, Jones JA, Christen RD, Howell SB (1994): Tamoxifen delays the development of resistance to cisplatin in human melanoma and ovarian cancer cell lines. *Br J Cancer* 70, 449-452
- McInerney EM, Katzenellenbogen BS (1996): Different Regions in Activation Function-1 of the Human Estrogen Receptor Required for Antiestrogen- and Estradiol-dependent Transcription Activation. *J Biol Chem* 271, 24172-24178
- Millar R, Lowe S, Conklin D, Pawson A, Maudsley S, Troskie B, Ott T, Millar M, Lincoln G, Sellar R, Faurholm B, Scobie G, Kuestner R, Terasawa E, Katz A (2001): A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9636-9641
- Millar RP (2003): GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends Endocrinol Metab* 14, 35-43
- Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo, H. (1984): Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in the chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc Natl Sci U.S.A.*, 81, 3874-3878
- Morgan RJ, Alvarez RD, Armstrong DK, Boston B, Burger RA, Chen LM, Copeland L, Crispens MA, Gershenson D, Gray HJ, Grigsby PW, Hakam A, Havrilesky LJ, Johnston C, Lele S, Matulonis UA, O'Malley DM, Penson RT, Remmenga SW, Sabbatini P, Schilder RJ, Schink JC, Teng N, Werner TL (2011): Epithelial Ovarian Cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 9, 82-113
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996): ER β : Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters* 392, 49-53

- Nowak-Markwitz E, Maciejczyk A, Pudełko M, Tserenchunt G, Balázs G, Spaczyński M, Zabel M, Dietel M, Lage H, Surowiak P (2010): Influence of tamoxifen on cisplatin-sensitivity and estrogen receptors expression in ovarian carcinoma cell lines. *Ginekol Pol* 81, 183-187
- Oberaigner W, Minicozzi P, Bielska-Lasota M, Allemani C, de Angelis R, Mangone L, Sant M, Eurocare Working Group (2012): Survival for ovarian cancer in Europe: the across-country variation did not shrink in the past decade. *Acta Oncol* 51, 441-453
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F (2000): Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267, 5421-5426
- O'Donnell AJ, Macleod KG, Burns DJ, Smyth JF, Langdon SP (2005): Estrogen receptor- α mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen. *Endocr Relat Cancer* 12, 851-866
- Oei AL, Massuger LF, Bulten J, Ligtenberg MJ, Hoogerbrugge N, de Hullu JA (2006): Surveillance of women at high risk for hereditary ovarian cancer is inefficient. *Br J Cancer* 94, 814-819
- Owman C, Blay P, Nilsson C, Lolait SJ (1996): Cloning of Human cDNA Encoding a Novel Heptahelix Receptor Expressed in Burkitt's Lymphoma and Widely Distributed in Brain and Peripheral Tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 228, 285-292
- Park SH, Cheung LW, Wong AS, Leung PC (2008): Estrogen regulates snail and slug in the downregulation of E-Cadherin and induces Metastatic potential of cancer cells through estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 22, 2085-2098
- Park S, Han JM, Cheon J, Hwang JI, Seong JY (2014): Apoptotic death of prostate cancer cells by a gonadotropin-releasing hormone-II antagonist. *PLoS One* 13;9(6): e99723
- Poon SL, Hammond GT, Leung PC (2009): Epidermal growth factor-induced GnRH-II synthesis contributes to ovarian cancer cell invasion. *Mol Endocrinol* 23, 1646-1656
- Prat J, Ribé A, Gallardo A (2005): Hereditary ovarian cancer. *Hum Pathol* 36, 861-870

- Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ (2008): Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol* 70, 165-190
- Pujol P, Rey JM, Nirde P, Roger P, Gastaldi M, Laffargue F, Rochefort H, Maudelonde T (1998): Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer Res* 58, 5367-5373
- Ring A, Dowsett M (2004): Mechanisms of tamoxifen resistance. *Enocr Relat Cancer* 11, 643-658
- Robertson JFR (2001): ICI 182, 780 (Fulvestrant™) -the first estrogen receptor down-regulator-current clinical data. *Br J Cancer* 85, 11-14
- Rubin, SC, Sabbatini P, Viswanathan AN (2011): Ovarian Cancer. *Cancer Network*
- Rutherford T, Brown, WD, Sapi E, Aschkenazi S, Muñoz A, Mor G (2000): Absence of estrogen receptor-beta expression in metastatic ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 96, 417-421
- Rzepka-Górska I, Chudecka-Glaz A, Kosmider M, Malecha J (2003): GnRH analogues as an adjuvant therapy for ovarian cancer patients. *Int J Gynecol Obstet* 81, 199-205
- Schwartz DR, Kardia SL, Shedden KA, Kuick R, Michailidis G, Taylor JM, Misek DE, Wu R, Zhai Y, Darrah DM, Reed H, Ellenson LH, Giordano TJ, Fearon ER, Hanash SM, Cho KR (2002): Gene Expression in Ovarian Cancer Reflects Both Morphology and Biological Behavior, Distinguishing Clear Cell from Other Poor-Prognosis Ovarian Carcinomas. *Cancer Res* 62, 4722-4729
- Simon WE, Albrecht M, Hansel M, Dietel M, Holzel F (1983): Cell lines derived from human ovarian carcinomas: growth stimulation by gonadotropic and steroid hormones. *J Natl Cancer Inst* 70, 839-845
- Smith HO, Arias-Pulido H, Qualls CR, Lee SJ, Kuo DY, Howard T, Verschraegen CF, Hathaway H, Joste NE, Prossnitz ER (2010): GPR-30 Predicts poor Survival for Ovarian Cancer. *Gynecol Oncol* 114, 465-471

- Smolle E, Taucher V, Pichler M, Petru E, Lax S, Haybaeck J (2013): Targeting signaling pathways in epithelial ovarian cancer. *Int J Mol Sci* 14, 9536–9555
- Sluss HK, Barrett T, Dérijard B, Davis RJ (1994): Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *J Mol Cell Biol* 14, 8376-84
- Stilley JA, Birt JA, Sharpe-Timms KL (2012): Cellular and molecular basis for endometriosis associated infertility. *Cell Tissue Res* 349, 849-862.
- Tan O, Bukulmez O (2011): Biochemistry, molecular biology and cell biology of gonadotropin-releasing hormone and antagonists. *Curr Opin Obstet Gynecol* 23, 238-244
- Tan O, Carr BR, Beshay VE, Bukulmez O (2013): The Extrapituitary Effects of GnRH Antagonists and Their Potential Clinical Implications: A Narrated Review. *Reprod Sci* 20, 16-25
- Ting AY, Kimler BF, Fabian CJ, Petroff BK (2008): Tamoxifen prevents premalignant changes of breast but not ovarian, cancer in rats at high risk for both diseases. *Cancer Prev Res (Phila)* 1, 546-553
- Tortolero-Luna G, Mitchell MF (1995): The epidemiology of ovarian cancer. *J Cell Biochem* 23, 200-207
- Tung KH, Wilkens LR, Wu AH, Mc Duffie K, Nomura AMY, Kolonel LN, Terada KY, Goodman MT (2005): Effect of Anovulation Factors on Pre- and Postmenopausal Ovarian Cancer Risk: Revisiting the Incessant Ovulation Hypothesis. *Am J Epidemiol* 161, 321-329
- Vitale SG, Marilli I, Lodato M, Tropea A, Cianci A (2013): The role of cytoreductive surgery in advanced-stage ovarian cancer: a systematic review. *Updates Surg* 65, 265-270
- Wardley AM (2002): Fulvestrant: a review of its development, pre-clinical and clinical data. *Int J Clin Pract* 56, 305-309
- Weng SC, Kashida Y, Kulp SK, Wang D, Brueggemeier RW, Shapiro CL, Chen CS (2008): Sensitizing estrogen receptor-negative breast cancer cells to tamoxifen with OSU-03012, a novel celecoxib-derived phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling inhibitor. *Mol Cancer Ther* 7, 800-808

White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD (1998): Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 305-309

Wu HM, Wang HS, Huang HY, Soong YK, MacCalman CD, Leung PC (2009): GnRH signaling in intrauterine tissues. *Reproduction* 137, 769-777

Yap OWS, Bhat G, Liu L, Tollefsbol TO (2009): Epigenetic Modifications of the Estrogen Receptor β Gene in Epithelial Ovarian Cancer Cells. *Anticancer Res* 29, 139-144

Zanon CM., Clara RMD, Chiappino IMD, Bortolini MMD, Cornaglia SMD, Simone PMD, Bruno FMD, De Riu L, Airoidi MMD, Pedani FMD (2004): Cytoreductive Surgery and Intraperitoneal Chemohyperthermia for Recurrent Peritoneal Carcinomatosis from Ovarian Cancer. *World J Surg* 28, 1040-1045

Zhang GJ, Kimijima I, Onda M, Kanno M, Sato H, Watanabe T, Tsuchiya A, Abe R, Takenoshita S (1999): Tamoxifen-induced Apoptosis in Breast Cancer Cells Relates to Down-Regulation of bcl-2, but not bax and bcl-XL, without Alteration of p53 Protein Levels, *Clin Cancer Res* 5, 2971–2977

Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA (2010): Estrogen Signaling via Estrogen Receptor β . *J Biol Chem* 285, 39575–39579

Zhou R, Treeck O, Horn F, Ortmann O (2005): Effects of prolonged tamoxifen treatment on receptor expression and apoptosis of ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 96, 678-683

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999): An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549-11556

Zwart W, de Leeuw R, Rondaij M, Neefjes J, Mancini MA, Michalides R (2010): The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *J Cell Sci* 123, 1253-1261

7 Anhang

7.1 *Abbildungsverzeichnis*

ABB. 2.1: DARSTELLUNG DER DURCH GNRH-II-ANTAGONISTEN AUSGELÖSTEN APOPTOSESIGNALWEGE.	13
ABB. 3.1: EINFLUSS DER BEHANDLUNG MIT TAMOXIFEN UND DEM GNRH-II-ANTAGONISTEN ALLEIN UND IN KOMBINATION AUF DIE PROLIFERATION DER ZELLINIE OVCAR-3 (IN UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN)	34
ABB. 3.2: EINFLUSS DER BEHANDLUNG MIT TAMOXIFEN UND DEM GNRH-II-ANTAGONISTEN ALLEIN UND IN KOMBINATION AUF DIE PROLIFERATION DER ZELLINIE SKOV-3 (IN UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN)	36
ABB. 3.3: EINFLUSS DER BEHANDLUNG MIT TAMOXIFEN UND DEM GNRH-II-ANTAGONISTEN ALLEIN UND IN KOMBINATION AUF DIE PROLIFERATION DER ZELLINIE EFO-21 (IN UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN)	38
ABB. 3.4: EINFLUSS DER BEHANDLUNG MIT TAMOXIFEN UND DEM GNRH-II-ANTAGONISTEN ALLEIN UND IN KOMBINATION AUF DIE PROLIFERATION DER ZELLINIE EFO-21 (IN UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN) UND UNTER MEHRMALIGER ZUGABE DES GNRH-II-ANTAGONISTEN	38
ABB. 3.5: EINFLUSS DER BEHANDLUNG MIT TAMOXIFEN UND DEM GNRH-II-ANTAGONISTEN ALLEIN UND IN KOMBINATION AUF DIE PROLIFERATION DER ZELLINIE EFO-27 (IN UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN)	39
ABB. 3.6: ZELLZAHL (% DER KONTROLLE) DER ZELLINIEN OVCAR-3, SKOV-3, EFO-21 UND EFO-27 BEHANDELT MIT DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST IN JEWEILS HÖCHSTER KONZENTRATION VON 1×10^{-6} M TAM UND 1×10^{-5} M GNRH-II-ANT.	40
ABB. 3.7: EINFLUSS DER BEHANDLUNG MIT FULVESTRANT UND DEM GNRH-II-ANTAGONISTEN ALLEIN UND IN KOMBINATION AUF DIE PROLIFERATION DER ZELLINIE OVCAR-3 (IN UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN)	42
ABB. 3.8: EINFLUSS DER BEHANDLUNG MIT FULVESTRANT UND DEM GNRH-II-ANTAGONISTEN ALLEIN UND IN KOMBINATION AUF DIE PROLIFERATION DER ZELLINIE SKOV-3 (IN UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN)	43
ABB. 3.9: EINFLUSS DER BEHANDLUNG MIT FULVESTRANT UND DEM GNRH-II-ANTAGONISTEN ALLEIN UND IN KOMBINATION AUF DIE PROLIFERATION DER ZELLINIE EFO-21 (IN UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN)	45
ABB. 3.10: EINFLUSS DER BEHANDLUNG MIT FULVESTRANT UND DEM GNRH-II-ANTAGONISTEN ALLEIN UND IN KOMBINATION AUF DIE PROLIFERATION DER ZELLINIE EFO-27 (IN UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN)	46

- ABB. 3.11: ZELLZAHL (% DER KONTROLLE) DER ZELLINIEN OVCAR-3, SKOV-3, EFO-21 UND EFO-27, BEHANDELT MIT DER KOMBINATION VON FULVESTRANT UND GNRH-II-ANTAGONIST IN JEWEILS HÖCHSTER KONZENTRATION VON 1×10^{-7} M FULV. UND 1×10^{-5} M GNRH-II-ANT. 47
- ABB. 3.12: ER-A-EXPRESSION IN DEN UNTERSUCHTEN OVARIALKARZINOMZELLINIEN. 48
- ABB. 3.13 A: SEMIQUANTITATIVER NACHWEIS DER ER-A-EXPRESSION DER OVARIALKARZINOMZELLINIE SKOV-3 NACH BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT DEN EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 1 H, 2 H UND 4 H. B: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 4 H AUF DAS ER-A-EXPRESSIONSVERHALTEN DER OVARIALKARZINOMZELLINIE SKOV-3 49
- ABB. 3.14: NACHWEIS DER ER-A-EXPRESSION DER ZELLINIE EFO-27. ES ERFOLGTE LEDIGLICH EIN QUALITATIVER NACHWEIS. 50
- ABB. 3.15 A: SEMIQUANTITATIVER NACHWEIS DER ER-B-EXPRESSION DER OVARIALKARZINOMZELLINIE SKOV-3 NACH BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT DEN EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 1 H, 2 H UND 4 H. B: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 4 H AUF DAS ER-B-EXPRESSIONSVERHALTEN DER OVARIALKARZINOMZELLINIE SKOV-3: 51
- ABB. 3.16 A: SEMIQUANTITATIVER NACHWEIS DER ER-B-EXPRESSION DER OVARIALKARZINOMZELLINIE EFO-27 NACH BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT DEN EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 1 H, 2 H UND 4 H. B: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 4 H AUF DAS ER-B-EXPRESSIONSVERHALTEN DER OVARIALKARZINOMZELLINIE EFO-27 52
- ABB. 3.17 A: SEMIQUANTITATIVER NACHWEIS DER GPR-30-EXPRESSION DER OVARIALKARZINOMZELLINIE SKOV-3 NACH BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT DEN EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 1 H, 2 H UND 4 H. B: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 4 H AUF DAS GPR-30-EXPRESSIONSVERHALTEN DER OVARIALKARZINOMZELLINIE SKOV-3. 54
- ABB. 3.18 A: SEMIQUANTITATIVER NACHWEIS DER GPR-30-EXPRESSION DER OVARIALKARZINOMZELLINIE EFO-27 NACH BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT DEN EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 1 H, 2 H UND 4 H. B: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 2 H AUF DAS GPR-30-EXPRESSIONSVERHALTEN DER OVARIALKARZINOMZELLINIE EFO-27 55
- ABB. 3.19 A: SEMIQUANTITATIVER NACHWEIS DER GNRH-II-EXPRESSION DER OVARIALKARZINOMZELLINIE SKOV-3 NACH BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT DEN EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 1 H, 2 H UND 4 H. B:

- EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 1 H AUF DAS GNRH-II-REZEPTOR-EXPRESSIONSVERHALTEN DER OVARIALKARZINOMZELLINIE SKOV-3. 56
- ABB. 3.20 A: SEMIQUANTITATIVER NACHWEIS DER GNRH-II-EXPRESSION DER OVARIALKARZINOMZELLINIE EFO-27 NACH BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT DEN EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 1 H, 2 H UND 4 H. B: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 4 H AUF DAS GNRH-II-REZEPTOR-EXPRESSIONSVERHALTEN DER OVARIALKARZINOMZELLINIE EFO-27. 58
- ABB. 3.21: A: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 2 H AUF DAS ER-B-EXPRESSIONSVERHALTEN DER OVARIALKARZINOMZELLINIE OVCAR-3. B: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 4 H AUF DAS GPR-30-EXPRESSIONSVERHALTEN DER OVARIALKARZINOMZELLINIE OVCAR-3. C: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 4 H AUF DAS GNRH-II-REZEPTOR-EXPRESSIONSVERHALTEN DER OVARIALKARZINOMZELLINIE OVCAR-3. 59
- ABB. 3.22: A: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 1 H AUF DAS ER-B-EXPRESSIONSVERHALTEN DER OVARIALKARZINOMZELLINIE EFO-21. B: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 4 H AUF DAS GPR-30-EXPRESSIONSVERHALTEN DER OVARIALKARZINOMZELLINIE EFO-21. C: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 4 H AUF DAS GNRH-II-REZEPTOR-EXPRESSIONSVERHALTEN DER OVARIALKARZINOMZELLINIE EFO-21. 61
- ABB. 3.23: NACHWEIS DER PHOSPHORYLIERUNG DES P38-PROTEINS VON SKOV-3-ZELLEN BEI BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT DEN EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 5 MIN, 10 MIN UND 20 MIN. 63
- ABB. 3.24: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 10 MIN AUF DAS VERHÄLTNIS DER APOPTOSEPROTEINE PP38/P38 DER OVARIALKARZINOMZELLINIE SKOV-3. 64
- ABB. 3.25: NACHWEIS DER PHOSPHORYLIERUNG DES P38-PROTEINS VON EFO-27-ZELLEN BEI BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT DEN EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 5 MIN, 10 MIN UND 20 MIN. 65
- ABB. 3.26: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 10 MIN AUF DAS VERHÄLTNIS DER APOPTOSEPROTEINE PP38/P38 DER OVARIALKARZINOMZELLINIE EFO-27. 65

ABB. 3.27: NACHWEIS DER PHOSPHORYLIERUNG DES JNK-PROTEINS VON SKOV-3-ZELLEN BEI BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT DEN EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH - II -ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 5 MIN, 10 MIN UND 20 MIN.	66
ABB. 3.28: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 10 MIN AUF DAS VERHÄLTNIS DER APOPTOSEPROTEINE PJNK-3/JNK-3 DER OVARIALKARZINOMZELLINIE SKOV-3.	67
ABB. 3.29: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 20 MIN AUF DAS VERHÄLTNIS DER APOPTOSEPROTEINE PJNK-3/JNK-3 DER OVARIALKARZINOMZELLINIE SKOV-3.	67
ABB. 3.30: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 10 MIN AUF DAS VERHÄLTNIS DER APOPTOSEPROTEINE PJNK-1/JNK-1 DER OVARIALKARZINOMZELLINIE SKOV-3.	68
ABB. 3.31: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAM UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 20 MIN AUF DAS VERHÄLTNIS DER APOPTOSEPROTEINE PJNK-1/JNK-1 DER OVARIALKARZINOMZELLINIE SKOV-3 .	69
ABB. 3.32: NACHWEIS DER PHOSPHORYLIERUNG DES JNK-PROTEINS VON EFO-27-ZELLEN BEI BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT DEN EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 5 MIN, 10 MIN UND 20 MIN.	70
ABB. 3.33: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 5 MIN AUF DAS VERHÄLTNIS DER APOPTOSEPROTEINE PJNK-1/JNK-1 DER OVARIALKARZINOMZELLINIE EFO-27.	70
ABB. 3.34: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 20 MIN AUF DAS VERHÄLTNIS DER APOPTOSEPROTEINE PJNK-1/JNK-1 DER OVARIALKARZINOMZELLINIE EFO-27.	71
ABB. 3.35: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 3 UND 7 D AUF DIE SPALTUNG VON CASPASE-3 DER OVARIALKARZINOMZELLINIE SKOV-3.	72
ABB. 3.36: EFFEKTE DER EINZELNEN SUBSTANZEN SOWIE DER KOMBINATION VON TAMOXIFEN UND GNRH-II-ANTAGONIST NACH EINER INKUBATIONSDAUER VON 3 UND 7 D AUF DIE SPALTUNG VON CASPASE-3 DER OVARIALKARZINOMZELLINIE EFO-27.	72

7.2 Tabellenverzeichnis

TAB. 2.1: EINTEILUNG DES OVARIALKARZINOMS IN FIGO- UND TNM-STADIEN NACH: FIGO STAGING FOR OVARIAN, FALLOPIAN TUBE AND PERITONEAL CANCER, GYNECOLOGIC ONCOLOGY, 2014.....	2
--	---

TAB. 2.1: KULTURMEDIEN UND DEREN ZUSÄTZE	19
TAB. 2.2: VERWENDETE ZELLINIEN	20
TAB. 2.3: OLIGONUKLEOTIDE	21
TAB. 2.4: PRIMÄRANTIKÖRPER	22
TAB. 2.5: SEKUNDÄRANTIKÖRPER.....	22
TAB. 2.6: BEHANDLUNGSSCHEMA DER 96-LOCH-PLATTEN FÜR DIE DURCHFÜHRUNG DER ALAMARBLUE-ASSAYS	24
TAB. 2.7: SUBSTANZEN ZUR HERSTELLUNG DES ENZYM-MIX ZUR REVERSE TRANSKRIPTION FÜR 12 PROBEN	27
TAB. 2.8: SUBSTANZEN ZUR HERSTELLUNG DES PCR-REAKTIONSANSATZES.....	28
TAB. 2.9: ANNEALINGTEMPERATUREN UND ANZAHL DER BENÖTIGTEN ZELLYKLEN FÜR DIE VERSCHIEDENEN ZELLINIEN	28

7.3 *Abkürzungsverzeichnis*

Abb.	Abbildung
AF-1/-2	Aktivierungsfunktion 1/2
ADP	Adenylate phosphotransferase
AIB	Amplified in breast
ANOVA	Analysis of variance
ATCC	American Type Culture Collection
BRCA 1/2	Breast Cancer associated Gene 1/2
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA
CIS	Carcinoma in Situ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Didesoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Östrogenrezeptor (Estrogen Receptor)

ERK	Extracellular regulated kinase
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene
GnRH-I/-II	Gonadotropin-Releasing Hormon -I/-II
GPR-30	G protein-coupled receptor 30
GP1B	G-Protein gekoppelter estrogen receptor 1
HNPCC	Hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome
h	Stunde (hour)
IGF-1	Insulin-like growth factor
JNK	c-Jun N-terminale kinase
K	Kontrolle
kDa	Kilodalton
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Mol ($6,022 \times 10^{23}$ Teilchen)
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEM	minimal essential medium
μ l	Mikroliter
min	Minuten
mRNA	messenger-RNA
myc	myelocytomatosis viral oncogene homolog
NF κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells

nm	Nanometer
PBS	Phosphate buffered saline
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PR	Progesterone receptor
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAS	Rat sarcoma oncogene
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT	Reverse Transkriptase
SRC-1	Steroid receptor coactivator-1
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SERD	Selektiver Estrogenrezeptor Destabilisator
SERM	Selektiver Estrogen Rezeptor Modulator
Sp-1	Specificity protein 1
TAM	Tamoxifen
Taq	thermus aquaticus
TBST	Tween-TBS-Puffer
TGF- β	Transforming growth factor beta
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt
WHO	Welt-Gesundheitsorganisation (World Health Organization)
w/o	ohne (without)

7.4 Aminosäurecode für natürliche Aminosäuren

Alanin	Ala
Arginin	Arg
Asparagin	Asn
Aspartat	Asp
Cystein	Cys
Glutamat	Glu
Glutamin	Gln
Glycin	Gly
Histidin	His
Isoleucin	Ile
Leucin	Leu
Lysin	Lys
Methionin	Met
Phenylalanin	Phe
Prolin	Pro
Serin	Ser
Threonin	Thr
Tryptophan	Trp
Tyrosin	Tyr

Lebenslauf

Ich wurde am 27. März 1987 als drittes Kind des Richters Dr. Wolfhard Klöhn und seiner Ehefrau, der Lehrerin Ulrike Klöhn, geb. Reuss, in Hildesheim geboren.

Von 1993 bis 1997 besuchte ich die Grundschule Pfaffenstieg in Hildesheim, danach von 1997 bis 1999 die Orientierungsstufe Ost in Hildesheim.

Es schloss sich der Besuch des Scharnhorstgymnasiums in Hildesheim an. Dort legte ich im Jahr 2006 das Abitur ab.

Am 1.10.2006 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Universität Göttingen auf. Im März 2009 bestand ich den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Während des klinischen Studienabschnitts begann ich im Labor der Molekularen Gynäkologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Gründker mit der Arbeit zu der jetzt vorgelegten Dissertation.

Das Praktische Jahr (1. und 2. Tertial) absolvierte ich von Februar 2012 bis Oktober 2012 am Pius-Hospital in Oldenburg in den Fächern Chirurgie und Innere Medizin, das 3. Tertial am Evangelischen Krankenhaus in Oldenburg im Fach Gynäkologie.

Am 7.5.2013 bestand ich den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Göttingen.

Seit dem 1.8.2013 bin ich als Assistenzärztin in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Evangelischen Krankenhauses in Oldenburg tätig.