

**Aus der Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe
(Prof. Dr. med. G. Emons)
im Zentrum Frauenheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

**GnRH-Rezeptor-vermittelte Therapie des triple-negativen
Mammakarzinoms**

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

vorgelegt von
Crispin Föst
aus Halle (Saale)

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. M. Schön

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

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. D. Kube

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. H. Bastians

Tag der mündlichen Prüfung: 27. August 2013

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis | 1 |
| 1 Einleitung..... | 4 |
| 1.1 Mammakarzinom | 4 |
| 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie | 4 |
| 1.1.2 Therapie | 7 |
| 1.2 Gonadotropin-Releasing-Hormon Typ I | 9 |
| 1.3 AN-152 (AEZS-108)..... | 12 |
| 1.4 Fragestellung und Zielsetzung..... | 13 |
| 2 Material..... | 15 |
| 2.1 Geräte..... | 15 |
| 2.2 Verbrauchsmaterialien | 16 |
| 2.3 Chemikalien | 16 |
| 2.4 Puffer und Lösungen | 16 |
| 2.5 Kulturmedien und Medienansätze | 17 |
| 2.6 Biologisches Material..... | 18 |
| 2.6.1 Zelllinien | 18 |
| 2.6.2 Versuchstiere | 18 |
| 2.6.3 Matrigel™ | 18 |
| 2.7 Enzyme..... | 19 |
| 2.8 AN-152..... | 19 |
| 2.9 Oligonukleotide | 19 |
| 2.10 Antikörper | 19 |
| 2.11 Inhibitoren..... | 20 |
| 2.12 Kommerzielle Reaktionssysteme..... | 20 |
| 2.13 Software | 20 |
| 3 Methoden | 21 |
| 3.1 Zellkultivierung..... | 21 |
| 3.1.1 Kultivierung und Passagieren adhärenter Zellen..... | 21 |
| 3.1.2 Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zellen | 21 |
| 3.1.3 Zellzählung..... | 21 |
| 3.2 Tierversuche | 22 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.2.1 | Versuchstiere und Haltungsbedingungen..... | 22 |
| 3.2.2 | Vorbereitung und Injektion von Tumorzellen | 22 |
| 3.2.3 | Tumorwachstum..... | 22 |
| 3.2.4 | Versuchskonzept..... | 23 |
| 3.3 | AlamarBlue® -Proliferationsassay | 23 |
| 3.4 | Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials | 24 |
| 3.5 | Molekularbiologische Methoden | 25 |
| 3.5.1 | Isolierung von Nukleinsäuren | 25 |
| 3.5.2 | Quantifizierung von Nukleinsäuren..... | 25 |
| 3.5.3 | Reverse Transkription | 25 |
| 3.5.4 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 26 |
| 3.5.5 | Agarose-Gelelektrophorese | 27 |
| 3.6 | Proteinbiochemische Methoden..... | 28 |
| 3.6.1 | Präparation von Zelllysaten..... | 28 |
| 3.6.2 | Quantifizierung von Proteinen nach Bradford..... | 28 |
| 3.6.3 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 29 |
| 3.6.4 | Western Blot..... | 30 |
| 3.6.5 | Detektion und Visualisierung..... | 30 |
| 3.6.6 | <i>Strippen</i> von Nitrocellulosemembranen..... | 31 |
| 3.7 | Immunzytologischer Nachweis der GnRH-Rezeptor-Expression.... | 31 |
| 3.8 | Dokumentation und statistische Analysen | 32 |
| 4 | Ergebnisse | 33 |
| 4.1 | Effekte von AN-152 <i>in vitro</i> | 33 |
| 4.1.1 | GnRH-Rezeptor-Expression..... | 33 |
| 4.1.2 | Alamar®Blue-Proliferationsassay..... | 34 |
| 4.1.3 | Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials | 35 |
| 4.1.4 | Bestimmung der Caspase-3-Aktivität mittels Western Blot | 37 |
| 4.2 | Effekte von AN-152 <i>in vivo</i> | 37 |
| 4.2.1 | Xenotransplantation von HCC-1806..... | 38 |
| 4.2.2 | Xenotransplantation von MDA-MB-231 | 40 |
| 5 | Diskussion | 42 |
| 5.1 | Effekte von AN-152 <i>in vitro</i> | 43 |
| 5.2 | Effekte von AN-152 <i>in vivo</i> | 45 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 50 |

| | | |
|-----|--|----|
| 7 | Literaturverzeichnis | 51 |
| 8 | Anhang | 62 |
| 8.1 | Abkürzungsverzeichnis | 62 |
| 8.2 | Abbildungsverzeichnis | 64 |
| 8.3 | Tabellenverzeichnis | 65 |
| 8.4 | Formelverzeichnis | 66 |
| | Publikation zum Thema der Dissertation | 67 |
| | Danksagung | 68 |
| | Lebenslauf | 69 |

1 Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Mammakarzinom ist in den westlichen Industriestaaten der häufigste bösartige Tumor der Frau. Die Inzidenz für Frauen in Deutschland lag 2008 bei ca. 72.000 (ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2012). Jede achte bis zehnte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Die Erkrankung betrifft vorwiegend Frauen in der Postmenopause, so werden drei Viertel aller Erkrankungen bei Frauen über dem 50. Lebensjahr diagnostiziert. Trotz steigender Inzidenz seit den 80er Jahren ist unklar, ob das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, wirklich gestiegen ist. Dies könnte durch die erhöhte Lebenserwartung und die damit erhöhte Wahrscheinlichkeit, an Brustkrebs zu erkranken, als auch durch moderne Diagnostikverfahren, welche eine bessere Früherkennung von Tumoren ermöglichen, erklärt werden.

Ein Mammakarzinom zu entwickeln, ist ein multifaktorielles Geschehen. So lässt sich bei ca. 5 – 10 % der Erkrankten eine genetische Prädisposition nachweisen (ANTONIOU und EASTON, 2006; BRADBURY und OLOPADE, 2007). Dabei spielen Mutationen der DNA-Reparaturgene BRCA-1 und BRCA-2 eine entscheidende Rolle, da sie das Risiko für ein Mammakarzinom um das Zehn- bis Zwanzigfache erhöhen (CLAUS et al., 1994). Dabei weisen Frauen mit einer BRCA1-Gen-Mutation ein 50 %iges Mammakarzinomrisiko vor dem 50. Lebensjahr sowie ein 85 %iges bis zum 65. Lebensjahr auf. Des Weiteren haben diese Frauen ein deutlich erhöhtes Risiko, im Laufe ihres Lebens an einem Ovarialkarzinom (33 %) zu erkranken. Frauen mit einer BRCA2-Gen-Mutation erkranken ähnlich häufig an einem Mammakarzinom, entwickeln aber seltener Ovarialkarzinome. Neben der genetischen Prädisposition spielen allerdings noch weitere Risikofaktoren bei der Entstehung eines Mammakarzinoms eine Rolle. So haben Frauen mit familiärer Vorbelastung, aber ohne genetische Prädisposition, abhängig vom Verwandtschaftsgrad, ein doppelt so hohes Risiko, bei Verwandtschaft ersten Grades, ein Mammakarzinom zu erleben.

Weitere Risikofaktoren sind eine frühe Menarche und eine späte Menopause (MCPHERSON et al., 2000), Adipositas (SCHAFFLER et al., 2007), Alkoholkonsum (TERRY et al., 2007) und eine späte Schwangerschaft sowie Kinderlosigkeit (NEWCOMB et al., 1994). Das Risiko einer postmenopausalen Hormonersatztherapie wird hingegen kontrovers diskutiert (EMONS, 2001; SHAH und WONG, 2006).

Die histologische Einteilung des Mammakarzinoms erfolgte 1981 durch die WHO (*World Health Organization*). Die Unterteilung erfolgt in invasive und nichtinvasive Karzinome (*Carcinoma in situ*) und nach ihrem Ursprungsort (WHO, 1982). Der Morbus Paget sowie das inflammatorische Mammakarzinom gehören zu den seltenen Sonderformen und werden nach Ausbreitungsart und Bindegewebsanteil beschrieben.

Tab. 1.1: Histologische Klassifikation des Mammakarzinoms (WHO) (BUCHTA et al., 2006, S. 245)

| | |
|-----------------------------------|---|
| Nichtinvasive Karzinome | duktales Carcinoma in situ (DCIS) |
| | lobuläres Carcinoma in situ (LCIS) |
| Invasive Karzinome | invasive-duktales Karzinome mit dominanter intraduktaler Komponente |
| | invasive lobuläre Karzinome |
| | muzinöse Karzinome |
| | medulläre Karzinome |
| | papilläre Karzinome |
| | tubuläre Karzinome |
| | adenoid-zystische Karzinome |
| | apokrine Karzinome |
| | Karzinom mit Metaplasie |
| sonstige Typen | |
| Paget-Karzinom der Mamille | |

Etwa 85 % der invasiven Karzinome sind duktales Karzinome, welche vom Milchgang ausgehen, und nur 15 % der Fälle sind lobuläre Karzinome (vom Drüsenläppchen ausgehend).

Die TNM-Klassifikation nach der FIGO (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*) dient als Grundlage für mögliche Therapieoptionen. Sie beschreibt die Größe des Tumors (T), den nodalen Befall (N) und die Fernmetastasierung (M) (SUSEMIHL, 1975). Das histopathologische *Grading* wiederum teilt die Mammakarzinome nach ihrem Malignitätsgrad ein. Beschrieben werden hierbei der Grad der tubulären Differenzierung, Kernpleomorphie und der Anteil an Mitosen (BLOOM und RICHARDSON, 1957).

Tab. 1.2: Stadieneinteilung des Mammakarzinoms (TNM) (BUCHTA et al., 2006, S. 245)

| Klinische Klassifikation | |
|---------------------------------|--|
| TNM | Kriterien |
| T ₀ | kein Anhalt für Primärtumor |
| T _{is} | In-situ-Karzinom, M. Paget der Mamille |
| T _x | Primärtumor kann nicht beurteilt werden |
| T ₁ | Tumor < 2 cm |
| T _{1a} | ohne Fixierung an der Pektoralisfaszie oder am M. pectoralis |
| T _{1b} | mit Fixierung an der Pektoralisfaszie oder am M. pectoralis |
| T ₂ | Tumor 2-5 cm |
| T _{2a} | ohne Fixierung an der Pektoralisfaszie oder am M. pectoralis |
| T _{2b} | mit Fixierung an der Pektoralisfaszie oder am M. pectoralis |
| T ₃ | Tumor > 5 cm |
| T _{3a} | ohne Fixierung an der Pektoralisfaszie oder am M. pectoralis |
| T _{3b} | mit Fixierung an der Pektoralisfaszie oder am M. pectoralis |
| T ₄ | Beteiligung von Brustwand oder Haut |
| T _{4a} | Befall der Brustwand |
| T _{4b} | Hautbefall |
| T _{4c} | 4a + 4b gemeinsam |
| T _{4d} | inflammatorische Karzinome |
| N ₀ | keine palpablen axillären Lk homolateral |
| N ₁ | nur bewegliche, homolaterale axilläre Lk |
| N _{1a} | Lk klinisch nicht verdächtig |
| N _{1b} | Lk klinisch verdächtig |

| | |
|----------------|---|
| N ₂ | Lk unbeweglich, fixiert |
| N ₃ | Lk entlang der A. mammaria interna befallen |
| N _x | regionäre Lk nicht beurteilbar |
| <hr/> | |
| M ₀ | keine Fernmetastasen |
| M ₁ | Fernmetastasen inkl. Befall der supraclavikulären Lymphknoten |
| M _x | Fernmetastasen nicht beurteilbar |

Die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus hat in den letzten Jahren immer mehr an Relevanz, klinisch als auch therapeutisch, erlangt. Vornehmlich wird hierbei neben dem Östrogen- und Progesteron-Rezeptorstatus auch der HER2/neu-Rezeptorstatus (*human epidermal growth factor receptor 2*) bestimmt (THORPE et al., 1987; SLAMON et al., 1989). Bei ca. 25 % der Patientinnen mit Mammakarzinom tritt eine Überexpression des HER2/neu-Rezeptors auf. Dieser Rezeptor, ein transmembraner Wachstumsrezeptor, welcher Proliferationssignale in die Zelle vermittelt, kann selektiv mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) blockiert und somit die Signalkaskade unterbrochen werden (CHANG, 2010). Mittels der Herstellung von Genexpressionsprofilen durch DNA-Microarrays konnten neue Tumorsubtypen definiert werden. Hierunter zählt das *basal-like* Mammakarzinom, wobei die meisten dieser Karzinome durch einen negativen Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus sowie eine fehlende Überexpression von HER2/neu charakterisiert sind. Diese triple-negativen Mammakarzinome machen ca. 15 % der Mammakarzinome aus und zeichnen sich durch eine schlechte Prognose, eine Unempfindlichkeit gegenüber verfügbaren endokrinen Therapien sowie eine kürzere Überlebenszeit aus (VAN 'T VEER et al., 2002; SORLIE et al., 2003; SOTIRIOU et al., 2003). Allerdings gelten nur ca. 85 % aller triple-negativen Mammakarzinome als *basal-like* Mammakarzinome (LIVASY et al., 2006).

1.1.2 Therapie

Ergänzend zur Operation, welche brusterhaltend angestrebt werden sollte, bestehen in Abhängigkeit vom Stadium des Karzinoms weitere Therapiemöglichkeiten. Diese können zum einen neoadjuvant, also vor der

Operation und mit dem Ziel des *downstaging*s und der Verbesserung der Operationsbedingungen, oder adjuvant, nach der Operation zur Prognoseverbesserung, durchgeführt werden. Bei der Chemotherapie, welche sowohl adjuvant als auch neoadjuvant verabreicht werden kann, handelt es sich um Zytostatika, welche zumeist in Dreifachkombinationen verwendet werden. Zwei häufig verwendete Kombinationen sind FEC (5-Fluorouracil, Epirubicin, Cyclophosphamid) und FAC (5-Fluorouracil, Doxorubicin, Cyclophosphamid). Bei bereits durchgeführter brusterhaltender Operation oder Mastektomie mit hohem Rezidivrisiko besteht außerdem die Indikation für eine adjuvante Strahlentherapie.

Des Weiteren gehört heute aufgrund der geringen Toxizität, tolerabler Nebenwirkungen und des geringen therapeutischen Aufwands die antihormonelle Therapie zur Therapie der Wahl beim primären Mammakarzinom (GOLDHIRSCH et al., 2005). Mit Tamoxifen, einem Antiöstrogen, ist man in der Lage, gezielt Östrogenrezeptoren zu blockieren (WARD, 1973; LEGHA und CARTER, 1976). Innerhalb der adjuvanten Antihormontherapie gibt es heute neben Tamoxifen auch die Möglichkeit, postmenopausale Frauen mit Aromatasehemmern der mittlerweile dritten Generation wie Anastrozol und Letrozol zu behandeln (KESISIS et al., 2009). Diese inhibieren die Synthese von Östrogen im Muskel- und Fettgewebe durch Blockierung des Enzyms Aromatase. Frauen in der Prämenopause werden heute mit GnRH-I Analoga behandelt und so durch chemische Kastration in den Zustand der Postmenopause versetzt (EMONS et al., 2003). Somit sind die Voraussetzungen für die schon bereits beschriebene Therapie mit Antiöstrogenen gegeben. Eine relativ neue Therapie stellt der Östrogenrezeptor-Antagonist Fulvestrant (Faslodex[®]) dar. Dieser selektive Östrogenrezeptordestruktor (SERD, *selective estrogen receptor destructor*) ist im Gegensatz zu Antiöstrogenen wie Tamoxifen in der Lage, über eine Reduktion der Anzahl der Östrogenrezeptoren die Östrogensynthese zu inhibieren (HOWELL et al., 2004).

1.2 Gonadotropin-Releasing-Hormon Typ I

Das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) ist ein hypothalamisches Dekapeptid, welches 1971 erstmals von Andrew V. Schally und Roger Guillemin strukturell und in seiner Wirkung beschrieben wurde (AMOSS et al., 1971; SCHALLY et al., 1971). Der ursprüngliche Name Luteinisierendes Hormon-Releasing-Hormon (LHRH) wurde später in Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) umbenannt, als nachgewiesen wurde, dass es neben der Sekretion des Luteinisierenden Hormons (LH) auch für die Sekretion des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) verantwortlich ist. Aufgrund weiterer bis heute entdeckter Isoformen erhielt die ursprüngliche den Namen GnRH-I. GnRH-I wird alle 30 bis 120 min über hypothalamische Neuronen pulsatil in das Portalvenensystem der Hypophyse sezerniert (KNOBIL, 1990). Im Hypophysenvorderlappen reguliert es die Bildung und Freisetzung der Gonadotropine FSH und LH, welche in den Ovarien zum einen die Reifung der Follikel als auch die Synthese der Steroidhormone steuern. Diese so genannte Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse unterliegt speziellen Rückkopplungsmechanismen und somit einer Regulation (Abb. 1.1) (REISSMANN et al., 1995; SHUPNIK, 1996).

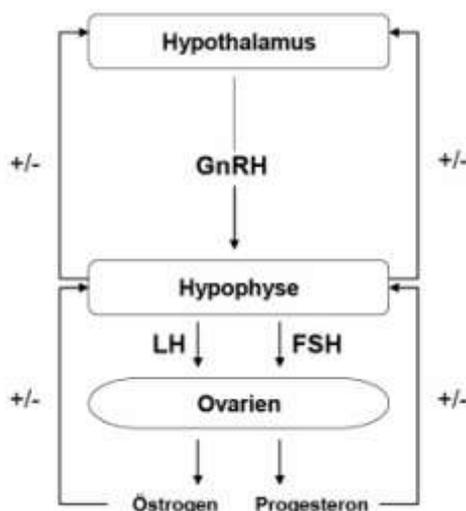


Abb. 1.1: Rückkopplungsmechanismus der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse. GnRH-I stimuliert die Hypophyse und führt zur Freisetzung von LH und FSH. Dies wiederum führt zur Stimulierung der Ovarien und zur Östrogen- und Progesteronproduktion. Reguliert wird die Hormonsekretion über einen Rückkopplungsmechanismus (FISTER, 2008, S. 2).

Der humane GnRH-I Rezeptor, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR, *G-protein coupled receptor*), wurde erstmals 1992 kloniert und sequenziert (KAKAR et al., 1992). Das GnRH-I Rezeptorgen liegt auf Chromosom vier und setzt sich aus drei Exons und zwei Introns zusammen.

GPCR gehören zur Familie der Sieben-Transmembran-Rezeptoren (7-TMR), bei denen die sieben membrandurchspannenden helikalen Domänen über Peptidschleifen miteinander verbunden sind (Abb. 1.2). Der glykosylierte N-Terminus des Rezeptors liegt extrazellulär, während das carboxyterminale Ende auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert und in der Membran verankert ist. Dies macht den GnRH-I Rezeptor zu einer Besonderheit unter den GPCR, welche normalerweise über einen charakteristischen intrazellulären C-terminalen Anhang verfügen (STOJILKOVIC et al., 1994; SEALFON et al., 1997). Die Rezeptoraktivierung erfolgt über das N-terminale Ende des GnRH-I Rezeptors durch Bindung von GnRH-I. Dies führt zu einer Dimerisierung und Internalisierung des Rezeptors, was eine Kaskade intrazellulärer Reaktionen und die Sekretion der Gonadotropine LH und FSH auslöst (SEALFON et al., 1997; SHAPIRO, 2003; MILLAR et al., 2004). Für die Sekretion der Gonadotropine LH und FSH stellt die Internalisierung allerdings keine unerlässliche Voraussetzung dar (HOPKINS und GREGORY, 1977).

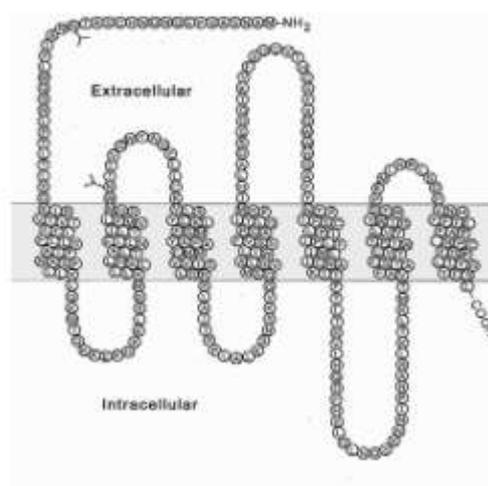


Abb. 1.2: Struktur des humanen GnRH-I Rezeptors. Der GnRH-I Rezeptor ist aus sieben transmembranen Helices aufgebaut. Der glykosylierte N-Terminus liegt extrazellulär, während das carboxylierte Ende auf der zytoplasmatischen Seite in der Membran verankert ist. Glykosylierungsschnittstellen sind mit (Y) gekennzeichnet (NEILL, 2002, S. 2).

Durch Bindung an den GnRH-I Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und einer damit verbundenen Aktivierung des G-Proteins α_q . Dies führt über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und im Verlauf der Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinase C (PKC) zur Aktivierung der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) (KRAUS et al., 2001; MCARDLE et al., 2002; RUF et al., 2003). Diese ist an der Synthese der Gonadotropine LH und FSH sowie der Expression der GnRH-Rezeptoren beteiligt (LEVI et al., 1998; ROBERSON et al., 1999; HARRIS et al., 2002; BONFIL et al., 2004). Die Expression von GnRH-I-Rezeptoren in den gonadotropen Zellen hat somit regulatorischen Einfluss sowohl auf Synthese als auch Sekretion von LH und FSH.

Nicht nur die gonadotropen Zellen der Adenohypophyse besitzen Bindungsstellen für GnRH-I, sondern auch in einigen extrahypophysären, reproduktiven Organen wie dem Ovar (MINARETZIS et al., 1995) oder dem Myometrium (CHEGINI et al., 1996) konnte das GnRH-I-Rezeptorsystem nachgewiesen werden. Eine Expression von GnRH-I und seinem Rezeptor findet sich nachweislich auch in einigen gynäkologischen Tumoren. Ca. 80 % der Ovarial- und Endometriumkarzinome sowie ca. 50 % der Mammakarzinome zeigten sich positiv für GnRH-I und seinen Rezeptor (IRMER et al., 1994; EMONS et al., 1997; MANGIA et al., 2002; VOLKER et al., 2002). Die Sequenz des GnRH-I Rezeptors gynäkologischer Tumoren stimmt mit der des hypophysären überein (KAKAR et al., 1994), allerdings erfolgt die Aktivierung der Signaltransduktion nicht durch GnRH-I (EMONS et al., 1996).

Vermittelt über das G-Protein α_i wird die Phosphotyrosinphosphatase (PTP) aktiviert, wodurch die anschließende Tyrosinauto phosphorylierung von Wachstumsfaktorrezeptoren gehemmt wird (EMONS et al., 1997; GRÜNDKER et al., 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von GnRH-I und dessen Analoga die *epidermal-growth-factor* (EGF)-induzierte Aktivierung der MAPK/ERK inhibiert wird (GRÜNDKER et al., 2000b). Des Weiteren wird durch GnRH-I und seine Agonisten der *nuclear factor kappa B* (NF κ B) aktiviert, welcher so den Tumorzellen Schutz vor Zytostatika-induzierter Apoptose bietet (GRÜNDKER et al., 2000a; FISTER et al., 2008).

1.3 AN-152 (AEZS-108)

Ein weiterer Schritt in der Behandlung maligner Tumore ist die Verbindung eines systemisch wirksamen Chemotherapeutikums mit einem GnRH-Agonisten. AN-152 ist ein zytotoxisches GnRH-Analogon, welches sich durch die kovalente Bindung von dem Anthrazyklin Doxorubicin an den GnRH-I-Agonisten [D-Lys⁶]GnRH auszeichnet (NAGY et al., 1996). Dieser GnRH-I-Agonist-Transporter ist in der Lage, Doxorubicin über spezifische GnRH-Rezeptoren in die Zelle zu internalisieren. Das sonst systemisch wirkende Doxorubicin wirkt somit lokal in der Zelle und kann in der gezielten Tumorthherapie eingesetzt werden. Hierbei werden geeignete zytotoxische Agenzien kovalent an eine freie Aminoseitenkette am [D-Lys⁶]GnRH gebunden. Die Bindungsaffinität des [D-Lys⁶]GnRH für GnRH-Rezeptoren geht dabei nicht verloren (SCHALLY und NAGY, 1999). Dieser Komplex kann nur von GnRH-Rezeptor-exprimierenden Zellen internalisiert werden. Des Weiteren kann so das MDR-1 (*multidrug resistance-1*) System umgangen werden. Durch das MDR-System sind z.B. Tumorzellen in der Lage, lipophile Medikamente wie Doxorubicin über eine Effluxpumpe wieder aus der Zelle auszuschleusen. MDR-1 ist ein membranständiges Glykoprotein, welches in einer Vielzahl humaner Gewebe exprimiert wird. Die Expression kann unter Medikamentenexposition um den Faktor 100-200 ansteigen (BOOSER und HORTOBAGYI, 1994; EARLY-BREAST-CANCER-TRIALISTS'-COLLABORATIVE-GROUP, 1998). Anhand humaner Mammakarzinomzellen konnte eine Korrelation zwischen MDR-1-Expression unter Chemotherapie mit Anthrazyklin und dem Grad der Medikamentenresistenz nachgewiesen werden (ZHANG und LING, 2000).

Auch an humanen Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien, welche GnRH-Rezeptoren exprimieren, konnte diese selektive Internalisierung von AN-152 gezeigt werden. AN-152 und Doxorubicin sind bei einer Wellenlänge von 488 nm autophosphorylierend und konnten mit Hilfe eines konfokalen *Laser-Scanning-Mikroskops*, einem Fluoreszenzmikroskop, optisch bestimmt werden. Nach Aufnahme in die Zelle spaltete sich Doxorubicin vom GnRH-Agonisten ab und akkumulierte im Zellkern. Des Weiteren konnte die Aufnahme von AN-152 in die Zelle durch ein Überangebot von [D-Trp⁶]GnRH, einem GnRH-Agonisten, kompetitiv gehemmt werden. Eine

intrazelluläre Anreicherung von AN-152 in GnRH-Rezeptor-negativen Zellen konnte mittels der Fluoreszenzmikroskopie hingegen nicht detektiert werden (WESTPHALEN et al., 2000).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Das Mammakarzinom ist der häufigste bösartige Tumor der Frau weltweit. Die Inzidenz beläuft sich dabei auf mehr als 1 Million Neuerkrankungen pro Jahr und die Mortalität liegt bei ca. 370.000 Todesfällen pro Jahr. Etwa 75-80 % der Karzinome exprimieren Östrogen- und/oder Progesteronrezeptoren. Bei 15-20 % aller Mammakarzinome findet man eine Überexpression des HER2/neu-Rezeptors. Für Patientinnen, auf deren Mammakarzinom dies zutrifft, wurden bereits spezifische und effektive Therapieformen entwickelt. Das triple-negative Mammakarzinom hingegen exprimiert weder Östrogen- und Progesteronrezeptoren noch überexprimiert es den HER2/neu-Rezeptor. Bei 10-15 % der Mammakarzinome handelt es sich um triple-negative Mammakarzinome, wobei für diese die Möglichkeit einer gezielten Hormon- oder Immuntherapie fehlt.

In der Vergangenheit konnte die Expression von GnRH und seinem Rezeptor bei verschiedenen gynäkologischen Tumoren gezeigt werden. Um die Wirkung von AN-152 auf das triple-negative Mammakarzinom zu untersuchen, wird dementsprechend der Nachweis einer Expression von GnRH-I-Rezeptoren an den hier verwendeten triple-negativen Karzinomzelllinien erfolgen. Ziel ist es außerdem, einen antiproliferativen Effekt von AN-152 nachzuweisen. Hierfür werden Proliferations- und Apoptoseassays durchgeführt. Für die Aufklärung der Apoptoseinduktion innerhalb der Tumorzelle wird die Caspase-3-Aktivität bestimmt.

Im *in-vivo*-Nacktmausmodell soll die Auswirkung einer über den GnRH-Rezeptor-vermittelten Therapie mit AN-152 nach Xenotransplantation von triple-negativen Mammakarzinomzellen gezeigt werden. Als Kontrolle dient dabei eine weitere unbehandelte sowie eine mit Doxorubicin behandelte Gruppe. Doxorubicin, ein systemisch wirkendes Anthrazyklin, ist bereits in der Chemotherapie maligner Tumoren etabliert. AN-152 wird

hingegen nach Bindung am GnRH-I Rezeptor in die Tumorzelle internalisiert und wirkt lokal.

Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Etablierung einer spezifischen Therapie des triple-negativen Mammakarzinoms leisten. Durch ein über den GnRH-Rezeptor in die Zelle internalisiertes Chemotherapeutikum soll die antiproliferative Wirkung von AN-152 verdeutlicht werden. Zudem könnte eine gezieltere sowie effektivere Therapie dieses Karzinoms erreicht werden. Des Weiteren sollte dieses Therapiemodell verglichen mit der systemischen Gabe von Chemotherapeutika mit einem geringeren Ausmaß an Nebenwirkungen einhergehen.

2 Material

2.1 Geräte

| | |
|---|---|
| Analysenwaage BP161P | Sartorius, Göttingen |
| Autoklav 2540 EL | Tuttnauer, Breda, NL |
| Biofuge pico | Heraeus Holding, Hanau |
| Brutschrank 3121 S/N 28439532 | Forma Scientific, San Bruno, USA |
| Elektrophoresekammer, DNA | OWL Separation Systems, Portsmouth, USA |
| Labofuge 400R | Heraeus Holding, Hanau |
| Magnetrührer, MR3000 | Heidolph, Schwabach |
| Mikroskop IX51 | Olympus, Hamburg |
| Mikrowaage M2P, elektronisch | Sartorius, Göttingen |
| Mini-PROTEAN® III Cell-System | Bio-Rad, München |
| Multi-Detection Microplate Reader, Synergy HT | BIO-TEK, Bad Friedrichshall |
| pH-Meter CG 22 | Schott Geräte, Mainz |
| Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25 | Zeiss, Jena |
| Photometer (BioPhotometer 6131) | Eppendorf, Hamburg |
| Power Supply, 1000/500 | Bio-Rad, München |
| Power-Supply, 200/2.0 | Bio-Rad, München |
| Röntgenfilme | Kodak, Stuttgart |
| Röntgenfilmkassette | X-Ray GmbH, Augsburg |
| Schüttler Titramax 1000 | Heidolph, Schwabach |
| Spektralphotometer (Biophotometer) | Eppendorf, Hamburg |
| Sterilwerkbank LaminAir® HA 2448 GS | Heraeus Holding, Hanau |
| Tanksystem für Western Blot | Bio-Rad, München |
| Thermocycler T3000 | Biometra, Göttingen |
| Thermomixer compact | Eppendorf, Hamburg |
| Ultrazentrifuge (UZ6) Sorvall | Thermo Fisher Scientific, Bonn |
| UV-Transilluminator | Biometra, Göttingen |
| Vortex Genie 2™ | Bender & Hobein, Zürich, CH |
| Waage Kern 440-47 | Kern, Balingen |
| Wasserbad | Memmert, Schwabach |

X-Ray Röntgenfilmentwickler SRS-101A Konica, Langenhagen

2.2 Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien (Einmalartikel) wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Nunc (Wiesbaden), PAA (Cölbe), Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (München) bezogen.

2.3 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht gesondert erwähnt, von den Firmen Merck (Darmstadt), PAA (Cölbe), Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Riedel-de Häen (Seelze) und Roche (Mannheim) bezogen. Die Chemikalien entsprechen, soweit nicht anders angegeben, dem höchsten zur Verfügung stehenden Reinheitsgrad.

2.4 Puffer und Lösungen

Für das Ansetzen von Puffern und anderen Lösungen wurde, falls nicht gesondert erwähnt, autoklaviertes, doppelt destilliertes Wasser verwendet.

| | |
|---------------------------|---|
| <i>blocking</i> -Lösung | TBST + 5 % (w/v) Magermilchpulver |
| DNA-Ladepuffer (10x) | 50 % (v/v) Glycerin, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol |
| DFP | Phosphorsäureester |
| DTT-Assaypuffer | 10 mM Tris/HCl, 0,2 % (w/v) NaN ₃ , 0,2 % (w/v) BSA, 1mM DTT, pH 7,6 |
| Ethidiumbromid-Bad | 0,007 % (v/v) EtBr |
| 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 |
| 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 |

| | |
|--------------------------------|---|
| PBST | PBS + 0,2 % BSA, 0,1 % Triton X-100 |
| PBSTN | PBST + 5 % FCS |
| SDS-Elektrophoresepuffer (10x) | 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS |
| TBE | 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8 |
| TBS (10x) | 1,5 M NaCl, 500 mM Tris, pH 7,5 |
| TBST | TBS + 0,1 % (v/v) Tween 20 |
| Transferpuffer | 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol |

2.5 Kulturmedien und Medienansätze

Alle für die Zellkultur eingesetzten Medien und deren Zusätze wurden von den Firmen Biochrom (Berlin), Invitrogen (Karlsruhe), PAA (Cölbe) und Sigma-Aldrich (München) bezogen.

| | |
|--|--|
| MEM-Earl Kulturmedium w Phenolrot | 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) P/S, 50 IU Insulin, 0,1 % (v/v) Transferrin |
| MEM-Earl Kulturmedium w/o Phenolrot (Hungermedium) | 1 % (v/v) P/S, 1% (v/v) L-Gln, 50 IU Insulin, 0,1 % (v/v) Transferrin, 0,22 % (w/v) NaHCO ₃ |
| Einfriermedium | MEM-Earl Kulturmedium + 10 % DMSO |

2.6 Biologisches Material

2.6.1 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden die beiden unten aufgeführten triple-negativen Brustkrebszelllinien verwendet.

Tab. 2.1: Verwendete Zelllinien des triple-negativen Mammakarzinoms

| Name | Herkunft | Histologie | Referenz |
|------------|--------------|---|-------------------------------|
| HCC-1806 | Primärtumor | Plattenepithelkarzinom, mäßig differenziert (G2), Stadium IIB (T3,N0,M0), | ATCC (GAZDAR et al., 1998) |
| HCC-1937 | Primärtumor | primär duktales Karzinom, gering differenziert (G3), Stadium IIB | DSMZ (TOMLINSON et al., 1998) |
| MDA-MB-231 | Pleuraerguss | Adenokarzinom | ATCC (BRINKLEY et al., 1980) |

2.6.2 Versuchstiere

Tab. 2.2: Mausstamm

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|------------|--------------------------------------|-------------------------|
| CD 1 Nu/Nu | CrI:NU/NU- <i>Foxn1^{nu}</i> | Charles River, Sulzfeld |

2.6.3 Matrigel™

Tab. 2.3: Matrigel™

| Material | Herkunft | Referenz |
|------------------------------------|--|----------------------------|
| Matrigel™ Basement Membrane Matrix | Engelberth-Holm-Swarm (EHS)-Maussarkom | BD Biosciences, Heidelberg |

2.7 Enzyme

| | |
|---------------------------------------|-----------------------|
| SuperScript™ II Reverse Transcriptase | Invitrogen, Karlsruhe |
| Taq DNA Polymerase | Roche, Mannheim |
| Trypsin-EDTA (0,05 %/0,02 % in D-PBS) | PAA, Cölbe |

2.8 AN-152

AN-152 ist ein zytotoxisches GnRH-Analogon, bei welchem das Anthrazyklin Doxorubicin kovalent an den GnRH-I-Agonist-Transporter [D-Lys⁶]GnRH gebunden ist (Aeterna Zentaris, Frankfurt). Für die Experimente wurde AN-152 in MEM-Earl Kulturmedium gelöst und war darunter stabil. Des Weiteren kam als Zusatz DFP, ein Phosphorsäureester, hinzu, welcher zu einer Verlängerung von $t_{1/2}$ von AN-152 führt.

2.9 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) synthetisiert.

GnRH-I R: for 5' – GAC CTT GTC TGG AAA GAT CC – 3'
 rev 5' – CAG GCT GAT CAC CAC CAT CA – 3'

L7: for 5' – AGA TGT ACA GAA CTG AAA TTC – 3'
 rev 5' – ATT TAC CAA GAG ATC GAG CAA – 3'

2.10 Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Tab. 2.4: Verwendete Antikörper

| Antikörper | Herkunft/Beschreibung | Referenz |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Anti-active Caspase 3 | Kaninchen, polyklonal, 1:4000 | BD Pharmingen |
| Anti-Rabbit IgG | Affe, monoklonal, 1:20000 | GE Healthcare, Freiburg |

2.11 Inhibitoren

| | |
|--|------------------------|
| Protease Inhibitor Cocktail | Sigma-Aldrich, München |
| Recombinant RNasin [®] Ribonuclease Inhibitor | Promega, Mannheim |

2.12 Kommerzielle Reaktionssysteme

| | |
|--|-------------------------------------|
| AlamarBlue [®] | Serotech, Martinsried/Planegg |
| Bio-Rad Protein Assay Kit | Bio-Rad, München |
| Diaminobenzidin Substrat-Chromogen System | Dako, Hamburg |
| d(T)15 Primer | Roche, Mannheim |
| ECL Immobilon [®] Western | Millipore, Schwalbach |
| JC-1 Mitochondrial Membran Potential Detection Kit | Cell Technolgy Inc. |
| Rabbit Histostain [®] -SP Kit | Zymed, South San Francisco (USA) |
| RNeasy [®] Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| RNase free Dnase Set | Qiagen, Hilden |
| Trypanblau-Lösung | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Zellysepuffer, CelLytic [®] -M | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |

2.13 Software

| | |
|--|--|
| Adobe Photoshop 7.0 | Adobe Systems, München |
| GraphPad Prism [®] (Version 5.0) | GraphPad Software Inc., San Diego, USA |
| BioDoc Analyze 2.1 | Biometra, Göttingen |
| KC4 [™] Synergy HT | Bio-Tek, Bad Friedrichshall |
| Kodak Digital Science 1D Image Analyse Software (Version 2.0.3) | Kodak, Stuttgart |
| Microsoft [®] Office 2007 | Microsoft Corporation, Unterschleißheim |

3 Methoden

3.1 Zellkultivierung

3.1.1 Kultivierung und Passagieren adhärenter Zellen

Die Zellen wurden in 75 -m²-Kulturflaschen bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO² kultiviert. Als Kulturmedium wurde MEM-Earl-Kulturmedium verwendet, welches 10 % FCS, 1 % P/S, 50 IU Insulin sowie 0,1 % Transferrin enthielt.

Bei Erreichen einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden diese mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurden diese in Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet erneut in Kulturmedium aufgenommen und auf zwei bis drei Zellkulturlaschen verteilt. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle zwei bis drei Tage.

3.1.2 Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zellen

Zur Konservierung von Zellen wurde das Zellpellet in Biofreeze-Einfriermedium aufgenommen und bei -80°C eingefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte dann in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen tiefgefrorener Zellen wurde diese kurzzeitig im Wasserbad erwärmt, in Kulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 24 h wurde das Kulturmedium ausgetauscht.

3.1.3 Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (0,1 mm Tiefe, 0,0025 cm² Fläche, Laboroptik, Friedrichsdorf) unter einem Lichtmikroskop durchgeführt. Zur Differenzierung von toten und vitalen Zellen wurde die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:2 mit Trypanblau-Lösung (Serva, Heidelberg) versetzt. Durch Blaufärbung des Zytosols bei toten Zellen konnten diese von den vitalen abgegrenzt werden.

3.2 Tierversuche

3.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Alle *in-vivo*-Experimente wurden gemäß den deutschen ethischen Richtlinien und den deutschen Tierschutz-Richtlinien durchgeführt.

Als Versuchstiere wurden ausschließlich sechs bis acht Wochen alte weibliche thymusdefiziente Nacktmäuse (CD1 nu/nu) der Firma Charles River (Sulzfeld, Germany) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 20 g verwendet. Die Tiere wurden in sterilen Käfigen mit bis zu fünf Mäusen pro Käfig in einem klimatisierten Raum mit Tag-Nacht-Zyklen von zwölf Stunden gehalten. Des Weiteren wurden sie mit autoklaviertem Wasser und Futter *ad libitum* versorgt.

3.2.2 Vorbereitung und Injektion von Tumorzellen

Zu Beginn wurden die für das Tierexperiment benötigten Zellen (HCC-1806 und MDA-MB-231) zunächst *in vitro* kultiviert und expandiert. Bei einer Konfluenz in den Zellkulturflaschen von ca. 80 % wurden die Zellen trypsinisiert und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann gezählt und die definierte Zellzahl von 1×10^7 Zellen pro Maus in Zellkulturmedium und Matrigel im Verhältnis 1:2 resuspendiert und bis zur Injektion auf Eis aufbewahrt.

Die Applikation der Tumorzellen erfolgte subkutan in die rechte Flanke.

3.2.3 Tumorwachstum

Der Verlauf des Tumorwachstums wurde durch die Bestimmung des Tumorumfanges (TV) mit Hilfe eines digitalen Messschiebers kontrolliert. Dafür wurde der größte Längendurchmesser (a) und im rechten Winkel dazu der größte Breitendurchmesser (b) bestimmt. Zur Berechnung des Tumorumfanges wurde folgende Formel verwendet (NOH et al., 2003):

Formel 1: Berechnung des Tumorumfanges

$$TV = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left(\frac{1}{2} \cdot b\right)^2 \cdot \frac{1}{2} \cdot a \quad (1)$$

Die Bestimmung des Tumorumfanges erfolgte vor Beginn und nach Ende der Therapie und mindestens einmal wöchentlich.

3.2.4 Versuchskonzept

Der Therapiebeginn war der Tag der Tumolvolumenmessung nach zwei Wochen, an welchem alle Tiere solide Tumoren von ca. 80 mm³ entwickelt hatten. Die Mäuse wurden in Gruppen zu je fünf Tieren eingeteilt (n = 5):

1. Gruppe: Kontrolle (unbehandelt)
2. Gruppe: 60 nmol Doxorubicin
3. Gruppe: 60 nmol AN-152.

Der erste Therapietag wurde in der Auswertung als Tag 0 bezeichnet. Doxorubicin (60 nmol) und AN-152 (60 nmol) wurden *intraperitoneal* (i.p.) injiziert. Die Behandlung wurde alle drei Tage wiederholt (Tag 0, 3, 6, 9, 12) und an den Tagen 0, 3, 6, 9, 12, 15 wurde das Tumolvolumen bestimmt. Nach 15 Tagen oder beim Auftreten von Abbruchkriterien erfolgte die Tötung der Nacktmäuse durch Inhalationsnarkose mit CO₂ und anschließendem Genickbruch.

3.3 AlamarBlue[®] -Proliferationsassay

AlamarBlue[™] ist ein wasserlöslicher Farbstoff, welcher Resazurin als Redox-Indikator enthält. Dieser ist in oxidiertem Zustand blau und verfärbt sich bei Reduktion irreversibel rot in Resorufin. Die Reduktion von Resazurin basiert auf der Atmungsaktivität (Elektronentransport) der Mitochondrien (AHMED et al., 1994) und stellt ein Maß der Proliferationsaktivität der Zellen dar. Je mehr reduziertes Resazurin, desto größer ist die Proliferation. Dieser Farbumschlag kann mittels Multidetektion Microplate Reader (Bio-Tek) bei einer Wellenlänge von 570 nm und 630 nm spektralphotometrisch erfasst werden. Für die Proliferationsassays wurden die Zellen mittels der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und schließlich in definierter Zellzahl in 96-Well-Platten (Falcon) wie folgt in 100 µl Hungermedium (1 % (v/v) P/S, 1% (v/v) L-Gln, 50 IU Insulin, 0,1 % (v/v) Transferrin, 0,22 % (w/v) NaHCO₃) ausgesät: HCC-1806 mit 1600 Zellen/Well und HCC-1937 mit 3200 Zellen/Well. Die Zellen wurden nun für 24 h bei 37°C inkubiert und dann jedes Well mit 50 µl AN-152 stimuliert. AN-152 wurde in den Konzentrationen 1x10⁻⁵, 1x10⁻⁷, 1x10⁻⁹ und 1x10⁻¹¹ M verwendet. Nach 48 h

Inkubation wurden die Zellen erneut mit je 50 µl stimuliert und weitere 48 h inkubiert.

Nach insgesamt 120 h (= 5 Tage) Inkubation wurden die Versuche ausgewertet. Hierfür wurde auf jedes Well 20 µl AlamarBlue™ pipettiert und nach 4 h Inkubation bei 37°C spektralphotometrisch gemessen.

3.4 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials

Die frühe Apoptose des intrinsischen Weges, welche durch Porenbildung in den Mitochondrien verursacht wird, ist durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials charakterisiert. Mit Hilfe des lipophilen, kationischen Fluoreszenzfarbstoffes JC-1 kann dieser elektrochemische Gradient bestimmt werden (SMILEY et al., 1991). JC-1 kann sowohl die Plasma- als auch Mitochondrienmembran passieren und durch einen reversiblen Farbumschlag von grün zu rot das steigende Membranpotential anzeigen. In gesunden Zellen mit hohem mitochondrialen Membranpotential bildet JC-1 spontan rot fluoreszierende Aggregate, während in apoptotischen Zellen durch Verlust des mitochondrialen Membranpotentials JC-1 in seiner monomeren Form vorliegt und grün fluoresziert.

Für den Versuch wurden die Zellen in definierter Zellzahl von 100.000 Zellen pro Well (in 2 ml Kulturmedium) auf 6-Well-Zellkulturplatten verteilt. Die Zellkulturplatten wurden bei 37°C so lange inkubiert, bis eine Konfluenz der Zellen von ca. 80 % erreicht war. Das Kulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und 2 ml Hungermedium auf die Zellen pipettiert. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen mit AN-152 in den Konzentrationen 1×10^{-9} M und 1×10^{-7} M behandelt und für weitere 48 h inkubiert.

Für den nächsten Schritt wurde der JC-1 Mitochondrial Membran Detection Kit der Firma Cell Technology Inc. nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden von den Kulturplatten abtrypsiniert, zentrifugiert, mit der JC-1 Reagenz resuspendiert und dem JC-1 Puffer gewaschen. Nach Überführen der Zellen auf eine schwarze 96-Well-Kulturplatte konnte die Messung im Multidetektion Microplate Reader von Bio-Tek erfolgen. Dabei wurde bei einer Wellenlänge von 550/600 nm der rote Fluoreszenzfarbstoff und bei 485/535 nm der grüne Fluoreszenzfarbstoff detektiert.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von RNA aus adhärennten Zellen wurde mittels des RNeasy® Mini Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Aussaat der Zellen in Zellkulturflaschen (25 m²) und einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen in RLT-Puffer aufgenommen und bei -80°C gelagert.

3.5.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm entsprechend dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren durchgeführt. Der Reinheitsgrad der Nukleinsäuren ergibt sich aus dem Verhältnis der Extinktionswerte von 260 nm zu 280 nm, der Wellenlänge, bei welcher Proteine ihr Absorptionsmaximum besitzen. Proteine gelten bei der RNA-Präparation als Verunreinigung, demnach sollte der Quotient (A_{260}/A_{280}) zwischen 1,8 und 2,0 liegen (GLASEL, 1995). Die Messungen wurden mit dem BioPhotometer 6131 der Firma Eppendorf (Hamburg) durchgeführt.

Tab. 3.1: Faktoren zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

| Nukleinsäure | Konzentration ($A_{260}=1,0$) |
|-----------------|---------------------------------|
| dsDNA | ≅ 50 µg/ml |
| ssDNA | ≅ 37 µg/ml |
| Oligonukleotide | ≅ 30 µg/ml |
| RNA | ≅ 40 µg/ml |

3.5.3 Reverse Transkription

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) dient dazu, die Genexpression spezifischer Gene nachzuweisen.

Als Erstes wird RNA in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben. Dies wird als reverse Transkription (RT) bezeichnet (VERES et al., 1987). Durchgeführt wird die RT von RNA-abhängigen

DNA-Polymerasen, wobei ein Oligo-d(T)-Primer als Startpunkt für die Synthese dient. Dieser Primer ist in der Lage, an verschiedenen Stellen des RNA-Moleküls zu hybridisieren und somit über die gesamte Länge der DNA eine DNA-Synthese einzuleiten.

Für die RT wurde 1 µg RNA eingesetzt und zunächst mit 1 µl DNase I und 1 µl RNasin für 30 min bei 37°C und 3 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde ein Enzym-Mix (Tab. 3.2) hinzugegeben und der Ansatz bei 37°C für 60min inkubiert und schließlich bei 95°C für 10 min denaturiert. Die gewonnene cDNA konnte dann bei -20°C gelagert und als Matrize für die PCR verwendet werden.

Tab. 3.2: Enzym-Mix für die Reverse Transkription

| Material | Einsatz [µl] | Ausgangskonzentration |
|---------------------------|--------------|-----------------------|
| d(T) ₁₅ Primer | 8 | / |
| dNTP's | 4 | 10 mM |
| RT-Puffer | 8 | 5x |
| DTT | 4 | 100 mM |
| SuperScript II | 2 | / |

3.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt eine effiziente Methode zur spezifischen Amplifikation von Nukleinsäuren dar (MULLIS et al., 1986). Den Ausgangspunkt der DNA-Synthese bilden dabei zwei Oligonukleotide (Primer), welche die zu amplifizierende DNA-Sequenz (*template*) flankieren. Diese Primer binden an *sense* und *antisense* und bilden so den Startpunkt für eine hitzestabile DNA-Polymerase, welche durch Verknüpfung von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) den neuen DNA-Strang synthetisiert. Der PCR-Zyklus startet zunächst mit der Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95°C. Nach der Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge bei einer Primer-spezifischen Temperatur (*Annealing*-Temperatur) ist die DNA-Polymerase in der Lage, an diese zu binden und einen neuen DNA-Strang zu synthetisieren (Elongation). Das Temperaturoptimum der dabei verwendeten *Taq*-DNA-Polymerase, benannt nach dem Organismus

Thermus aquaticus (SAIKI et al., 1988), liegt bei 72°C. Mit der erneuten Denaturierung des neu gebildeten PCR-Produktes in seine Einzelstränge startet der nächste PCR-Zyklus. Somit wird durch zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte eine exponentielle Vervielfältigung der DNA erreicht. Die Amplifikation von L7, einem in allen Geweben exprimierten ribosomalen Protein, diente in der semiquantitativen PCR als Kontrolle. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese, welche anschließend dokumentiert und analysiert wurden.

Tab. 3.3: Reaktionsansatz einer Standard-PCR

| Material | Einsatz [μ l] | Ausgangskonzentration |
|------------------------|--------------------|-----------------------|
| H ₂ O | 11,1 | / |
| dNTPs | 1,2 | 1 mM |
| PCR-Puffer | 1,5 | 10x |
| DNA- <i>template</i> | 0,6 | 10-100 ng/ μ l |
| <i>forward</i> -Primer | 0,3 | 20 μ M |
| <i>reverse</i> -Primer | 0,3 | 20 μ M |
| <i>Taq</i> -Polymerase | 0,075 | 5 U/ μ l |
| Gesamtvolumen | 15 | / |

Tab. 3.4: PCR-Programmparameter

| Gen | Denaturierung | Annealing | Elongation | Zyklen |
|----------|---------------|------------|-------------|--------|
| L7 | 30 s, 94°C | 60 s, 54°C | 60 s, 72°C | 22 |
| GnRH-I R | 30 s, 94°C | 60 s, 60°C | 120 s, 72°C | 35 |

3.5.5 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich, DNA nach ihrer Größe in einer Matrix aus Agarose aufzutrennen (MCDONELL et al., 1977). Dabei wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren unter einer Gleichspannung zur positiv geladenen Anode. Kleine Moleküle wandern schneller als große, wodurch sich unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten ergeben. Zur Dokumentation werden die Nukleinsäure-Banden durch interkalierende Farbstoffe, wie z.B. Ethidiumbromid (EtBr), sichtbar gemacht. EtBr lagert sich

zwischen die Basen der DNA-Doppelhelix ein und fluoresziert unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302 nm.

Die Gele wurden mittels Agarose (1,5 %) hergestellt. Diese wurden in 1x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, gelöst und luftblasenfrei in eine Gelkammer mit gestecktem Kamm überführt. Das ausgehärtete Gel wurde dann in der Elektrophoresekammer mit 1x TBE-Puffer überschichtet und der Gelkamm gezogen. Anschließend wurden die DNA-Proben (10 µl) mit jeweils 2 µl 10x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Referenz diente ein DNA-Fragmentlängen-Standard (100 bp Ladder, Invitrogen).

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 85 V für ca. 45 min. Die Laufstrecke konnte anhand des im 10x DNA-Ladepuffer enthaltenen Farbstoffes Bromphenolblau abgeschätzt werden. Danach wurden die Gele in einem EtBr-Bad für ca. 20 min gefärbt, in ddH₂O gewaschen und die Ergebnisse im UV-Transilluminator mittels der BioDoc Analyze 2.1 Software (Biometra, Göttingen) dokumentiert und ausgewertet.

3.6 Proteinbiochemische Methoden

3.6.1 Präparation von Zelllysaten

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellpellets zweimal mit PBS gewaschen, bei 300 x g für 5 min zentrifugiert und anschließend in Zellysepuffer (CellLytic[®]-M) resuspendiert. Zusätzlich wurde ein Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich) zugegeben, um den Abbau der Proteine zu verhindern. Anschließend wurden die resuspendierten Pellets bei 4°C und 13000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand konnte nun abgenommen und eingefroren (-80°C) bzw. zur weiteren Proteinbestimmung verwendet werden.

3.6.2 Quantifizierung von Proteinen nach Bradford

Für die Proteinbestimmung wurde ein Bio-Rad Protein Assay nach der Methode von Bradford durchgeführt (BRADFORD, 1976). Dabei bilden die Seitenketten der Proteine Komplexe mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau (Bio-Rad). Dieser kann bei einem Absorptionsmaximum von 595 nm photometrisch detektiert werden. Das Absorptionsverhalten nimmt hierbei

linear mit der Proteinkonzentration zu. Unter Verwendung eines Standards in verschiedenen bekannten Konzentrationen (BSA ,bovines Serumalbumin) wurde eine Kalibrierungsgerade ermittelt. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau wurde im Verhältnis 1:5 mit H₂O verdünnt und filtriert. Die Zellysate wurden 1:20 mit H₂O verdünnt und 50 µl dieser Proben und des Standards mit 2,5 ml verdünnter Coomassie-Lösung versetzt. Danach wurden die Proben für 10-50 min inkubiert und von jedem Ansatz 350 µl in die Wells einer 96-Well-Platte gegeben. Diese wurde anschließend im Multidetektion Microplate Reader (BIO-TEK) bei $\lambda=595$ nm gemessen. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Im Überschuss zugesetztes SDS (*sodium dodecyl sulfate*) wird von den Proteinen gebunden und überdeckt deren Eigenladung durch Entstehung negativ geladener Mizellen. Diese negative Ladung ist proportional zum Molekulargewicht und ermöglicht eine Auftrennung der SDS-Protein-Komplexe in einer Gelmatrix. Bei der verwendeten Methode nach Laemmli werden die Proben zunächst in einem Sammelgel mit 5 % Polyacrylamid (Tab. 3.5) konzentriert und anschließend in einem Trenngel mit 10 % Polyacrylamid (Tab. 3.6) separiert (LAEMMLI, 1970).

Tab. 3.5: Zusammensetzung eines 5 %igen Sammelgels

| Material | Einsatz |
|--------------------------|---------|
| H ₂ O | 3,1 ml |
| Prosieve 50 Gel Solution | 0,5 ml |
| 1 mM Tris | 1,3 ml |
| 10 % SDS | 50 µl |
| 10 % APS | 50 µl |
| TEMED | 4 µl |

Tab. 3.6: Zusammensetzung eines 15 %igen Trenngels (Ansatz für 2 Gele)

| Material | Einsatz |
|------------------|---------|
| H ₂ O | 4,3 ml |

| | |
|--------------------------|-------------|
| Prosieve 50 Gel Solution | 3,0 ml |
| 1 mM Tris | 2,5 ml |
| 10 % SDS | 100 μ l |
| 10 % APS | 100 μ l |
| TEMED | 4 μ l |

Für die SDS-PAGE wurde die Mini-PROTEAN[®] III Elektrophorese Apparatur (Bio-Rad, München) verwendet und nach den Angaben des Herstellers aufgebaut. Nach Versetzen der Proben mit zweifach konzentriertem Laemmli-Probenpuffer und dreiminütigem Denaturieren bei 95°C wurde das Gel mit den Proben und dem Molekularmassenmarker (Precision Plus Protein[™] Standards, Bio-Rad) beladen. Die Elektrophorese erfolgte für 30 min bei 80 V_{const} und anschließend für 60 min bei 100 V_{const} in SDS-Elektrophorese-Puffer. Die aufgetrennten Proben wurden daraufhin auf Nitrocellulosemembranen transferiert.

3.6.4 Western Blot

Beim Western-Blot-Verfahren werden die aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulosemembranen transferiert (*blotting*) und durch Reaktion mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (TOWBIN et al., 1979).

Dafür wurde das Tank System der Firma Bio-Rad verwendet und nach den Angaben des Herstellers aufgebaut. Das SDS-Gel wurde luftblasenfrei auf die Nitrocellulosemembran (0,2 μ m, Hybond-ECL[®], GE Healthcare, Freiburg) aufgebracht und zwischen je zwei mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere (Whatman[®], Schleicher & Schuell, Dassel) gelegt. Dieses „Sandwich“ wurde zwischen zwei Schaumstoffschichten so in die Blottingapparatur eingespannt, dass die Nitrocellulosemembran der Anode zugewandt war. Der Transfer erfolgte für 60 min bei 100 V_{const}. Die Kontrolle der Transfereffizienz erfolgte mit Hilfe des vorgefärbten Molekularmassenmarkers.

3.6.5 Detektion und Visualisierung

Nach dem Transfer wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 60 min bei Raumtemperatur in *blocking*-Lösung inkubiert

und anschließend dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Die Membranen wurden dann über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach wiederholtem Waschvorgang mit TBST (dreimal 10 min) wurden die Membranen mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Visualisierung wurden die Membranen wiederholt dreimal für 10 min mit TBST gewaschen.

Zur Detektion der gebundenen Sekundärantikörper wurde der ECL (Enhanced Chemiluminescence Reaction) Kit Immobilon® Western (Millipore, Schwalbach) eingesetzt. Es kommt dabei zur katalytischen Umsetzung der enthaltenen Reagenz durch die Peroxidase. Dies wiederum führt zu einer Chemolumineszenz mit einem Maximum bei $\lambda=430$ nm. Dies ermöglicht die Belichtung von Röntgenfilmen. Hierfür wurden Röntgenfilme der Firma Kodak verwendet, die nach der Exposition in einer Röntgenfilmkassette (X-Ray GmbH) im XRay Film Prozessor SRS-101A (Konica) in einer Dunkelkammer entwickelt wurden.

3.6.6 *Strippen von Nitrocellulosemembranen*

Für die erneute Hybridisierung mit dem Primärantikörper wurden die verwendeten Nitrocellulosemembranen *gestrippt* und so von bereits gebundenen Antikörpern befreit. Dafür wurden die Membranen mit dem *Antibody Stripping Buffer* der Firma Uptima Interchim (Montluçon, F) für 15 min bei Raumtemperatur und 1000 rpm inkubiert, mit ddH₂O gespült, erneut geblockt und danach mit dem neuen Primärantikörper inkubiert. Dieser Vorgang wurde maximal zweimal pro Nitrocellulosemembran durchgeführt.

3.7 *Immunzytologischer Nachweis der GnRH-Rezeptor-Expression*

Für den immunzytologischen Nachweis der GnRH Rezeptor Expression wurden die Zellen in Lab-Tek™ Chamber Slide™ Systemen der Firma Nunc (Wiesbaden) ausgesät und 24 h kultiviert. Um freie Aldehydgruppen zu blockieren, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend 30 min mit 1 M Glycin inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBST für jeweils 15 min erfolgte eine Behandlung der Zellen mit PBSTN für 10 min zur zusätzlichen Abdeckung unspezifischer Proteinbindungen. Die Inkubation mit

dem Primärantikörper (polyclonal rabbit anti human GnRH Rezeptor; Gründker et al. (2004) Eur J Endocrinol 151: 141-149) erfolgte bei 4°C über Nacht. Danach wurden die Zellen mit PBST gewaschen und für 30 min mit PBSTN inkubiert. Für die Immunfärbung wurde der Rabbit Histostain®-SP Kit der Firma Zymed (South San Francisco, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Diaminobenzidin (DAB) Substrat-Chromogen System von Dako (Hamburg) diente dabei als Substrat.

3.8 Dokumentation und statistische Analysen

Die Western Blots wurden mit Hilfe der Kodak Digital Science 1D Image Analyse Software (Version 2.0.3) dokumentiert und analysiert. Zur Dokumentation und Auswertung der Agarosegele wurde der UV-Transilluminator von Biometra und die dazugehörige BioDoc Analyze 2.1 Software verwendet. Mit Hilfe der Software GraphPad Prism® (Version 5.0) erfolgte die graphische Auswertung der Ergebnisse sowie die statistische Auswertung. Alle Experimente wurden mindestens dreimal mit verschiedenen Passagen der jeweiligen Zelllinien durchgeführt. Die Daten wurden hinsichtlich ihrer signifikanten Unterschiede mittels *one-way* ANOVA und Newman Keuls-Test berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Effekte von AN-152 *in vitro*

4.1.1 GnRH-Rezeptor-Expression

Der Nachweis der GnRH-Rezeptor-Expression bei den beiden triple-negativen Mammakarzinomzelllinien HCC-1806 und HCC-1937 wurde mit Hilfe RT-PCR (Abb. 4.1) durchgeführt.

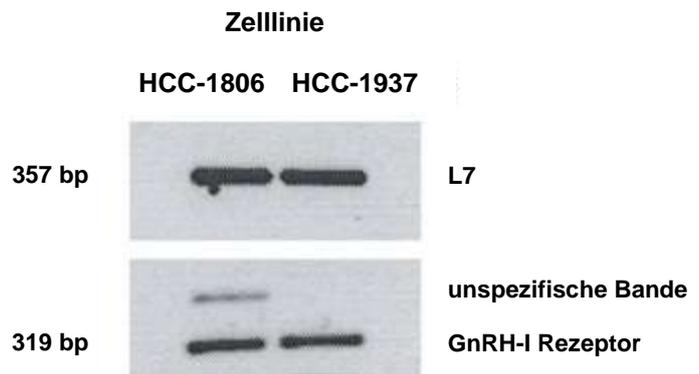


Abb. 4.1: GnRH-I-Rezeptor-Expression in HCC-1806 und HCC-1937. Mittels RT-PCR konnte die Expression von GnRH-I Rezeptoren (319 bp) auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Das *Housekeeping*-Gen L7 (357 bp) diente als Kontrolle. Bei den weiteren abgebildeten Signalen handelt es sich um unspezifische Banden.

In beiden Zelllinien zeigte sich eine Expression des GnRH-I Rezeptors. Auf Proteinebene konnte die Expression von GnRH-I Rezeptoren bei den triple-negativen Mammakarzinomzelllinien ebenfalls nachgewiesen werden.

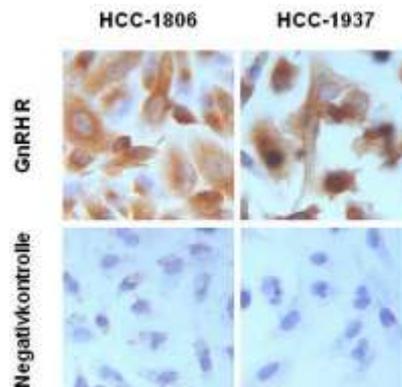


Abb. 4.2: Immunzytochemischer Nachweis der Proteinexpression des GnRH-Rezeptors in den Zelllinien HCC-1806 und HCC-1937. Die Proteinexpression von GnRH-Rezeptoren erfolgte durch immunzytologische Färbung der Zellen. Als Kontrolle wurde die Immunfärbung ohne Primärantikörper durchgeführt.

4.1.2 Alamar[®]Blue-Proliferationsassay

Die Bestimmung des Proliferationsverhaltens wurde mittels Alamar[®]Blue-Proliferationsassay durchgeführt und spektralphotometrisch ausgewertet. Die beiden Zelllinien HCC-1806 und HCC-1937 wurden hierfür mit steigenden Konzentrationen (1×10^{-11} M - 1×10^{-5} M) von AN-152 fünf Tage behandelt.

Bei der Behandlung der Mammakarzinomzelllinie HCC-1806 (Abb. 4.2) mit AN-152 konnte unter den Konzentrationen 1×10^{-11} M und 1×10^{-9} M AN-152 keine Hemmung der Proliferation gezeigt werden. Nach Behandlung mit 1×10^{-7} M AN-152 zeigte sich eine signifikante Verminderung der Zellzahl gegenüber der Kontrolle (= 100 %) auf $36,48 \pm 1,83$ % ($p < 0,001$). Unter einer Konzentration von 1×10^{-5} M AN-152 konnte ein maximaler Effekt mit einer Verringerung der Zellzahl auf $2,32 \pm 0,24$ % ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %) erzielt werden.

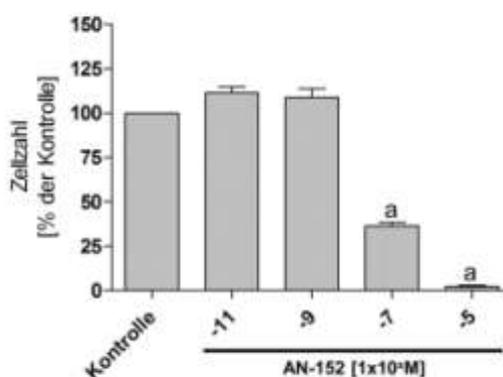


Abb. 4.3: Dosis-Wirkungs-Experiment auf die Zellproliferation der triple-negativen und GnRH-Rezeptor-positiven Mammakarzinomzelllinie HCC-1806 *in vitro*. Die Zellen wurden fünf Tage lang ohne (Kontrolle) sowie mit AN-152 in steigenden Konzentrationen inkubiert. Zellzahlen sind prozentual zur Kontrolle (100 %) angegeben. a, $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

Die Behandlung der Mammakarzinomzelllinie HCC-1937 (Abb. 4.3) mit 1×10^{-11} M und 1×10^{-9} M AN-152 führte zu keiner Verminderung der Zellzahl. Bei einer Konzentration von 1×10^{-7} M AN-152 konnte hingegen eine Hemmung der Proliferation auf $70,02 \pm 2,46$ % ($p < 0,001$) gegenüber der Kontrolle (= 100 %) nachgewiesen werden. Der größte Effekt war unter einer

Konzentration von 1×10^{-5} M AN-152 sichtbar. Die Zellzahl sank dabei auf $17,15 \pm 0,62$ % ($p < 0,001$) gegenüber der Kontrolle (= 100 %).

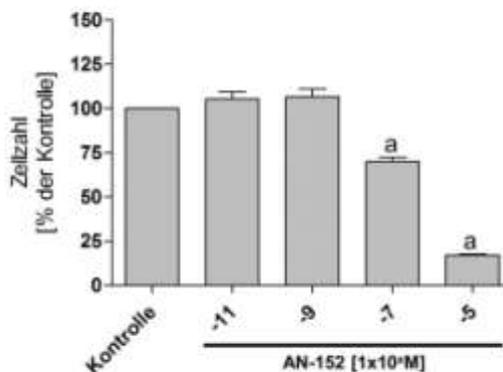


Abb. 4.4: Dosis-Wirkungs-Experiment auf die Zellproliferation der triple-negativen und GnRH-Rezeptor-positiven Mammakarzinomzelllinie HCC-1937 *in vitro*. Die Zellen wurden fünf Tage lang ohne (Kontrolle) sowie mit AN-152 in steigenden Konzentrationen inkubiert. Zellzahlen sind prozentual zur Kontrolle (100 %) angegeben. a, $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

4.1.3 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials

Mittels Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials wurde die Apoptoseinduktion durch AN-152 erfasst. Hierfür wurden die beiden Zelllinien HCC-1806 und HCC-1937 mit steigenden Konzentrationen (1×10^{-9} M und 1×10^{-7} M) von AN-152 über 72 h behandelt.

Die Behandlung der HCC-1806 Mammakarzinomzellen (Abb. 4.4) mit 1×10^{-9} M AN-152 zeigte eine tendenzielle Hemmung des mitochondrialen Membranpotentials auf $94,26 \pm 5,18$ % (n.s.) gegenüber der Kontrolle (= 100 %). Eine signifikante Hemmung des mitochondrialen Membranpotentials auf $70,24 \pm 1,08$ % ($p < 0,001$) gegenüber der Kontrolle (= 100 %) war bei einer Konzentration von 1×10^{-7} M AN-152 zu beobachten.

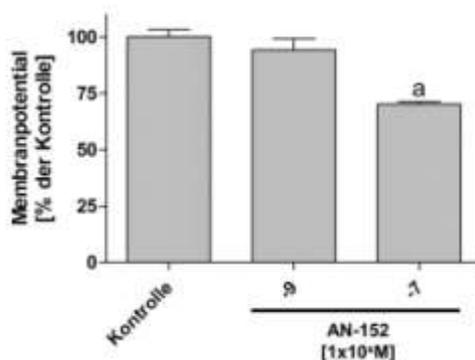


Abb. 4.5: Effekte von AN-152 auf die Apoptoseinduktion bei der triple-negativen und GnRH-Rezeptor-positiven Mammakarzinomzelllinie HCC-1806 *in vitro*. Das mitochondriale Membranpotential nach 72 h Behandlung ohne (Kontrolle) sowie mit AN-152 (1x10⁻⁹ M und 1x10⁻⁷ M) in Prozent. a, p<0,001 vs. Kontrolle.

Ähnliche Ergebnisse waren bei der Behandlung der Zelllinie HCC-1937 zu beobachten (Abb. 4.6). Bei einer Konzentration von 1x10⁻⁹ M AN-152 zeigte sich eine Hemmung des mitochondrialen Membranpotentials auf 92,92 ± 3,19 % (p<0,05) im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %). Bei Inkubation mit 1x10⁻⁷ M AN-152 konnte ein signifikanter Abfall des mitochondrialen Membranpotentials auf 87,75 ± 1,49 % (p<0,001) gegenüber der Kontrolle (= 100 %) nachgewiesen werden.

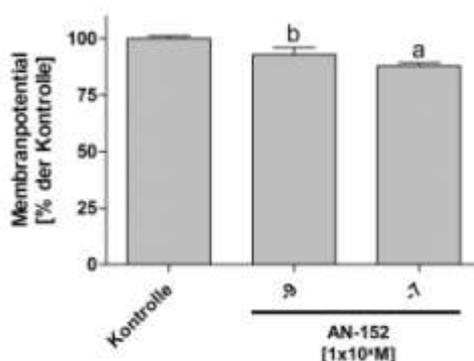


Abb. 4.6: Effekte von AN-152 auf die Apoptoseinduktion bei der triple-negativen und GnRH-Rezeptor-positiven Mammakarzinomzelllinie HCC-1937 *in vitro*. Das mitochondriale Membranpotential nach 72 h Behandlung ohne (Kontrolle) sowie mit AN-152 (1x10⁻⁹ M und 1x10⁻⁷ M) in Prozent. a, p<0,001 vs. Kontrolle; b, p<0,05 vs. Kontrolle.

4.1.4 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität mittels Western Blot

Um die Effekte einer durch AN-152 vermittelten Induktion von Apoptose zu ermitteln, wurde mittels Western Blot die Caspase-3-Aktivität bestimmt. Die Behandlung der beiden Zelllinien HCC-1806 und HCC-1937 (Abb. 4.6) erfolgte mit AN-152 in den Konzentrationen 2×10^{-6} M und 5×10^{-6} M über 24 h und 48 h. Dabei zeigte sich für die Behandlung mit 2×10^{-6} M als auch mit 5×10^{-6} M AN-152 bei beiden Zelllinien ein Anstieg der Caspase-3-Aktivität.

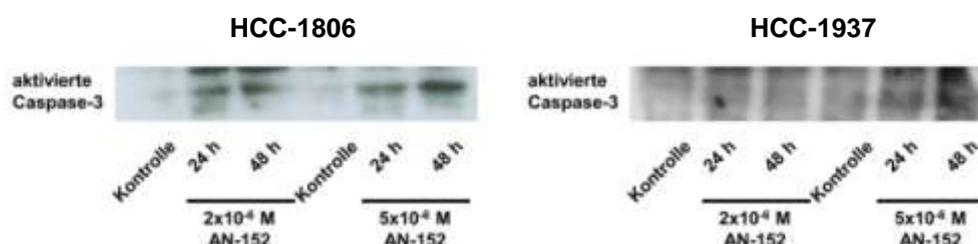


Abb. 4.7: Aktivierung der Caspase-3 durch AN-152. Für den Nachweis der Apoptoseinduktion konnte die Caspase-3-Aktivität bei den Zelllinien HCC-1806 und HCC-1937 mittels Western Blot nachgewiesen werden. Gezeigt wird ein signifikanter Anstieg der Bande bei 17 kDa, was dem Spaltprodukt aktivierter Caspase-3 entspricht. Bei der Kontrolle kommt es zu keinem Signal. Die Inkubation erfolgte über 24 h bzw. 48 h ohne (Kontrolle) sowie mit 2×10^{-6} M und 5×10^{-6} M AN-152.

4.2 Effekte von AN-152 *in vivo*

Um die Effekte von AN-152 im Rahmen einer Tumorthherapie zu zeigen, wurden thymusdefizienten Nacktmäusen humane triple-negative Brustkrebszellen subkutan transplantiert und nach einem definierten Zeitplan behandelt. Hierfür wurde die Mammakarzinomzelllinie HCC-1806 verwendet, welche sich durch ein schnelles und aggressives Tumorwachstum *in vivo* auszeichnet. Für HCC-1937 hingegen konnte schon in der Vergangenheit gezeigt werden, dass sich diese Zelllinie nicht für ein Tumormodell in der Maus eignet (SEVIGNANI et al., 2003; BUCHHOLZ et al., 2009). Als Ersatz wurde die triple-negative Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 verwendet. Die tumortragenden weiblichen Nacktmäuse (CD1 nu/nu) wurden entweder ohne (Kontrolle) oder mit jeweils 60 nmol Doxorubicin oder AN-152 durch i.p. Injektion behandelt. Dies wurde alle drei Tage wiederholt (Tag 0, 3, 6, 9, 12).

Zur Erfassung des Tumorwachstums wurde alle drei Tage das Tumolvolumen bestimmt und über einen Zeitraum von 15 Tagen dokumentiert (Abb. 4.7 und Abb. 4.8). Während des gesamten Behandlungszeitraums wurden keine Nebenwirkungen beobachtet.

4.2.1 Xenotransplantation von HCC-1806

Nach dem dritten Behandlungstag war das Tumolvolumen in der mit AN-152 behandelten Gruppe auf $105,7 \pm 4,8 \%$ ($p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe am dritten Tag) des Initialvolumens (= 100 %) angestiegen. Im Vergleich stieg das Tumolvolumen in der Kontrollgruppe gegenüber dem Initialvolumen (= 100 %) allerdings auf $165,9 \pm 6,0 \%$ an. Bei der mit Doxorubicin behandelten Gruppe zeigte sich eine Inhibition des Wachstums bei gemessenen Tumorumfängen von $114,1 \pm 4,3 \%$ ($p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe am dritten Tag) vom Ausgangsvolumen (= 100 %).

Am sechsten Behandlungstag war das Tumolvolumen im Vergleich zum Initialvolumen (= 100 %) bei der mit AN-152 behandelten Gruppe signifikant auf $97,7 \pm 8,0 \%$ ($p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe am sechsten Tag; $p < 0,01$ gegenüber der mit Doxorubicin behandelten Gruppe am sechsten Tag) reduziert. Dies entspricht ca. einem Drittel des Tumorumfanges gegenüber der Kontrollgruppe, bei welcher das Tumolvolumen auf $316,1 \pm 19,5 \%$ gegenüber dem Ausgangsvolumen (= 100 %) anstieg. Das Tumolvolumen der mit Doxorubicin behandelten Gruppe stieg auf $190,9 \pm 20,2 \%$ ($p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe am sechsten Tag) vom Initialvolumen (= 100 %) an und entspricht gerade mal zwei Drittel des Tumorumfanges der Kontrollgruppe.

Nach dem neunten und zwölften Behandlungstag konnte bei der mit AN-152 behandelten Gruppe eine weitere Reduktion des Tumorumfanges auf $93,5 \pm 7,3 \%$ (Tag 9; $p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe am neunten Tag; $p < 0,001$ gegenüber der mit Doxorubicin behandelten Gruppe am neunten Tag) vom Initialvolumen (= 100 %) bzw. auf $86,9 \pm 5,6 \%$ (Tag 12; $p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe am zwölften Tag; $p < 0,001$ gegenüber der mit Doxorubicin behandelten Gruppe am zwölften Tag) beobachtet werden. Dabei stieg das Tumolvolumen, verglichen zum Ausgangsvolumen (= 100 %), in der Kontrollgruppe am neunten Tag auf $588,9 \pm 47,9 \%$ und am

zwölften Tag auf $1017 \pm 96,8$ % an. Bei der Ermittlung der Tumorzumina der mit Doxorubicin behandelten Gruppe zeigte sich erneut eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums auf $320 \pm 25,7$ % (Tag 9; $p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe am neunten Tag) und auf $486,7 \pm 20,2$ % (Tag 12; $p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe am zwölften Tag).

Am 15. Tag war das Tumorzumina bei der mit AN-152 behandelten Gruppe vom Ausgangsvolumen (= 100 %), auf $88,0 \pm 9,7$ % ($p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe am 15. Tag; $p < 0,001$ gegenüber der mit Doxorubicin behandelten Gruppe am 15. Tag) signifikant reduziert. Bei der Kontrollgruppe hingegen stieg das Tumorzumina auf insgesamt $1420 \pm 77,6$ % vom Ausgangsvolumen (= 100 %) an, dem 16-fachen des Tumorzumina der mit AN-152 behandelten Gruppe. Es zeigte sich demnach nicht nur eine signifikante Proliferationshemmung, sondern vielmehr eine signifikante Reduktion des Tumorzumina unter der Behandlung mit AN-152. Des Weiteren zeigte sich nach 15 Tagen bei der mit Doxorubicin behandelten Gruppe ein Anstieg des Tumorzumina auf $716,0 \pm 43,1$ % ($p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe am 15. Tag) vom Initialvolumen (= 100 %). Dies entspricht etwa 50 % des Tumorzumina der Kontrollgruppe am 15. Tag und damit einer signifikanten Proliferationshemmung.

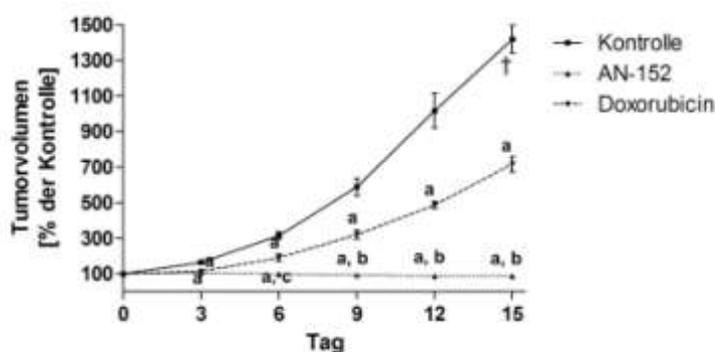


Abb. 4.8: Tumorzumina nach Xenotransplantation von HCC-1806-Brustkrebszellen in Nacktmäuse unter Behandlung mit AN-152 und Doxorubicin. Die Mäuse wurden ohne (Kontrolle), mit 60 nmol Doxorubicin oder mit 60 nmol AN-152 alle drei Tage behandelt (Tag 0, 3, 6, 9 und 12). Das Tumorzumina wurde an den Tagen 0, 3, 6, 9, 12 und 15 bestimmt. Die Tiere waren in Gruppen von fünf Mäusen eingeteilt. a, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; b, $p < 0,001$ vs. mit Doxorubicin behandelte Gruppe; c, $p < 0,01$ vs. mit Doxorubicin behandelte Gruppe.

4.2.2 Xenotransplantation von MDA-MB-231

Am dritten Behandlungstag war das Tumolvolumen in der mit AN-152 behandelten Gruppe auf $84,8 \pm 7,6 \%$ ($p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe) des Initialvolumens (= 100 %) signifikant reduziert. Im Vergleich stieg das Tumolvolumen in der Kontrollgruppe gegenüber dem Initialvolumen (= 100 %) auf $164,1 \pm 10,5 \%$ an. Bei der mit Doxorubicin behandelten Gruppe kam es zu einem Anstieg des Tumorzvolumens auf $110,2 \pm 5,4 \%$ vom Ausgangsvolumen (= 100 %; $p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe am dritten Tag).

Im Verlauf reduzierte sich das Tumorzvolumen der mit AN-152 behandelten Gruppe weiter. So zeigte sich am sechsten Behandlungstag ein signifikanter Abfall des Tumorzvolumens auf $75,3 \pm 10,6 \%$ ($p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe und $p < 0,05$ gegenüber der mit Doxorubicin behandelten Gruppe am sechsten Tag). Im Vergleich stieg das Tumorzvolumen der Kontrollgruppe auf $267,2 \pm 18,2 \%$ zum Initialvolumen (= 100 %). Des Weiteren konnte eine signifikante Hemmung der Proliferation der mit Doxorubicin behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden. Das Tumorzvolumen war am sechsten Tag auf $124,8 \pm 6,1 \%$ ($p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe) angestiegen und somit signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe.

Die am neunten Tag ermittelten Tumorzvolumina der mit AN-152 behandelten Gruppe waren ebenfalls signifikant auf $70,0 \pm 11,7 \%$ ($p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe und $p < 0,001$ gegenüber der mit Doxorubicin behandelten Gruppe am neunten Tag) vermindert. Nach dem zwölften Tag betrug das Tumorzvolumen bei der mit AN-152 behandelten Gruppe $72,6 \pm 16,0 \%$ ($p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe und $p < 0,001$ gegenüber der mit Doxorubicin behandelten Gruppe am zwölften Tag) vom Ausgangsvolumen (= 100 %).

In der Kontrollgruppe wurde am neunten Tag ein Tumorzvolumen von $415,8 \pm 15,1 \%$ vom Ausgangsvolumen (= 100 %) ermittelt. Ein weiterer Anstieg des Tumorzvolumens auf $620,8 \pm 33,3 \%$ vom Initialvolumen (= 100 %) konnte am zwölften Tag gemessen werden.

Bei der mit Doxorubicin behandelten Gruppe zeigte sich weiterhin eine signifikante Hemmung des Tumorzwachstums ausgehend vom

Initialvolumen (= 100 %). Die gemessenen Volumina betrugen am neunten Tag $206,7 \pm 11,8$ % ($p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe am neunten Tag) bzw. am zwölften Tag $305,4 \pm 33,2$ % ($p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe am zwölften Tag).

Nach der Behandlungsdauer von 15 Tagen entsprach das Tumorumen bei der mit AN-152 behandelten Gruppe $72,4 \pm 18,7$ % ($p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe und $p < 0,001$ gegenüber der mit Doxorubicin behandelten Gruppe am 15. Tag) vom Initialvolumen (= 100 %). Dies entspricht ca. 8 % des Tumorumens der Kontrollgruppe gemessen am 15. Tag und damit einer signifikanten Hemmung der Proliferation als auch einer signifikanten Reduktion des Tumorumens unter der Behandlung mit AN-152. Das Tumorumen stieg in der Kontrollgruppe auf $890,0 \pm 53,4$ % vom Ausgangsvolumen (= 100 %). Bei der mit Doxorubicin behandelten Gruppe wurde am 15. Tag ein Anstieg des Tumorumens vom Initialvolumen (= 100 %) von $459,6 \pm 45,7$ % ($p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe am 15. Tag) gemessen. Dies entspricht ca. 50 % der ermittelten Volumina der Kontrollgruppe am 15. Tag und damit einer signifikanten Proliferationshemmung unter Doxorubicin. Allerdings waren die Tumorumen gegenüber der mit AN-152 behandelten Gruppe um ca. 600 % höher.

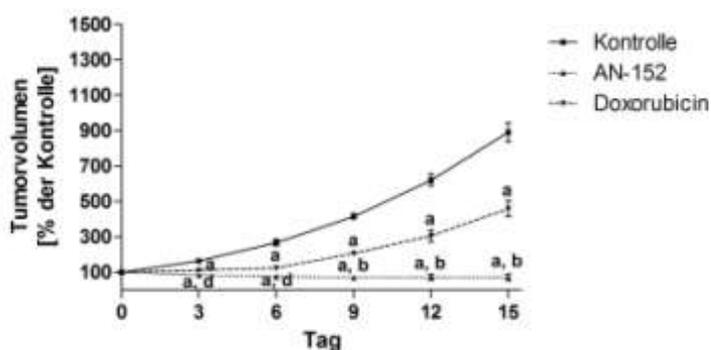


Abb. 4.9: Tumorumen nach Xenotransplantation von MDA-MB-231-Brustkrebszellen in Nacktmäuse unter Behandlung mit AN-152 und Doxorubicin. Die Mäuse wurden ohne (Kontrolle), mit 60 nmol Doxorubicin oder mit 60 nmol AN-152 alle drei Tage behandelt (Tag 0, 3, 6, 9 und 12). Das Tumorumen wurde an den Tagen 0, 3, 6, 9, 12 und 15 bestimmt. Die Tiere waren in Gruppen von fünf Mäusen eingeteilt. a, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; b, $p < 0,001$ vs. mit Doxorubicin behandelte Gruppe; d, $p < 0,05$ vs. mit Doxorubicin behandelte Gruppe.

5 Diskussion

Das triple-negative Mammakarzinom ist durch die fehlende Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren als auch einer fehlenden Überexpression des HER2/neu-Rezeptors charakterisiert (DENT et al., 2007; GLUZ et al., 2009). Es zeichnet sich klinisch durch eine höhere Aggressivität aus und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert.

Bei verschiedenen gynäkologischen Tumoren war es bereits möglich, die Expression von GnRH-I Rezeptoren nachzuweisen. Als Teil eines negativen, autokrinen Regulationssystems der Zellproliferation (EMONS et al., 2000) führt dabei, anders als beim hypophysären GnRH-Rezeptor, eine G-Protein- α_i -vermittelte Aktivierung der Posphotyrosinphosphatase (PTP) zur Inhibierung von Wachstumsfaktorrezeptoren (EMONS et al., 1997; GRÜNDKER et al., 2001).

In humanen Brustkrebszellen wurde bereits eine Expression des GnRH-Rezeptors in 52 – 64 % nachgewiesen (FEKETE et al., 1989; BAUMANN et al., 1993; MORIYA et al., 2001). Im Zusammenhang mit der aus dieser Arbeit entstandenen Publikation wurden 42 triple-negative humane Mammakarzinomgewebe auf GnRH-Rezeptor Expression untersucht. Davon waren 31 (73,8 %) positiv für die Expression von GnRH-Rezeptoren. Von diesen 31 GnRH-Rezeptor-positiven Geweben zeigten 22 (71 %) eine GnRH-Rezeptor-Antigenität in 100 % der Tumorzellen. In einer anderen Untersuchung humaner triple-negativer Brustkrebszellen konnte bei allen Geweben (n=16) die Expression von GnRH-Rezeptoren nachgewiesen werden (BUCHHOLZ et al., 2009). In anderen Organen, ausgenommen die Reproduktionsorgane oder die Stammzellen der Hämatopoese, konnte eine GnRH-Rezeptor-Expression nicht nachgewiesen werden (GRÜNDKER et al., 2002b).

Die Expression von GnRH-Rezeptoren stellt eine Möglichkeit dar, in Tumorzellen Apoptose zu induzieren. In der Vergangenheit konnte bereits an humanen GnRH-Rezeptor-positiven Ovarial-, Mamma- und Endometriumkarzinomzellen eine durch AN-152 verursachte Induktion des apoptotischen Zelltodes *in vitro* als auch eine Hemmung der

Tumorproliferation *in vivo* nachgewiesen werden (GRÜNDKER, 2000; WESTPHALEN et al., 2000; GRÜNDKER et al., 2002b). Grundlage ist die selektive GnRH-Rezeptor-vermittelte Aufnahme von AN-152 in die Zelle. Doxorubicin hingegen diffundiert über die Zellmembranen in die Zelle und akkumuliert im Zellkern durch Interkalation in die DNA. So konnte Doxorubicin schon wenige Minuten nach Verabreichung in den Zellkernen GnRH-Rezeptor-positiver als auch GnRH-Rezeptor-negativer Zelllinien nachgewiesen werden (SINHA und POLITI, 1990; DAVIES et al., 1996).

Die Induktion von Apoptose durch AN-152 ist unabhängig vom MDR-1 (*multidrug resistance-1*)-System. Normalerweise wird die Multi-Wirkstoff-Resistenz durch das lipophile Doxorubicin induziert. Dies wiederum führt zu einer primären oder sekundären Chemoresistenz. Die GnRH-Rezeptor-vermittelte Aufnahme von AN-152 in die Zelle ermöglicht die Verhinderung einer Chemoresistenz maligner Zellen gegenüber Anthrazyklinen, selbst bei schon bestehender Resistenz gegen Doxorubicin (GÜNTHERT et al., 2004a; GÜNTHERT et al., 2004b). AN-152 könnte somit auch für das triple-negative Mammakarzinom ein geeignetes Medikament für eine effiziente und nebenwirkungsarme Chemotherapie darstellen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwiefern AN-152 die Proliferation an den hier verwendeten Zelllinien HCC-1806, HCC-1937 und MDA-MB-231 beeinflusst. Mittels RT-PCR und immunzytochemischen Nachweises konnte zunächst die Expression von GnRH-I Rezeptoren bei beiden Zelllinien gezeigt werden. Die Bindungsaffinität von AN-152 wurde bereits an den GnRH-Rezeptor-positiven Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 untersucht. Der bei AN-152 als Transporter fungierende GnRH-I-Agonist [D-Lys⁶]GnRH ist durch eine hohe Bindungsaffinität in der Lage, GnRH dosisabhängig vom Rezeptor zu verdrängen (HALMOS et al., 1999).

5.1 Effekte von AN-152 *in vitro*

Die Internalisierung von AN-152 in die Zellen humaner Ovarial- und Endometriumkarzinome konnte bereits gezeigt und eine damit verbundene

Hemmung der Proliferation beobachtet werden (MIYAZAKI et al., 1997; WESTPHALEN et al., 2000). Dies lässt vermuten, dass sich das Proliferationsverhalten GnRH-Rezeptor-positiver Mammakarzinomzellen ähnlich beeinflussen lässt wie bei anderen gynäkologischen Karzinomen mit GnRH-Rezeptor-Expression. Bei den durchgeführten zeit- und dosisabhängigen Alamar[®]Blue-Proliferationsassays konnte eine signifikante Hemmung der Proliferation bei einer Konzentration von 1×10^{-7} M sowie 1×10^{-5} M AN-152 erzielt werden. Um eine Induktion von Apoptose durch AN-152 nachzuweisen, wurden zum einen Bestimmungen des mitochondrialen Membranpotentials durchgeführt und zum anderen mittels *Western Blot* die Effektor-Caspase Caspase-3 bestimmt.

Zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials wurde der elektrochemische Gradient mit Hilfe des lipophilen, kationischen Fluoreszenzfarbstoffes JC-1 bestimmt. Ein signifikanter Abfall des mitochondrialen Membranpotentials konnte bei der Zelllinie HCC-1806 bei einer Konzentration von 1×10^{-7} M AN-152 beobachtet werden. Dies zeigt, dass AN-152 in der Lage ist, den intrinsischen Signalweg der Apoptose zu induzieren. Ausgelöst durch zellulären als auch chemisch/toxischen Stress, führt dies zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials.

Bei der Detektion des mitochondrialen Membranpotentials werden allerdings auch nekrotische Zellen erfasst. Diese gilt es auszuschließen, da sie nicht durch Apoptose zugrunde gegangen sind. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde die Effektor-Caspase (*cysteine-containing aspartate-specific proteinase*), Caspase-3-Aktivität mittels *Western Blot* bestimmt und analysiert. Caspase-3 wird bei der Induktion von Apoptose zum einen über den intrinsischen (mitochondriale Signalkaskade) und zum anderen über den extrinsischen Weg (die so genannte Todesrezeptor-Signalkaskade) aktiviert (KUMAR, 2007). Die Aktivierung der Caspase-3 konnte bereits bei der Behandlung mit GnRH-Analoga nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe um Pareek et al. konnte durch Behandlung männlicher Keimzellen mit dem GnRH-Antagonisten Cetrorelix eine Induktion des intrinsischen Signalweges zeigen. Dies führte zu einer mitochondrialen Cytochrom-C-Freisetzung und einem Anstieg der Caspase-3-Aktivität. Außerdem wurden neben dem intrinsischen Signalweg über einen signifikanten Anstieg proapoptotischer

Faktoren wie Fas und Bax auch der extrinsische Signalweg induziert (PAREEK et al., 2007). Ähnliche Ergebnisse konnten bei Ovarial-, Endometrium- und Mammakarzinomen unter der Behandlung mit neu entwickelten GnRH-II-Antagonisten erzielt werden. Auf der Grundlage der Inhibierung der MAPK-Aktivität durch eine GNRH-I- und GnRH-II-Agonisten-vermittelte Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors (GRÜNDKER et al., 2001) konnte eine zeitabhängige Aktivierung der stressinduzierten MAPK p38 und JNK nachgewiesen werden. Dies resultierte in einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und einer Aktivierung der Caspase-3 (FISTER et al., 2007; FISTER et al., 2009).

In dieser Arbeit konnte eine zeitabhängige Induktion von Apoptose bei der Behandlung der Zelllinien HCC-1806 und HCC-1937 mit AN-152 nachgewiesen werden. Kidd et al. konnten eine durch AN-152-induzierte Aktivierung der Caspase-3 bei GnRH-Rezeptor-positiven atypischen Karzinoid-Tumoren der Lunge nachweisen. Dabei zeigte sich für AN-152 eine höhere Potenz zur Aktivierung der Caspase-3 als für Doxorubicin. Außerdem konnte eine signifikante Verminderung lebender Zellen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (KIDD et al., 2008). Des Weiteren konnte bereits an GnRH-Rezeptor-positiven Mammakarzinomzelllinien die Induktion von Apoptose durch AN-152 nachgewiesen werden. Diese erfolgte unabhängig von MDR-1 und war, verglichen mit Doxorubicin, in drei von vier Mammakarzinomzelllinien stärker ausgeprägt (GÜNTHERT et al., 2004a).

5.2 Effekte von AN-152 *in vivo*

Um die *in vitro* erzielten antiproliferativen und apoptoseinduzierenden Effekte *in vivo* zu bestätigen, wurden die Effekte von Doxorubicin und AN-152 an xenotransplantierten CD-1-nu/nu-Mäusen untersucht. Da die Zelllinie HCC-1937 für ein Tumormodell in der Maus ungeeignet ist (SEVIGNANI et al., 2003; BUCHHOLZ et al., 2009), wurden die beiden Zelllinien HCC-1806 und MDA-MB-231 verwendet. Bei HCC-1806 handelt es sich um eine aggressive Zelllinie, welche sich durch ein sehr gutes Tumorstadium *in vivo* auszeichnet und sich somit hervorragend für das Tumormodell eignet. Die tumortragenden Mäuse wurden über einen Zeitraum von 15 Tagen entweder mit AN-152 oder Doxorubicin behandelt. Im Vergleich zu den

Kontrollgruppen (welche nicht behandelt wurden) war das Tumorwachstum in den mit Doxorubicin behandelten Gruppen signifikant geringer. Gegenüber den mit Doxorubicin behandelten Gruppen allerdings war das Tumorwachstum unter AN-152 signifikant geringer. Dabei zeigte sich für die mit AN-152 behandelten Mäuse nicht nur eine signifikante Reduzierung, sondern vielmehr ein Stillstand des Tumorwachstums. Die Behandlung mit AN-152 führte im Vergleich zu Doxorubicin zu einer signifikant stärkeren Proliferationsinhibierung. Des Weiteren konnte durch die Induktion von Apoptose eine Verminderung des Tumorumfanges nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Arbeitsgruppe Gründker et al. bereits bei GnRH-Rezeptor-positiven Endometrium- und Ovarialkarzinomzellen. Xenotransplantierte thymusdefiziente Mäuse wurden mit 300nmol/20g bzw. 700nmol/20g Doxorubicin und AN-152 über einen definierten Zeitraum behandelt. Hierbei zeigten sich ein unter Doxorubicin signifikant vermindertes Tumorwachstum und ein Rückgang des initialen Tumorumfanges in der mit AN-152 behandelten Gruppe (GRÜNDKER et al., 2002b). Des Weiteren wurde auf der Grundlage der selektiven Rezeptor-vermittelten Aufnahme von AN-152 in GnRH-rezeptorpositiven Zellen die Wirkung von AN-152 an der GnRH-Rezeptor-negativen Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 untersucht (WESTPHALEN et al., 2000). AN-152 konnte erwartungsgemäß in den Zellkernen nicht nachgewiesen werden, noch konnte ein Antitumoreffekt *in vivo* beobachtet werden (GRÜNDKER et al., 2002b).

In einer Phase-I-Studie in der Arbeitsgruppe um Emons et al. wurde die Wirkung von AN-152 bei 17 Patientinnen mit fortgeschrittenem therapierefraktären Ovarial-, Tuben-, Endometrium- oder Mammakarzinom untersucht. Alle Patientinnen waren voroperiert und zum Teil mit systemischer Chemotherapie vorbehandelt. Vier Patientinnen wurden *low-dose* mit je 10, 20, 40 und 80 mg/m² AN-152 mindestens einmal behandelt. Diese wurden im Verlauf allerdings aus der Studie entlassen, da alle vier Patientinnen nach zwei Behandlungszyklen ein fortschreitendes Tumorwachstum aufwiesen. Eine Gruppe von sechs Patientinnen wurde mit jeweils 160 mg/m² AN-152 und eine weitere Gruppe von sieben Patientinnen mit je 267 mg/m² AN-152 behandelt. Die Behandlung wurde in maximal sechs Zyklen durchgeführt und von allen Patientinnen gut vertragen. Bei

sieben Patientinnen aus den Gruppen mit 160 mg/m^2 und 267 mg/m^2 AN-152 konnte eine Stabilisierung oder Remission beobachtet werden. Alle anderen aus beiden Gruppen zeigten ein progressives Tumorwachstum. Zu erklären ist dies zum einen durch die Anzahl der Behandlungseinheiten. Eine Stabilisation bzw. Remission konnte ausschließlich bei einer Zyklanzahl von mehr als fünf beobachtet werden. Zum anderen wiesen die Tumorzellen der Patientinnen mit Remission eine hohe Expression von GnRH-Rezeptoren auf. Tumorzellen der Patientinnen mit Stabilisierung der Erkrankung und einer hohen Anzahl an Behandlungszyklen zeigten hingegen in nur 20 - 30 % eine Expression von GnRH-Rezeptoren. Fazit der Studie ist, neben der empfohlenen Dosis von 267 mg/m^2 AN-152 und einer antiemetischen Prophylaxe, die Ausweitung der Studie auf ein größeres Patientenkollektiv zur Verifizierung der Ergebnisse (EMONS et al., 2010b).

Im Jahre 2012 stellten Emons et al. eine Phase-II-Studie vor, in welcher Patientinnen mit GnRH-Rezeptor-positivem Endometriumkarzinom mit AN-152 behandelt wurden. In dieser Patientengruppe, Altersmedian 68 Jahre, waren insgesamt 27 Patientinnen mit fortgeschrittenem und 16 Patientinnen mit rezidivierendem Endometriumkarzinom. Die GnRH-Rezeptor-Expression der Tumorzellen variierte dabei von 30-90 %. Teilweise waren die Patientinnen mit Radiotherapie oder Chemotherapie, Platin oder Taxanen (nicht mit Anthrazyklinen), vorbehandelt. Histologisch konnten diese in endometrioiden Adenokarzinomen (73 %) und serösen Endometriumkarzinomen (19 %) differenziert werden. Das Ziel war die Behandlung mit 267 mg/m^2 AN-152 alle drei Wochen in sechs Zyklen. Insgesamt wurden 43 Patientinnen mit AN-152 behandelt, von denen 28 (62,8 %) die vollen sechs Zyklen behandelt wurden und bei 2 Patientinnen die Behandlung auf 8 Zyklen ausgedehnt wurde. Zwei der behandelten Patientinnen erlangten eine komplette Remission (CR, *Complete Response*) und zehn eine partielle Remission (PR, *Partial Response*), insgesamt 31 % der behandelten. Bei 17 der behandelten (43 %) wurde eine Stabilisierung der Erkrankung (SD, *Stable Disease*) festgestellt (von den acht mit Chemotherapie vortherapierten Patientinnen erreichten eine CR, eine PR und zwei SD). Ein klinischer Nutzen wurde demnach bei 74 % der mit AN-152 behandelten Patientinnen nachgewiesen. Die Gesamtüberlebenszeit

nach der Behandlung mit AN-152 ist gleich der moderner Kombinationschemotherapien, allerdings bei deutlich geringerer Toxizität (EMONS et al., 2012).

Während der Dauer der Behandlung mit AN-152 konnten bei den xenotransplantierten Mäusen keine Nebenwirkungen festgestellt werden. In der Arbeit von Gründker et al. (2002) konnten unter der Behandlung mit einer Höchstdosis von 700 nmol/20g AN-152 keine Nebenwirkungen festgestellt werden, während bei gleicher Dosis Doxorubicin mehr als 50 % der Tiere starben. Nach Reduktion der Dosis auf 300 nmol/20 g Doxorubicin überlebten alle Tiere den Behandlungszeitraum. Allerdings zeigten diese Veränderungen des Hautkolorits und einen Gewichtsverlust. AN-152 zeigte unter äquimolarer Dosis (zu Doxorubicin) eine stärkere Inhibierung des Tumorwachstums bei geringerer Toxizität (GRÜNDKER et al., 2002b). Emons et al. konnten in ihrer Phase-I-Studie unter AN-152 lediglich einen leichten hämatotoxischen Effekt beobachten. Dieser äußerte sich hauptsächlich in einer Neutropenie und Leukopenie. Selbst für die Höchstdosis AN-152 von 267 mg/m² konnten keine stärkeren Nebenwirkungen beobachtet werden (EMONS et al., 2010b). In der von Emons et al. vorgestellten Phase-II-Studie wurden bei ca. 60 % der Behandelten hämatotoxische Nebenwirkungen in Form von Neutropenie, Anämie oder Leukopenie nachgewiesen. Diese waren aber reversibel. Kardiotoxische Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet (EMONS et al., 2012).

Der Einsatz von GnRH-Agonisten und GnRH-Antagonisten ist in der Krebs- und Endometrioseetherapie mittlerweile weitverbreitet. Ihre Wirkung erzielen sie dabei durch die Herunterregulierung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse und der daraus resultierenden medizinischen Kastration. Das triple-negative Mammakarzinom ist allerdings gegenüber einer Östrogendeprivation unempfindlich. Durch den Einsatz Doxorubicin-gebundener GnRH-Analoga ist es möglich, auch diese Tumorzellen effektiv anzugreifen. Allerdings ist dabei die Expression des GnRH-Rezeptors ausschlaggebend. Um die Wirkung von AN-152 zu

verifizieren, ist es außerdem nötig, diese an einem größeren Patientenkollektiv zu untersuchen. Ein weiterer Schritt dahingehend ist eine aktuell laufende Phase-II-Studie an Patientinnen mit fortgeschrittenem und vortherapiertem Platin- und Taxan-resistentem GnRH-Rezeptor-positivem Ovarialkarzinom (EMONS et al., 2010a).

6 Zusammenfassung

Die Suche nach einer geeigneten Therapie gegen das Mammakarzinom beschäftigt die Medizin seit Jahrzehnten. Die seit der Arbeit von Beatson bis heute errungenen Erkenntnisse in der endokrinen Therapie umfassen ein breites Spektrum an Möglichkeiten, sind allerdings unwirksam beim triple-negativen Mammakarzinom (BEATSON, 1896). Mittlerweile gibt es eine Reihe spezifischer Chemotherapeutika, welche allerdings durch ihre hohe Toxizität schwere Nebenwirkungen hervorrufen können. Durch eine gezielte rezeptorvermittelte Therapie ist es möglich, Tumorzellen direkt zu erreichen, ohne dabei gesundes Gewebe zu schädigen.

In der Vergangenheit konnte in verschiedenen Arbeiten ein wachstumsinhibierender und apoptoseinduzierender Effekt von AN-152 an gynäkologischen Tumoren nachgewiesen werden. In dieser Arbeit konnte ein Antitumoreffekt von AN-152 am triple-negativen Mammakarzinom gezeigt werden. An Zelllinien des triple-negativen Mammakarzinoms wurde *in vitro* als auch *in vivo* gezielt das Tumorstadium inhibiert und Apoptose induziert. Dabei konnte durch Behandlung mit AN-152 die Proliferation signifikant gesenkt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass AN-152 in der Lage ist, den intrinsischen Signalweg der Apoptose zu induzieren. Ausgelöst durch zellulären als auch chemisch/toxischen Stress kommt es zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Des Weiteren konnte die Aktivierung der Effektor-Caspase-3, welche wiederum zur Induktion von Apoptose führt, nachgewiesen werden. Bei den *in-vivo*-Experimenten konnten keine durch AN-152 verursachten Nebenwirkungen festgestellt werden. AN-152 stellt damit die Möglichkeit eines wirkungsvollen und nebenwirkungsarmen Chemotherapeutikums für die Therapie des triple-negativen Mammakarzinoms dar.

7 Literaturverzeichnis

- Ahmed, S A, Gogal, R M, Jr. & Walsh, J E (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**, 211-24.
- Amoss, M, Burgus, R, Blackwell, R, Vale, W, Fellows, R & Guillemin, R (1971): Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem Biophys Res Commun*, **44**, 205-10.
- Antoniou, A C & Easton, D F (2006): Risk prediction models for familial breast cancer. *Future Oncol*, **2**, 257-74.
- Baumann, K H, Kiesel, L, Kaufmann, M, Bastert, G & Runnebaum, B (1993): Characterization of binding sites for a GnRH-agonist (buserelin) in human breast cancer biopsies and their distribution in relation to tumor parameters. *Breast Cancer Res Treat*, **25**, 37-46.
- Beatson, G T (1896): On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *The Lancet*, **148**, 104-107.
- Bloom, H J & Richardson, W W (1957): Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*, **11**, 359-77.
- Bonfil, D, Chuderland, D, Kraus, S, Shahbazian, D, Friedberg, I, Seger, R & Naor, Z (2004): Extracellular signal-regulated kinase, Jun N-terminal kinase, p38, and c-Src are involved in gonadotropin-releasing hormone-stimulated activity of the glycoprotein hormone follicle-stimulating hormone beta-subunit promoter. *Endocrinology*, **145**, 2228-44.
- Booser, D J & Hortobagyi, G N (1994): Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Focus on drug resistance. *Drugs*, **47**, 223-58.
- Bradbury, A R & Olopade, O I (2007): Genetic susceptibility to breast cancer. *Rev Endocr Metab Disord*, **8**, 255-67.
- Bradford, M M (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.

- Brinkley, B R, Beall, P T, Wible, L J, Mace, M L, Turner, D S & Cailleau, R M (1980): Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro. *Cancer Res*, **40**, 3118-29.
- Buchholz, S, Seitz, S, Schally, A V, Engel, J B, Rick, F G, Szalontay, L, Hohla, F, Krishan, A, Papadia, A, Gaiser, T, Brockhoff, G, Ortman, O, Diedrich, K & Koster, F (2009): Triple-negative breast cancers express receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and respond to LHRH antagonist cetorelix with growth inhibition. *Int J Oncol*, **35**, 789-796.
- Buchta, M, Höper, D W & Sönnichsen, A: *Das Hammerexamen: Repetitorium für den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München 2006
- Chang, H R (2010): Trastuzumab-based neoadjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer. *Cancer*, **116**, 2856-67.
- Chegini, N, Rong, H, Dou, Q, Kipersztok, S & Williams, R S (1996): Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in human myometrium and leiomyomata and the direct action of GnRH analogs on myometrial smooth muscle cells and interaction with ovarian steroids in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, **81**, 3215-21.
- Claus, E B, Risch, N & Thompson, W D (1994): Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. *Cancer*, **73**, 643-51.
- Davies, C L, Duffy, P M, MacRobert, A J, Loizidou, M C, Cooper, A J & Taylor, I (1996): Localization of anthracycline accumulation in sensitive and resistant urothelial tumor cell lines. *Cancer Detect Prev*, **20**, 625-33.
- Dent, R, Trudeau, M, Pritchard, K I, Hanna, W M, Kahn, H K, Sawka, C A, Lickley, L A, Rawlinson, E, Sun, P & Narod, S A (2007): Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*, **13**, 4429-34.
- Early-Breast-Cancer-Trialists'-Collaborative-Group (1998): Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet*, **352**, 930-42.
- Eicke, N, Gunthert, A R, Viereck, V, Siebold, D, Behe, M, Becker, T, Emons, G & Grundker, C (2005): GnRH-II receptor-like antigenicity in human placenta and in cancers of the human reproductive organs. *Eur J Endocrinol*, **153**, 605-12.

- Eicke, N, Gunthert, A R, Emons, G & Grundker, 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**, 1223-9.
- Emons, G, Muller, V, Ortmann, O, Grossmann, G, Trautner, U, Stuckrad, B, Schulz, K & Schally, A (1996): Luteinizing hormone-releasing hormone agonist triptorelin antagonizes signal transduction and mitogenic activity of epidermal growth factor in human ovarian and endometrial cancer cell lines. *Int J Oncol*, **9**, 1129-37.
- Emons, G, Ortmann, O, Schulz, K D & Schally, A V (1997): Growth-inhibitory actions of analogues of Luteinizing Hormone Releasing Hormone on tumor cells. *Trends Endocrinol Metab*, **8**, 355-62.
- Emons, G, Weiss, S, Ortmann, O, Grundker, C & Schulz, K D (2000): LHRH might act as a negative autocrine regulator of proliferation of human ovarian cancer. *Eur J Endocrinol*, **142**, 665-70.
- Emons, G (2001): [Hormone replacement therapy after menopause]. *Dtsch Med Wochenschr*, **126**, 253-4.
- Emons, G, Grundker, C, Gunthert, A R, Westphalen, S, Kavanagh, J & Verschraegen, C (2003): GnRH antagonists in the treatment of gynecological and breast cancers. *Endocr Relat Cancer*, **10**, 291-9.
- Emons, G, Tomov, S, Harter, P, Sehouli, J, Wimberger, P, Staehle, A, Hanker, L, Hilpert, F, Dall, P & Gründker, C (2010a): Phase II study of AEZS-108 (AN-152), a targeted cytotoxic LHRH analog, in patients with LHRH receptor-positive platinum resistant ovarian cancer. *J Clin Oncol*, **28(15s):(suppl; abstr 5035)**.
- Emons, G, Kaufmann, M, Gorchev, G, Tsekova, V, Gründker, C, Günthert, A R, Hanker, L C, Velikova, M, Sindermann, H, Engel, J & Schally, A V (2010b): Dose escalation and pharmacokinetic study of AEZS-108 (AN-152), an LHRH agonist linked to doxorubicin, in women with LHRH receptor-positive tumors. *Gynecol Oncol*, **119**, 457-61.
- Emons, G, Tomov, S, Sehouli, J, Harter, P, Wimberger, P, Hanker, L C, Stähle, A, Hristamian, A, Hilpert, F, Beckmann, M W, Dall, P, Sindermann, H & Gründker, C: *Phase II-Study with AEZS-108 (AN-152), a targeted cytotoxic LHRH-analog in patients with LHRH-receptor positive endometrial cancer*, 30. German Cancer Congress, Berlin 2012
- Fekete, M, Wittliff, J L & Schally, A V (1989): Characteristics and distribution of receptors for [D-TRP6]-luteinizing hormone-releasing hormone, somatostatin, epidermal growth factor, and sex steroids in 500 biopsy samples of human breast cancer. *J Clin Lab Anal*, **3**, 137-47.

- Fister, S, Gunthert, A R, Emons, G & Grundker, 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**, 1750-6.
- Fister, S, Schlotawa, L, Gunthert, A R, Emons, G & Grundker, C (2008): Increase of doxorubicin-induced apoptosis after knock-down of gonadotropin-releasing hormone receptor expression in human endometrial, ovarian and breast cancer cells. *Gynecol Endocrinol*, **24**, 24-9.
- Fister, S: *Induktion von Apoptose in gynäkologischen Karzinomen in vitro und in vivo durch Antagonisten des Gonadotropin-Releasing Hormons Typ II*, Mathematisch-naturwissenschaftliche Dissertation, Göttingen 2008
- Fister, S, Gunthert, A R, Aicher, B, Paulini, K W, Emons, G & Grundker, 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**, 6473-81.
- Gazdar, A F, Kurvari, V, Virmani, A, Gollahon, L, Sakaguchi, M, Westerfield, M, Kodagoda, D, Stasny, V, Cunningham, H T, Wistuba, II, Tomlinson, G, Tonk, V, Ashfaq, R, Leitch, A M, Minna, J D & Shay, J W (1998): Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Int J Cancer*, **78**, 766-74.
- Glasel, J A (1995): Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*, **18**, 62-3.
- Gluz, O, Liedtke, C, Gottschalk, N, Pusztai, L, Nitz, U & Harbeck, N (2009): Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Ann Oncol*, **20**, 1913-27.
- Goldhirsch, A, Glick, J H, Gelber, R D, Coates, A S, Thurlimann, B & Senn, H J (2005): Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol*, **16**, 1569-83.
- Gründker, C (2000): Cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone conjugates and their use in gynecological cancer therapy. *Eur J Endocrinol*, **143**, 569-72.
- Gründker, C, Schulz, K, Günthert, A R & Emons, G (2000a): Luteinizing hormone-releasing hormone induces nuclear factor kappaB-activation and inhibits apoptosis in ovarian cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 3815-20.

- Gründker, C, Volker, P, Schulz, K D & Emons, G (2000b): Luteinizing hormone-releasing hormone agonist triptorelin and antagonist cetrorelix inhibit EGF-induced c-fos expression in human gynecological cancers. *Gynecol Oncol*, **78**, 194-202.
- Gründker, C, Volker, P & Emons, G (2001): Antiproliferative signaling of luteinizing hormone-releasing hormone in human endometrial and ovarian cancer cells through G protein alpha(I)-mediated activation of phosphotyrosine phosphatase. *Endocrinology*, **142**, 2369-80.
- Gründker, C, Günthert, A R, Millar, R P & Emons, G (2002a): 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**, 1427-30.
- Gründker, C, Volker, P, Griesinger, F, Ramaswamy, A, Nagy, A, Schally, A V & Emons, G (2002b): Antitumor effects of the cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analog AN-152 on human endometrial and ovarian cancers xenografted into nude mice. *Am J Obstet Gynecol*, **187**, 528-37.
- 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**, 141-9.
- Günthert, A R, Gründker, C, Bongertz, T, Nagy, A, Schally, A V & Emons, G (2004a): Induction of apoptosis by AN-152, a cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH), in LHRH-R positive human breast cancer cells is independent of multidrug resistance-1 (MDR-1) system. *Breast Cancer Res Treat*, **87**, 255-64.
- Günthert, A R, Gründker, C, Bongertz, T, Schlott, T, Nagy, A, Schally, A V & Emons, G (2004b): Internalization of cytotoxic analog AN-152 of luteinizing hormone-releasing hormone induces apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cell lines independent of multidrug resistance-1 (MDR-1) system. *Am J Obstet Gynecol*, **191**, 1164-72.
- Halmos, G, Nagy, A, Lamharzi, N & Schally, A V (1999): Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone bind with high affinity to human breast cancers. *Cancer Lett*, **136**, 129-36.
- Harris, D, Bonfil, D, Chuderland, D, Kraus, S, Seger, R & Naor, Z (2002): Activation of MAPK cascades by GnRH: ERK and Jun N-terminal kinase are involved in basal and GnRH-stimulated activity of the glycoprotein hormone LHbeta-subunit promoter. *Endocrinology*, **143**, 1018-25.

- Hopkins, C R & Gregory, H (1977): Topographical localization of the receptors for luteinizing hormone-releasing hormone on the surface of dissociated pituitary cells. *J Cell Biol*, **75**, 528-40.
- Howell, S J, Johnston, S R & Howell, A (2004): The use of selective estrogen receptor modulators and selective estrogen receptor down-regulators in breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **18**, 47-66.
- Irmer, G, Burger, C, Ortmann, O, Schulz, K D & Emons, G (1994): Expression of luteinizing hormone releasing hormone and its mRNA in human endometrial cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab*, **79**, 916-9.
- Kakar, S S, Musgrove, L C, Devor, D C, Sellers, J C & Neill, J D (1992): Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **189**, 289-95.
- Kakar, S S, Grizzle, W E & Neill, J D (1994): The nucleotide sequences of human GnRH receptors in breast and ovarian tumors are identical with that found in pituitary. *Mol Cell Endocrinol*, **106**, 145-9.
- Kauffman, A S (2004): Emerging functions of gonadotropin-releasing hormone II in mammalian physiology and behaviour. *J Neuroendocrinol*, **16**, 794-806.
- Kesisis, G, Makris, A & Miles, D (2009): Update on the use of aromatase inhibitors in early-stage breast cancer. *Breast Cancer Res*, **11**, 211.
- Kidd, M, Schally, A V, Pfragner, R, Malfertheiner, M V & Modlin, I M (2008): Inhibition of proliferation of small intestinal and bronchopulmonary neuroendocrine cell lines by using peptide analogs targeting receptors. *Cancer*, **112**, 1404-14.
- Knobil, E (1990): The GnRH pulse generator. *Am J Obstet Gynecol*, **163**, 1721-7.
- Kraus, S, Naor, Z & Seger, R (2001): Intracellular signaling pathways mediated by the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. *Arch Med Res*, **32**, 499-509.
- Kumar, S (2007): Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*, **14**, 32-43.
- Laemmli, U K (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.

- Legha, S S & Carter, S K (1976): Antiestrogens in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat Rev*, **3**, 205-16.
- Levi, N L, Hanoch, T, Benard, O, Rozenblat, M, Harris, D, Reiss, N, Naor, Z & Seger, R (1998): Stimulation of Jun N-terminal kinase (JNK) by gonadotropin-releasing hormone in pituitary alpha T3-1 cell line is mediated by protein kinase C, c-Src, and CDC42. *Mol Endocrinol*, **12**, 815-24.
- Livasy, C A, Karaca, G, Nanda, R, Tretiakova, M S, Olopade, O I, Moore, D T & Perou, C M (2006): Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*, **19**, 264-71.
- Mangia, A, Tommasi, S, Reshkin, S J, Simone, G, Stea, B, Schittulli, F & Paradiso, A (2002): Gonadotropin releasing hormone receptor expression in primary breast cancer: comparison of immunohistochemical, radioligand and Western blot analyses. *Oncol Rep*, **9**, 1127-32.
- McArdle, C A, Franklin, J, Green, L & Hislop, J N (2002): The gonadotrophin-releasing hormone receptor: signalling, cycling and desensitisation. *Arch Physiol Biochem*, **110**, 113-22.
- McDonell, M W, Simon, M N & Studier, F W (1977): Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol*, **110**, 119-46.
- McPherson, K, Steel, C M & Dixon, J M (2000): ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*, **321**, 624-8.
- Millar, R P (2003): GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends Endocrinol Metab*, **14**, 35-43.
- Millar, R P, Lu, Z L, Pawson, A J, Flanagan, C A, Morgan, K & Maudsley, S R (2004): Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev*, **25**, 235-75.
- Minaretzis, D, Jakubowski, M, Mortola, J F & Pavlou, S N (1995): Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in human ovary and granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **80**, 430-4.
- Miyamoto, K, Hasegawa, Y, Nomura, M, Igarashi, M, Kangawa, K & Matsuo, H (1984): Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 3874-8.

- Miyazaki, M, Nagy, A, Schally, A V, Lamharzi, N, Halmos, G, Szepeshazi, K, Groot, K & Armatis, P (1997): Growth inhibition of human ovarian cancers by cytotoxic analogues of luteinizing hormone-releasing hormone. *J Natl Cancer Inst*, **89**, 1803-9.
- Moriya, T, Suzuki, T, Pilichowska, M, Ariga, N, Kimura, N, Ouchi, N, Nagura, H & Sasano, H (2001): Immunohistochemical expression of gonadotropin releasing hormone receptor in human breast carcinoma. *Pathol Int*, **51**, 333-7.
- Mullis, K, Faloona, F, Scharf, S, Saiki, R, Horn, G & Erlich, H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263-73.
- Nagy, A, Schally, A V, Armatis, P, Szepeshazi, K, Halmos, G, Kovacs, M, Zarandi, M, Groot, K, Miyazaki, M, Jungwirth, A & Horvath, J (1996): Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone containing doxorubicin or 2-pyrrolinodoxorubicin, a derivative 500-1000 times more potent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7269-73.
- Neill, J D, Duck, L W, Sellers, J C & Musgrove, L C (2001): A gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor specific for GnRH II in primates. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 1012-8.
- Neill, J D (2002): GnRH and GnRH receptor genes in the human genome. *Endocrinology*, **143**, 737-43.
- Neill, J D, Musgrove, L C & Duck, L W (2004): Newly recognized GnRH receptors: function and relative role. *Trends Endocrinol Metab*, **15**, 383-92.
- Newcomb, P A, Storer, B E, Longnecker, M P, Mittendorf, R, Greenberg, E R, Clapp, R W, Burke, K P, Willett, W C & MacMahon, B (1994): Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med*, **330**, 81-7.
- Noh, Y H, Matsuda, K, Hong, Y K, Kunstfeld, R, Riccardi, L, Koch, M, Oura, H, Dadras, S S, Streit, M & Detmar, M (2003): An N-terminal 80 kDa recombinant fragment of human thrombospondin-2 inhibits vascular endothelial growth factor induced endothelial cell migration in vitro and tumor growth and angiogenesis in vivo. *J Invest Dermatol*, **121**, 1536-43.
- Pareek, T K, Joshi, A R, Sanyal, A & Dighe, R R (2007): Insights into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists. *Apoptosis*, **12**, 1085-100.

- Reissmann, T, Felberbaum, R, Diedrich, K, Engel, J, Comaru-Schally, A M & Schally, A V (1995): Development and applications of luteinizing hormone-releasing hormone antagonists in the treatment of infertility: an overview. *Hum Reprod*, **10**, 1974-81.
- Roberson, M S, Zhang, T, Li, H L & Mulvaney, J M (1999): Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, **140**, 1310-8.
- Robert-Koch-Institut: *Krebs in Deutschland 2007/ 2008*, Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland. , Berlin 2012
- Ruf, F, Fink, M Y & Sealfon, S C (2003): Structure of the GnRH receptor-stimulated signaling network: insights from genomics. *Front Neuroendocrinol*, **24**, 181-99.
- Saiki, R K, Gelfand, D H, Stoffel, S, Scharf, S J, Higuchi, R, Horn, G T, Mullis, K B & Erlich, H A (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-91.
- Schaffler, A, Scholmerich, J & Buechler, C (2007): Mechanisms of disease: adipokines and breast cancer - endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, **3**, 345-54.
- Schally, A V, Arimura, A, Kastin, A J, Matsuo, H, Baba, Y, Redding, T W, Nair, R M, Debeljuk, L & White, W F (1971): Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science*, **173**, 1036-8.
- Schally, A V & Nagy, A (1999): Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors. *Eur J Endocrinol*, **141**, 1-14.
- Sealfon, S C, Weinstein, H & Millar, R P (1997): Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr Rev*, **18**, 180-205.
- Sevignani, C, Calin, G A, Cesari, R, Sarti, M, Ishii, H, Yendamuri, S, Vecchione, A, Trapasso, F & Croce, C M (2003): Restoration of fragile histidine triad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in breast cancer cell lines. *Cancer Res*, **63**, 1183-7.
- Shah, N R & Wong, T (2006): Current breast cancer risks of hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Expert Opin Pharmacother*, **7**, 2455-63.

- Shapiro, D B (2003): An overview of GnRH antagonists in infertility treatments. Introduction. *Fertil Steril*, **80 Suppl 1**, S1-7; discussion S32-4.
- Shupnik, M A (1996): Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone. *Biol Reprod*, **54**, 279-86.
- Sinha, B K & Politi, P M (1990): Anthracyclines. *Cancer Chemother Biol Response Modif*, **11**, 45-57.
- Slamon, D J, Godolphin, W, Jones, L A, Holt, J A, Wong, S G, Keith, D E, Levin, W J, Stuart, S G, Udove, J, Ullrich, A & et al. (1989): Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, **244**, 707-12.
- Smiley, S T, Reers, M, Mottola-Hartshorn, C, Lin, M, Chen, A, Smith, T W, Steele, G D, Jr. & Chen, L B (1991): Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3671-5.
- Sorlie, T, Tibshirani, R, Parker, J, Hastie, T, Marron, J S, Nobel, A, Deng, S, Johnsen, H, Pesich, R, Geisler, S, Demeter, J, Perou, C M, Lonning, P E, Brown, P O, Borresen-Dale, A L & Botstein, D (2003): Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8418-23.
- Sotiriou, C, Neo, S Y, McShane, L M, Korn, E L, Long, P M, Jazaeri, A, Martiat, P, Fox, S B, Harris, A L & Liu, E T (2003): Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 10393-8.
- Stojilkovic, S S, Reinhart, J & Catt, K J (1994): Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev*, **15**, 462-99.
- Susemihl, D (1975): [Tumor classification using the TNM system. Sequel 1: breast cancer]. *Fortschr Med*, **93**, 1759-63.
- Terry, M B, Knight, J A, Zablotska, L, Wang, Q, John, E M, Andrulis, I L, Senie, R T, Daly, M, Ozcelik, H, Briollais, L & Santella, R M (2007): Alcohol metabolism, alcohol intake, and breast cancer risk: a sister-set analysis using the Breast Cancer Family Registry. *Breast Cancer Res Treat*, **106**, 281-8.
- Thorpe, S M, Rose, C, Rasmussen, B B, Mouridsen, H T, Bayer, T & Keiding, N (1987): Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patients with node negative primary breast cancer. *Cancer Res*, **47**, 6126-33.

- Tomlinson, G E, Chen, T T, Stastny, V A, Virmani, A K, Spillman, M A, Tonk, V, Blum, J L, Schneider, N R, Wistuba, II, Shay, J W, Minna, J D & Gazdar, A F (1998): Characterization of a breast cancer cell line derived from a germ-line BRCA1 mutation carrier. *Cancer Res*, **58**, 3237-42.
- Towbin, H, Staehelin, T & Gordon, J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4.
- van 't Veer, L J, Dai, H, van de Vijver, M J, He, Y D, Hart, A A, Mao, M, Peterse, H L, van der Kooy, K, Marton, M J, Witteveen, A T, Schreiber, G J, Kerkhoven, R M, Roberts, C, Linsley, P S, Bernards, R & Friend, S H (2002): Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, **415**, 530-6.
- Veres, G, Gibbs, R A, Scherer, S E & Caskey, C T (1987): The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science*, **237**, 415-7.
- Volker, P, Grundker, C, Schmidt, O, Schulz, K D & Emons, G (2002): Expression of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in human ovarian and endometrial cancers: frequency, autoregulation, and correlation with direct antiproliferative activity of luteinizing hormone-releasing hormone analogues. *Am J Obstet Gynecol*, **186**, 171-9.
- Ward, H W (1973): Anti-oestrogen therapy for breast cancer: a trial of tamoxifen at two dose levels. *Br Med J*, **1973,1**, 13-4.
- Westphalen, S, Kotulla, G, Kaiser, F, Krauss, W, Werning, G, Elsasser, H P, Nagy, A, Schulz, K D, Grundker, C, Schally, A V & Emons, G (2000): Receptor mediated antiproliferative effects of the cytotoxic LHRH agonist AN-152 in human ovarian and endometrial cancer cell lines. *Int J Oncol*, **17**, 1063-9.
- White, R B, Eisen, J A, Kasten, T L & Fernald, R D (1998): Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 305-9.
- WHO (1982): The world Health Organization Histological Typing of Breast Tumors--Second Edition. The World Organization. *Am J Clin Pathol*, **78**, 806-16.
- Zhang, W & Ling, V (2000): Cell-cycle-dependent turnover of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *J Cell Physiol*, **184**, 17-26.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| A | Adenin |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| AS | Aminosäure(n) |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| Bp | Basenpaare |
| BRCA | <i>breast cancer genes</i> |
| BSA | Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>) |
| C | Cytosin |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> |
| CR | <i>complete response</i> |
| DCIS | duktales Carcinoma in situ |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| Dnase I | Desoxyribonuklease I |
| dNTP | Desoxyribonukleosid- Triphosphat |
| ds | doppelsträngig (<i>double strand</i>) |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zelllinien |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | <i>Enhanced Chemiluminescence Reaction</i> |
| EDTA | Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure-Na-Salz |
| EGF | <i>epidermal growth factor</i> |
| ERK | <i>extracellular regulated kinase</i> |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| FAC | 5-Fluorouracil, Doxorubicin, Cyclophosphamid |
| FCS | fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>) |
| FEC | 5-Fluorouracil, Epirubicin, Cyclophosphamid |
| FIGO | <i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i> |
| FSH | Follikelstimulierendes Hormon |
| G | Guanin |
| GnRH | Gonadotropin-Releasing Hormon |

| | |
|----------|--|
| GPCR | G-Protein gekoppelter Rezeptor (<i>G-protein coupled receptor</i>) |
| HER2/neu | <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> |
| HCC | <i>Harvard Cancer Center</i> |
| JNK | <i>c-Jun N-terminal kinase</i> |
| LCIS | lobuläres Carcinoma in situ |
| LH | Luteinisierendes Hormon |
| LHRH | Luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon |
| Lk | Lymphknoten |
| MAPK | mitogenaktivierte Proteinkinase |
| MDR-1 | <i>multidrug resistance-1</i> |
| MEM-Earl | Minimum Essential Medium Eagle |
| mRNA | <i>messenger-RNA</i> |
| NFκB | <i>nuclear factor kappa B</i> |
| n.s. | nicht signifikant |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung |
| PBST | phosphatgepufferte Salzlösung + Tween 20 |
| PBSTN | phosphatgepufferte Salzlösung + Tween 20 + FCS |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| pGlu | para-Glutamat |
| PKC | Proteinkinase C |
| PLC | Phospholipase C |
| PR | <i>partial response</i> |
| P/S | Penicillin/Streptomycin |
| PTP | Phosphotyrosinphosphatase |
| RNA | Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (rounds per minute) |
| RT | Raumtemperatur |
| RT | Reverse Transkription |
| SD | <i>stable disease</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) |
| SERD | <i>selective estrogen receptor destructor</i> |
| ss | einzelsträngig (<i>single strand</i>) |
| T | Thymin |

| | |
|----------|--|
| Taq | <i>thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| TBST | Tween-TBS Puffer |
| TEMED | N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin |
| TMR | Transmembran-Rezeptor |
| TNM | Tumorgröße (T), nodaler Befall (N), Fernmetastasierung (M) |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| TV | Tumorvolumen |
| Tween 20 | Polysorbat 20 |
| U | Uracil |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | Volumen-% |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |
| w | mit (<i>with</i>) |
| w/o | ohne (<i>without</i>) |
| w/v | Massenvolumen-% |

8.2 **Abbildungsverzeichnis**

| | | |
|-----------|--|----|
| Abb. 1.1: | Rückkopplungsmechanismus der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse..... | 9 |
| Abb. 1.2: | Struktur des humanen GnRH-I-Rezeptors..... | 10 |
| Abb. 4.1: | GnRH-I Rezeptor-Expression in HCC-1806 und HCC-1937..... | 33 |
| Abb. 4.2: | Immunzytochemischer Nachweis der Proteinexpression des GnRH-Rezeptors in den Zelllinien HCC-1806 und HCC-1937..... | 33 |
| Abb. 4.3: | Dosis-Wirkungs-Experiment auf die Zellproliferation der triple-negativen und GnRH-Rezeptor-positiven Mammakarzinomzelllinie HCC-1806 <i>in vitro</i> | 34 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Abb. 4.4: | Dosis-Wirkungs-Experiment auf die Zellproliferation der triple-negativen und GnRH-Rezeptor-positiven Mammakarzinomzelllinie HCC-1937 <i>in vitro</i> . | 35 |
| Abb. 4.5: | Effekte von AN-152 auf die Apoptoseinduktion bei der triple-negativen und GnRH-Rezeptor-positiven Mammakarzinomzelllinie HCC-1806 <i>in vitro</i> . | 36 |
| Abb. 4.6: | Effekte von AN-152 auf die Apoptoseinduktion bei der triple-negativen und GnRH-Rezeptor-positiven Mammakarzinomzelllinie HCC-1937 <i>in vitro</i> . | 36 |
| Abb. 4.7: | Aktivierung der Caspase-3 durch AN-152. | 37 |
| Abb.4.8: | Tumorzellen nach Xenotransplantation von HCC-1806-Brustkrebszellen in Nacktmäuse unter Behandlung mit AN-152 und Doxorubicin. | 39 |
| Abb. 4.9: | Tumorzellen nach Xenotransplantation von MDA-MB-231-Brustkrebszellen in Nacktmäuse unter Behandlung mit AN-152 und Doxorubicin. | 41 |

8.3 Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----------|---|----|
| Tab. 1.1: | Histologische Klassifikation des Mammakarzinoms (WHO) | 5 |
| Tab. 1.2: | Stadieneinteilung des Mammakarzinoms (TNM) | 6 |
| Tab. 2.1: | Verwendete Zelllinien des triple-negativen Mammakarzinoms | 18 |
| Tab. 2.2: | Mausstamm | 18 |
| Tab. 2.3: | Matrigel™ | 18 |
| Tab. 2.4: | Verwendete Antikörper | 19 |
| Tab. 3.1: | Faktoren zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 25 |

| | |
|--|----|
| Tab. 3.2: Enzym-Mix für die Reverse Transkription | 26 |
| Tab. 3.3: Reaktionsansatz einer Standard-PCR | 27 |
| Tab. 3.4: PCR-Programmparameter | 27 |
| Tab. 3.5: Zusammensetzung eines 5 %igen Sammelgels | 29 |
| Tab. 3.6: Zusammensetzung eines 15 %igen Trenngels | 29 |

8.4 Formelverzeichnis

| | |
|--|----|
| (1) Formel zur Berechnung des Tumolvolumens..... | 23 |
|--|----|

Publikation zum Thema der Dissertation

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Originalarbeiten

Föst C, Duwe F, Hellriegel M, Schweyer S, Emons G, Gründker C (2011). Targeted chemotherapy for triple-negative breast cancers via LHRH receptor. *Oncol Rep*, **25**, 1481-7.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Carsten Gründker für sein Interesse an meiner Arbeit, die stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie die freundliche Übernahme der Betreuung und Vertretung meiner Arbeit seitens der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen. Durch seine engagierte und lehrreiche Betreuung, die oftmals über den Inhalt der Arbeit hinausging, trug er entscheidend dazu bei, Motivation und Spaß bis zur Fertigstellung dieser Arbeit zu erhalten.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Günter Emons für die Möglichkeit, diese Arbeit im Labor für Molekulare Gynäkologie der Universitätsfrauenklinik Göttingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Carsten Gründker durchführen zu können.

Allen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Gynäkologie, vor allem Herrn PD Dr. rer. nat. Rainer Girgert, Frau Sonja Blume und Herrn Matthias Läsche danke ich für die sehr schöne Zeit und die entgegenkommende Hilfsbereitschaft.

Ein ganz besonderes herzliches Dankeschön gilt dabei Frau Dr. rer. nat. Antje Schubert und Frau Dipl.-Pharm. Elke Ziegler für die tolle Unterstützung sowie die vielen schönen gemeinsamen Stunden.

Mein besonderer herzlicher Dank gilt meiner Frau Ulrike und meiner Familie, die mich in jeder Hinsicht unterstützen und mir stets den nötigen Rückhalt geben.

Lebenslauf

Am 02. Oktober 1981 wurde ich, Crispin Föst, als Sohn des Maschinenbauingenieurs Siegfried Föst und der Diplomlehrerin Heike Föst, geb. Hohenleitner, in Halle (Saale) geboren.

Von 1988 bis 1990 besuchte ich die POS „Erich Weinert“ in Wolfen, von 1990 bis 1991 die POS „Wilhelm Pieck“ in Wolfen, von 1991 bis 1992 die Grundschule Wolfen-Nord und von 1992 bis 1994 das Gymnasium Wolfen-Nord. Darauf folgend besuchte ich von 1994 bis 2001 das Geschwister-Scholl-Gymnasium in Freiberg, wo ich im Juni 2001 das Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife erlangte. Ich verbrachte außerdem von 1998 bis 1999 ein Austauschjahr an der High School of La Porte in Texas (USA).

Den Zivildienst leistete ich von 2001 bis 2002 im katholischen Pfarramt St. Johannes der Täufer in Freiberg.

Im Wintersemester 2004 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig. Nach dem 6. vorklinischen Semester absolvierte ich im Sommersemester 2007 den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Zum Sommersemester 2008 wechselte ich an die Georg-August-Universität Göttingen, wo ich das klinische Studium abschloss. Das Praktische Jahr absolvierte ich zunächst von Februar bis Juni 2011 in der Universitätsmedizin Göttingen im Fach Innere Medizin, von Juni bis Oktober in der Universitätsmedizin Göttingen im Wahlfach Anästhesie und von Oktober 2011 bis Januar 2012 im Evangelischen Krankenhaus Göttingen-Weende im Fach Chirurgie.

Im Juli 2009 begann ich mit meiner Dissertation im Labor für Molekulare Gynäkologie (Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker) des Universitätsklinikums Göttingen.