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

**Präklinische Evaluation:
Glykolyseinhibition in Kombination mit GnRH-Rezeptor-vermittelter
Therapie zur Behandlung gynäkologischer Karzinome**

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

vorgelegt von

Madita Dora Reutter

aus

Esslingen

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. J. Steinfeldner

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Gynäkologische Karzinome	1
1.1.1 Endometriumkarzinom.....	1
1.1.2 Ovarialkarzinom	2
1.2 GnRH-Rezeptor-vermittelte Tumorthherapie	3
1.2.1 Der GnRH-I-Rezeptor als Ziel	3
1.2.2 Der GnRH-II-Rezeptor als Ziel	6
1.3 Glykolyseinhibition zur Tumorthherapie.....	8
1.4 Kombinationstherapie.....	9
1.5 Zielsetzung und Fragestellung.....	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.1.1 Geräte.....	11
2.1.2 EDV	12
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	12
2.1.4 Chemikalien	13
2.1.5 Kits.....	14
2.1.6 Proteine, Proteinaseinhibitoren und Proteinstandards	14
2.1.7 Antikörper.....	15
2.1.7.1 Primärantikörper	15
2.1.7.2 Sekundärantikörper.....	15
2.1.8 Versuchssubstanzen	15
2.1.8.1 2-Deoxy-D-Glukose.....	15
2.1.8.2 AN-152.....	15
2.1.8.3 GnRH-II-Antagonist.....	15
2.1.9 Medien für die Zellkultur und Versuche.....	16
2.1.10 Zelllinien	16
2.2 Zellbiologische Methoden	16
2.2.1 Zellzahlbestimmung mit Neubauer-Zählkammer.....	16
2.2.2 Kultivieren von Zellen.....	16
2.2.3 Kryokonservierung von Zellen.....	17
2.2.4 Revitalisieren von Zellen.....	17

2.2.5	alamarBlue® Proliferations-Assay	17
2.2.6	Zytotoxizitäts-Assay.....	18
2.2.6.1	JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Assay	18
2.2.6.2	TUNEL Assay	19
2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	19
2.3.1	Herstellung der Western-Blot-Lysate.....	19
2.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	19
2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	20
2.3.4	Western-Blot	21
2.3.5	Immundetektion.....	22
2.4	Statistische Analysen.....	23
2.4.1	One-way ANOVA mit Newman-Keuls Multiple Comparison Test	23
3	Ergebnisse	24
3.1	GnRH-Rezeptor-Expression in gynäkologischen Karzinomzelllinien	24
3.2	Analyse der antiproliferativen Wirkung	24
3.2.1	2-Deoxy-D-Glukose und AN-152.....	24
3.2.2	2-Deoxy-D-Glukose und GnRH-II-Antagonist	28
3.3	Untersuchung der Apoptoseinduktion.....	32
3.3.1	TUNEL Assay	32
3.3.2	JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Assay	34
3.3.2.1	2-Deoxy-D-Glukose und AN-152.....	34
3.3.2.2	2-Deoxy-D-Glukose und GnRH-II-Antagonist	37
3.4	Überprüfung des Mechanismus.....	40
3.4.1	Western-Blot unter Behandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose und AN-152.....	40
3.4.2	Western-Blot unter Behandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose und GnRH-II-Antagonist.....	41
4	Diskussion	42
4.1	GnRH-Rezeptor-Expression	43
4.2	Antiproliferative und zytostatische Effektivität der Kombinationsbehandlung <i>in vitro</i>	43
4.3	Molekulare Wirkung der Kombinationsbehandlung.....	45
4.4	Ausblick auf die Möglichkeiten der klinischen Anwendung.....	46
5	Zusammenfassung	48
6	Literaturverzeichnis	49
7	Veröffentlichung.....	58

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	2-fach destilliert
BSA	engl.: bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
2DG	2-Deoxy-D-Glukose
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: Desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
ECL	engl.: enhanced chemoluminescence
FCS	foetal calf serum
x g	x-fache Erdbeschleunigung
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
MEM	minimal essential medium
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	engl.: phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
rpm	engl.: rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	engl.: Sodiumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octylphenolpoly(ethylenglycolether)
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
UTP	Uridintriphosphat

1 Einleitung

1.1 Gynäkologische Karzinome

1.1.1 Endometriumkarzinom

Das Endometriumkarzinom ist in vielen westlichen Ländern der häufigste maligne Tumor des weiblichen Genitaltraktes. Seine Inzidenz beträgt weltweit zwischen 9,9 und 15 pro 100 000 Frauen. In Deutschland kommt es jährlich zu 11 300 Neuerkrankungen pro Jahr. Damit stellt das Endometriumkarzinom das vierthäufigste Malignom der Frau dar. Mit 2,7 % der krebisbedingten Sterbefälle nimmt es die neunte Stelle bei der Mortalität ein. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen 75 und 80 Jahren, wobei 5 % der Endometriumkarzinome bei Frauen unter 40 Jahren auftreten.

Das Endometriumkarzinom ist vorzugsweise eine Erkrankung älterer Frauen und tritt meist postmenopausal auf. Ätiologisch sind endogene und exogene Risikofaktoren zu unterscheiden. Zu den endogenen Risikofaktoren zählen ein metabolisches Syndrom mit Adipositas, Diabetes mellitus, eine lange Lebensphase mit Menstruationsblutung, ein PCO-Syndrom und Nulliparität (AMANT ET AL. 2005). Als exogene Risikofaktoren für die Entstehung eines Endometriumkarzinoms werden die Langzeiteinnahme von Östrogenen ohne Gestagenschutz und die Tamoxifen-Langzeittherapie bei vorangegangenen Mammakarzinom angesehen (BERNSTEIN ET AL. 1999).

Pathogenetisch werden zwei Typen des Endometriumkarzinoms unterschieden. Zum einen gibt es das östrogenassoziierte Typ-I-Karzinom mit recht günstiger Prognose, welches hochdifferenziert ist und vor allem im Zusammenhang mit den genannten endogenen und exogenen Risikofaktoren auftritt. Ein Auftreten unabhängig von entsprechenden Risikofaktoren zeigt das östrogenunabhängige Typ-II-Karzinom, welches meist wenig differenziert ist und eine schlechtere Prognose aufweist (AKHMEDKHANOV ET AL. 2001). Die Prognose des Endometriumkarzinoms ist jedoch im Allgemeinen günstig, weil die meisten Patientinnen sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in einem frühen klinischen Stadium befinden. Die Prognose hängt dabei von mehreren Faktoren wie dem Tumortyp, dem Grading, der Invasionstiefe sowie dem Lymphknotenbefall ab.

Die Primärtherapie des Endometriumkarzinoms erfolgt operativ und besteht aus Hysterektomie mit Adnexektomie sowie gegebenenfalls pelviner und paraaortaler Lymphonodektomie (AMANT ET AL. 2007). Eine adjuvante Strahlentherapie sollte bei Patientinnen mit hohem Lokalrezidivrisiko durchgeführt werden, nicht aber bei Patientinnen im Frühstadium (MARIANI ET AL. 2000). Eine adjuvante endokrine Therapie mit Gestagenen wird nicht empfohlen. In einer Studie über eine adjuvante Chemotherapie zeigte sich, dass eine systemische Therapie mit Doxorubicin (Adriamycin) und Cisplatin bei optimal operierten Karzinomen der Stadien III und IV einen Vorteil gegenüber einer Ganzabdomenbestrahlung bietet (RANDALL ET

AL. 2006). Zu den palliativen Therapieoptionen gehören neben der Operation und Bestrahlung bei Progesteronrezeptor-positiven Karzinomen die endokrine Therapie mit Gestagenen und bei Rezeptor-negativen Karzinomen die Chemotherapie unter anderem mit Doxorubicin, Cisplatin oder Paclitaxel.

1.1.2 Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom ist das sechsthäufigste Malignom bei Frauen in Europa und die häufigste Mortalitätsursache gynäkologischer Krebserkrankungen. In Deutschland erkranken jährlich etwa 8 000 Frauen an einem Ovarialkarzinom. Das Erkrankungsalter liegt dabei zwischen 60 und 70 Jahren. Etwa 10 % der Ovarialkarzinome sind genetisch bedingt.

Die Ursache für die Entstehung des Ovarialkarzinoms ist noch nicht vollständig geklärt, man kennt jedoch bestimmte Risikofaktoren. Das Risiko einer Erkrankung steigt mit zunehmendem Alter und einer Nulliparität. Bei familiär gehäuften Auftreten von Mamma- und Ovarialkarzinomen finden sich in einem Großteil der Fälle Mutationen in BRCA-Genen.

Aufgrund der erst spät auftretenden klinischen Symptome hat das Karzinom bei Diagnosestellung oft die Organgrenze schon überschritten und ist bereits ins kleine Becken gewachsen oder fernmetastasiert (GOODMAN & HOWE 2003). Diese spätentdeckten Karzinome haben daher eine schlechte Prognose. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate für Tumoren im Stadium III und IV liegen bei 5 – 20 %. Bis heute existieren weder effektive Screeningmethoden noch Früherkennungsmaßnahmen. Der Verlauf der Erkrankung und die Überlebenszeit werden unter anderem beeinflusst vom Lebensalter der Patientin, der Tumorgroße und -ausbreitung, dem Differenzierungsgrad und dem postoperativen Tumorrest (SILVERBERG 2000 sowie VON GEORGI ET AL. 2003).

Bei der Therapie des Ovarialkarzinoms unterscheidet man zwischen einem frühen Karzinom und einem fortgeschrittenen Karzinom. In 30 % der Fälle ist das Ovarialkarzinom auf das kleine Becken beschränkt und es handelt sich um ein Frühkarzinom. Beim frühen Karzinom ist die vollständige operative Entfernung des Tumorgewebes von entscheidender Bedeutung für die Heilung und die Überlebensdauer. Eine adjuvante systemische, platinhaltige Chemotherapie wird je nach Stadium empfohlen. Bei fortgeschrittenem Karzinom ist der postoperative Tumorrest der entscheidende Prognosefaktor. Eine an die Operation anschließende platin- und taxanhaltige Chemotherapie ist bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom Standard (TRIMBOS ET AL. 2003). In der Rezidivtherapie ist die Optimierung der Lebensqualität das primäre Ziel. Eine Option stellt die endokrine Therapie dar. Hierzu sind Daten für die Gabe von Tamoxifen, Gestagen und GnRH-Analoga bekannt, welche das Wachstum der Tumormasse beeinflussen (GRÜNDKER ET AL. 2002b).

1.2 GnRH-Rezeptor-vermittelte Tumortherapie

Das Prinzip der rezeptorvermittelten Tumortherapie („receptor targeted therapy“) besteht darin, dass nur Zellen, die den entsprechenden Rezeptor an ihrer Oberfläche besitzen, therapiert werden, wohingegen Zellen ohne diesen Rezeptor geschont werden. Dies steigert die spezifische Effektivität und mindert unerwünschte Nebenwirkungen.

1.2.1 Der GnRH-I-Rezeptor als Ziel

Der GnRH-I-Rezeptor, der in etwa 80 % aller Endometrium- und Ovarialkarzinome und in mehr als 50 % aller Mammakarzinome exprimiert wird (FEKETE ET AL. 1989, IMAI ET AL. 1994 sowie SRKALOVIC ET AL. 1990), stellt einen Teil eines negativ-autokrinen Regulationsmechanismus des Zellwachstums dar. Bis auf die Hypophyse und die Organe des Reproduktionstraktes gibt es keine anderen Normalgewebe, die den GnRH-I-Rezeptor exprimieren (GRÜNDKER & EMONS 2005). Deshalb stellt der GnRH-I-Rezeptor ein geeignetes Ziel für eine rezeptorvermittelte Therapie dar. Die ersten GnRH-Analoga wurden schon kurz nach der Entdeckung des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH) (SCHALLY ET AL. 1971) entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass GnRH-I-Agonisten und GnRH-I-Antagonisten eine antiproliferative Wirkung auf Mamma-, Endometrium-, Ovarial- und Prostatakarzinomzellen haben (CASTELLON ET AL. 2006, EMONS ET AL. 1993 sowie GÜNTHERT ET AL. 2005).

SCHALLY & NAGY begannen 1999 mit der Entwicklung des zytostatischen GnRH-Analogons AN-152 (AEZS-108), das über den GnRH-I-Rezeptor wirkt. AN-152 (vgl. Abbildung 1) ist ein Hybridwirkstoff, bei dem das lipophile Chemotherapeutikum Doxorubicin über einen Linker kovalent an eine Seitenkette des GnRH-I-Agonisten [D-Lys⁶]GnRH gekoppelt ist. Bei Doxorubicin (Adriamycin) handelt es sich um ein Anthracyclin-Antibiotikum, das als Zytostatikum zur Therapie maligner Tumoren eingesetzt wird (BLUM & CARTER 1974 sowie WEISS 1992). Es hemmt die DNA- und RNA-Synthese durch Interkalierung in die DNA und durch Inhibition der Topoisomerase-II, einem Schlüsselenzym der DNA-Synthese, und führt dadurch zum Zelltod. Eine erhebliche und somit dosislimitierende Nebenwirkung von Doxorubicin stellt vor allem die Kardiotoxizität dar (BUZDAR ET AL. 1985). Die kovalente Bindung von Doxorubicin an den GnRH-I-Agonisten [D-Lys⁶]GnRH ermöglicht es, dass eine Anreicherung des zytostatischen Chemotherapeutikums nur in Tumorzellen mit GnRH-I-Rezeptor-Expression erfolgt, wodurch eine verminderte Toxizität für den Gesamtorganismus erzielt werden kann (GRÜNDKER 2000).

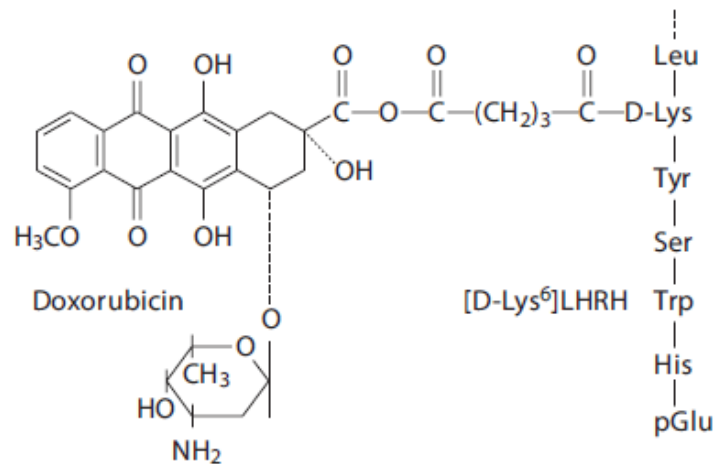


Abbildung 1: Hybridwirkstoff AN-152: Der Wirkstoff Doxorubicin ist kovalent an das Trägerhormon [D-Lys⁶]GnRH gekoppelt. (EMONS ET AL. 2009, S.16).

In-vitro-Studien konnten die Anreicherung von AN-152 im Zellinneren mit apoptoseinduzierender Wirkung bei GnRH-I-Rezeptor-positiven Endometrium-, Ovarial- und Mammakarzinomen nachweisen, wohingegen nach Blockade des GnRH-I-Rezeptors dieser Effekt ausblieb (WESTPHALEN ET AL. 2000). Daraus ließ sich schließen, dass AN-152 durch rezeptorvermittelte Aufnahme in die Zellen gelangt.

Nach Bindung am GnRH-I-Rezeptor wird der Hybridwirkstoff AN-152 zusammen mit diesem internalisiert. In der Zelle wird der Rezeptor abgebaut, recycelt und wieder an die Oberfläche gebracht. AN-152 wird in seine Einzelkomponenten Doxorubicin und [D-Lys⁶]GnRH gespalten und das lipophile Doxorubicin gelangt in den Zellkern, wo es durch DNA-Interkalation zur Apoptose der Zellen führt (vgl. Abbildung 2).

Ein Problem der Karzinombehandlung stellt die Multi-Wirkstoff-Resistenz (multidrug resistance, bzw. MDR) dar. Der Transporter MDR-1 ist ein Glykoprotein, durch den das Chemotherapeutikum wieder aus der Zelle transportiert wird und dadurch keine Wirkung zeigt. MDR-1 wird in 25 % der Ovarialkarzinome exprimiert und die Expression steigert sich durch Behandlung mit lipophilem Doxorubicin (BOOSER & HORTOBAGYI 1994 sowie OZALP ET AL. 2002). Diese Multi-Wirkstoff-Resistenz kann bei der Behandlung mit AN-152 durch die GnRH-I-rezeptorvermittelte Aufnahme umgangen werden (GÜNTHERT ET AL. 2004a).

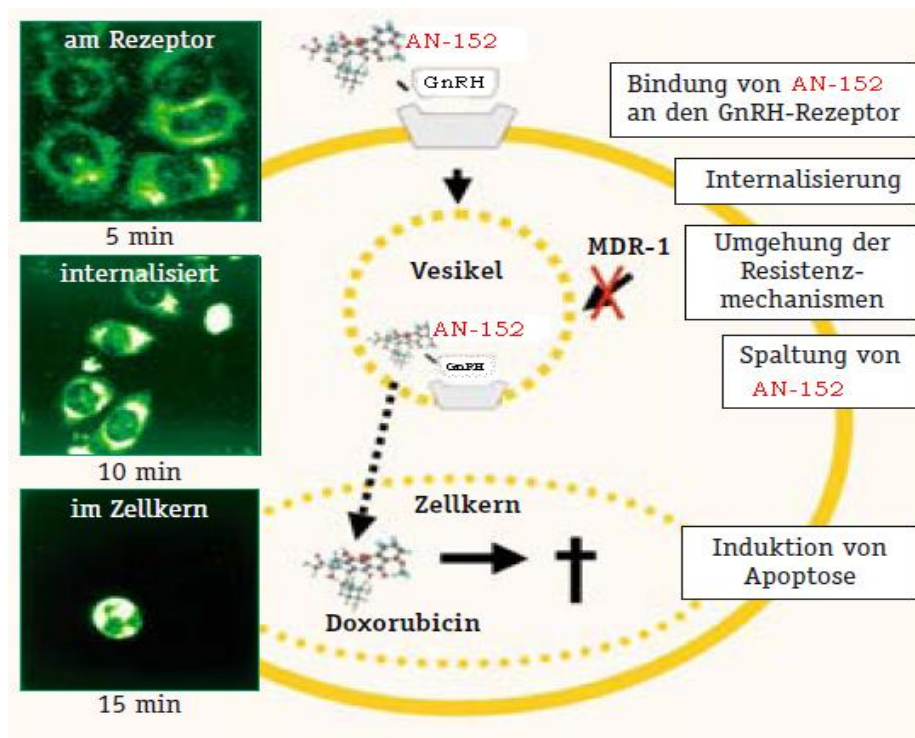


Abbildung 2: Zelluläre Aufnahme und Wirkmechanismus von AN-152. Links: Darstellung der Internalisierung und Lokalisation von AN-152 mit konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop. (mod. nach GRÜNDKER ET AL. 2006, S.591)

GRÜNDKER ET AL. (2002c) zeigten am Nacktmausmodell, dass AN-152 bei gleicher molarer Dosis wie Doxorubicin das Wachstum GnRH-I-Rezeptor-positiver Tumoren hemmt und zur Reduktion des Tumolvolumens führt.

Eine Phase-I-Studie mit AN-152 wurde im Dezember 2006 bei Endometrium- und Ovarialkarzinom-Patientinnen an der Universitäts-Frauenklinik Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. G. Emons abgeschlossen. Ziel war die Bestimmung der optimalen therapeutischen Dosis und die Frage nach der allgemeinen Verträglichkeit von AN-152. Bei der für folgende Phase-II-Studien empfohlenen therapeutischen Dosis von $267 \text{ mg} / \text{m}^2$ kam es bei 15 % der Patientinnen zu hämatologischen Toxizitäten vom CTCAE-Grad IV, welche spontan ohne Einsatz von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wieder abgeklungen sind. Andere nicht-hämatologische Toxizitäten wie Alopezie, Übelkeit, Erbrechen und Erschöpfung waren alle vom CTCAE-Grad I. Die Daten zeigten zudem, dass AN-152 eine antitumorale Wirkung besitzt.

Die erste Phase-II-Studie, welche seit Ende 2007 läuft, hat als primäres Ziel die Evaluation der antitumoralen Wirkung von AN-152. Die ersten Ergebnisse der Studie an 42 Patientinnen mit platinrefraktärem Ovarialkarzinom zeigten ein medianes progressionsfreies Intervall von 104 Tagen und eine gesamte Überlebensdauer von 15,6 Monaten. Eine optimale therapeutische Dosis von $267 \text{ mg} / \text{m}^2$ konnte dabei bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass AN-152 durch seine Eigenschaften einen geeigneten Wirkstoff für die rezeptorvermittelte Chemotherapie gynäkologischer Karzinome darstellt.

1.2.2 Der GnRH-II-Rezeptor als Ziel

Zusätzlich zum bekannten GnRH-I wurde im Jahre 1998 erstmals GnRH-II beschrieben (WHITE ET AL. 1998). Bei GnRH-II handelt es sich wie bei GnRH-I um ein Decapeptid, dessen Aminosäuresequenz zu 70 % homolog zu GnRH-I ist. Aufgrund dieser hohen Homologie wird davon ausgegangen, dass GnRH-II durch Genduplikation aus GnRH-I entstanden ist. Man geht ebenfalls davon aus, dass GnRH-II eine wichtige physiologische Funktion zukommt, weil seine Struktur vom Fisch bis zu Säugetier hochkonserviert geblieben ist und es in verschiedenen Gewebearten nachgewiesen werden konnte (KAUFFMAN 2004).

Die Existenz des GnRH-II-Rezeptors beim Menschen wird vermutet. Allerdings erschwert ein Stoppcodon im zweiten Exon und eine „Frameshift“-Mutation die Identifikation der Sequenz und ein vollständiges humanes Transkript konnte noch nicht nachgewiesen werden (MILLAR ET AL. 1999 sowie NEILL ET AL. 2001). Es wird vermutet, dass der GnRH-II-Rezeptor als verkürzter Fünf-Transmembran-Rezeptor aktiv ist (NEILL 2002). Der GnRH-II-Rezeptor besitzt einen C-terminalen zytoplasmatischen Schwanz und wird dadurch nach Ligandenbindung schneller internalisiert als der GnRH-I-Rezeptor (BLOMENROHR ET AL. 1999). Die Signaltransduktion in gynäkologischen Karzinomen entspricht der des GnRH-I-Rezeptors (EICKE ET AL. 2006). GnRH-II aktiviert ebenfalls eine Phosphotyrosinphosphatase und hemmt dadurch die EGF-induzierte mitogene Signaltransduktion, was zur Hemmung der Tumorzellproliferation führt.

GRÜNDKER ET AL. (2002a) zeigten, dass eine Behandlung von Tumorzellen mit natürlichem GnRH-II oder dem GnRH-II-Agonisten [D-Lys⁶]GnRH-II zu einer stärkeren Proliferationshemmung führt als die Behandlung mit GnRH-I-Agonisten. Auf GnRH-II-Rezeptor-negative Zellen hat der GnRH-II-Agonist keinen Einfluss. Wird die GnRH-I-Rezeptor-Expression in Knock-Down-Experimenten ausgeschaltet, kann die Tumorzellproliferation durch [D-Lys⁶]GnRH-II weiterhin gehemmt werden, GnRH-I-Agonisten wie Triptorelin zeigen in dieser Situation hingegen keine antiproliferative Wirkung mehr (GRÜNDKER ET AL. 2004). Man kann deshalb annehmen, dass neben dem GnRH-I-Rezeptorsystem ein GnRH-II-Rezeptorsystem in gynäkologischen Tumoren existiert.

Die Induktion von Apoptose ist bei der Proliferationshemmung durch GnRH-II-Agonisten nicht beteiligt. Eine Behandlung von humanen Endometrium-, Ovarial-, und Mammakarzinomzellen mit GnRH-II-Antagonisten hingegen führt über eine dosisabhängige Aktivierung von Caspase-3 zur Induktion von Apoptose *in vitro* (vgl. Abbildung 3 FISTER ET AL. 2009). Die antitumorale Wirkung der GnRH-II-Antagonisten konnte *in vivo* bestätigt werden. Sie hemmen das Wachstum von Xenontransplantaten humaner Endometrium-, Ovarial-, und Mammakarzinomzellen in Nacktmäusen signifikant ohne sichtbare Nebenwirkungen (FISTER ET AL. 2007 sowie GRÜNDKER ET AL. 2010). In Abbildung 4 ist der GnRH-II-Antagonist Ant-3 dargestellt, der die höchste Wirksamkeit in den *in-vivo*-Versuchen zeigte.

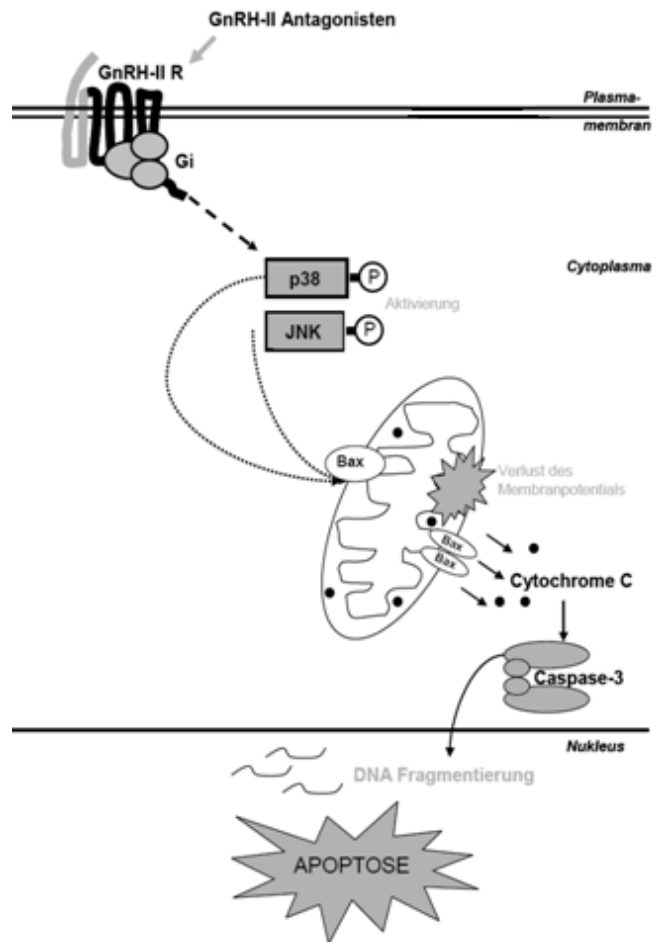


Abbildung 3: Induktion von Apoptose durch GnRH-II-Antagonisten über Aktivierung der Caspase-3 (mod. nach FISTER ET AL. 2009, S. 6479)

Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse scheinen GnRH-II-Antagonisten geeignete Wirkstoffe für eine wenig toxische endokrine Therapie gynäkologischer Karzinome darzustellen.

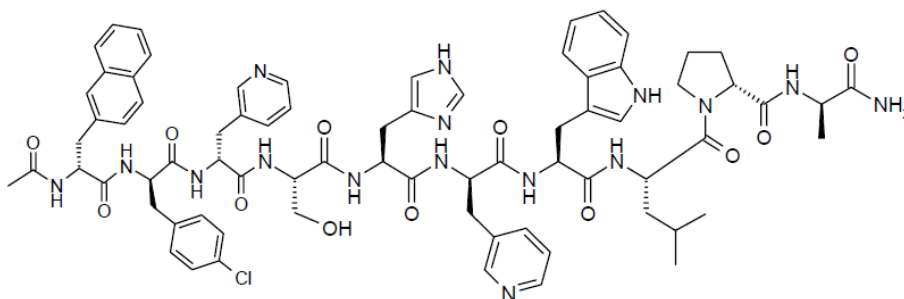
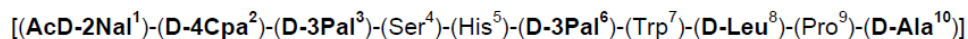


Abbildung 4: Strukturformel des GnRH-II-Antagonisten Ant-3

1.3 Glykolyseinhibition zur Tumorthherapie

Unter physiologischen Bedingungen beziehen gesunde Zellen ihre Energie in Form von ATP über die mitochondriale oxidative Phosphorylierung (CHEN ET AL. 2007). In den meisten Tumorzellen hingegen findet sich eine gesteigerte Glykolyse von D-Glukose zur Energiegewinnung, was als Warburg-Effekt beschrieben ist (WARBURG 1930). Zudem exprimieren viele Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe eine erhöhte Anzahl des Glukosetransporters Glut 1 (YAMAMOTO ET AL. 1990). Die genauen molekularen Mechanismen, die zu diesen metabolischen Veränderungen führen, sind noch nicht vollständig erforscht, aber die erhöhte Glut 1-Expression und die zentrale Bedeutung der Glykolyse in Tumorzellen stellen einen attraktiven Angriffspunkt in der Tumorthherapie dar (PELICANO ET AL. 2006).

2-Deoxy-D-Glukose (2DG) ist ein Glukoseanalogon (vgl. Abbildung 5), das zu einer Glykolyseinhibition und einem Abfall der ATP-Produktion führt (KAPLAN ET AL. 1990 sowie LASZLO ET AL. 1960).

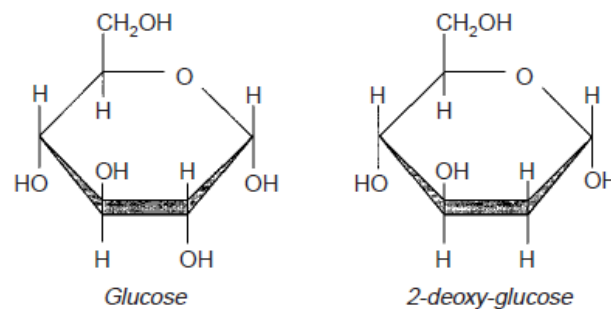


Abbildung 5: Strukturformel von 2DG im Vergleich zu D-Glukose (AFT ET AL. 2002, S. 806)

Als einzigen Unterschied zur D-Glukose besitzt 2-Deoxy-D-Glukose am zweiten Kohlenstoffatom ein H-Atom statt einer Hydroxylgruppe. Durch diese strukturelle Ähnlichkeit konkurriert es mit D-Glukose um die Aufnahme in die Zellen. 2DG wird wie D-Glukose über den Glukosetransporter Glut 1 in die Zelle aufgenommen und durch die Hexokinase zu 2-Deoxy-D-Glukose-6-Phosphat (2DG-P) phosphoryliert. Im Gegensatz zur phosphorylierten D-Glukose kann 2DG-P nicht weiter verstoffwechselt werden und akkumuliert in der Zelle, wodurch die Glykolyse inhibiert wird. Der resultierende ATP-Abfall führt *in vitro* zu einem Zellzyklusarrest und schließlich zum Zelltod

AFT ET AL. zeigten 2002 an Brustkrebszelllinien *in vitro*, dass eine Behandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose zu einer Aktivierung des Enzyms Caspase-3 führt, das zu den apoptose-induzierenden Effektor-Caspasen zählt. Die Apoptoseinduktion durch 2DG konnte auch für andere solide Tumoren bestätigt werden (BELL ET AL. 1998 sowie LEE ET AL. 1997). Am Mausmodell konnte ein glykolyseinhibierender Effekt ohne Nebenwirkungen bei einer Dosierung bis zu LD₅₀ = 2g / kg KG nachgewiesen werden (LANDAU & LUBS 1958).

In klinischen Phase-I/II- Studien an Glioblastom-Patienten wurde gezeigt, dass 2-Deoxy-D-Glukose außerdem zu einer Verbesserung der Strahlentherapie beiträgt, indem es die Strahlensensibilität maligner Tumorzellen erhöht (MOHANTI ET AL. 1996).

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse stellt 2-Deoxy-D-Glukose durch seine antiproliferative und apoptoseinduzierende Wirkung auf solide Tumoren sowie die zentrale Bedeutung der Glykolyse in malignem Gewebe ein rationales Therapieprinzip in der Onkologie dar.

1.4 Kombinationstherapie

Auch wenn viele Einzelsubstanzen für die Karzinombehandlung *in vitro* eine sehr effektive Wirkung zeigen, so kommt es in der klinischen Anwendung oft zu erheblichen dosislimitierenden Nebenwirkungen oder die erforderliche Wirkdosis kann den Patienten häufig nicht verabreicht werden. Vor diesem Hintergrund sind Kombinationstherapien ein innovativer Ansatz.

Das Prinzip der Kombinationstherapie beinhaltet eine Behandlung mit mehreren Einzelkomponenten und findet in der antitumoralen Therapie häufig Verwendung. Dabei werden Substanzen mit unterschiedlichen Angriffspunkten und Wirkmechanismen kombiniert, wodurch sowohl additive als auch synergistische Effekte erzielt werden können. Dadurch ist es möglich, die Dosis der Einzelsubstanzen zu verringern und mögliche Nebenwirkungen zu reduzieren oder zu vermeiden und trotzdem den gewünschten antitumoralen Effekt zu erzielen. Eines der ersten Beispiele für die Entwicklung einer auch heute noch etablierten Kombinationstherapie ist das Chemotherapie-Schema CHOP, bestehend aus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison, welches zur Behandlung maligner Lymphome eingesetzt wird (McKELVEY ET AL. 1976). Auch in der Behandlung solider Tumore kam es zur Entwicklung einer Vielzahl von Kombinationstherapien, die in die aktuellen Leitlinien aufgenommen werden konnten (BELANI 2000 sowie MAYER 2009).

Für den Glykolyseinhibitor 2-Deoxy-D-Glukose konnte *in vitro* bereits gezeigt werden, dass bei einer Behandlung in Kombination mit Doxorubicin oder Cisplatin eine erhöhte Zytotoxizität erzielt werden kann (MASCHEK ET AL. 2004 sowie SIMONS ET AL. 2007)

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Auch wenn die Therapie der Wahl bei Patientinnen mit gynäkologischen Karzinomen die Operation darstellt, so ist die Prognose bei inoperablen, chemotherapieresistenten oder rezidivierenden Karzinomen meist infaust. Für diese Patientinnen werden weiterhin innovative Therapieoptionen gesucht.

Mit den Versuchen dieser Arbeit sollte präklinisch evaluiert werden, ob die Kombination aus Glykolyseinhibition und rezeptorvermittelter Therapie mit GnRH-Analoga zur Therapie gynäkologischer Karzinome geeignet ist. Folgende Fragen wurden deshalb experimentell adressiert:

- 1) Exprimieren die gynäkologischen Karzinome die GnRH-Rezeptoren?
- 2) Kommt es bei kombinierter Gabe aus Glykolyseinhibitor und GnRH-Analagon zu einer verstärkten zytostatischen Effektivität und über welche Mechanismen kommt diese zustande?
- 3) Lassen sich aus den Ergebnissen Hypothesen für eine mögliche klinische Anwendbarkeit der verwendeten Kombinationstherapie formulieren?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Absaugsystem EcoVac	Schütt Labortechnik, Göttingen
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav 2540EL	Tuttnauer, Breda (Niederlande)
Blot-Apparatur	peqlab, Erlangen
Eismaschine	ZIEGRA, Isernhagen
Elektrophorese-Apparatur	Apelex, Lisses (Frankreich)
Gasbrenner	Schütt Labortechnik, Göttingen
Gefrieranlagen:	
- -150 °C	Air Liquide, Düsseldorf
- -80 °C	Forma Scientific, Braunschweig
- -20 °C	Liebherr, Biberach
Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCT	Heidolph, Bremen
Mikroskope:	
- Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
- Olympus, IX 51	Olympus, Hamburg
Multi-Detection Microplate Reader	BIO-TEK, Bad Friedrichshall
Neubauer-Zählkammer 0,0025 mm ²	Brand Gläser, Wertheim
Pipetten:	
- Einfach-Pipetten, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
- Mehrkanal-Pipette, 50 µl	Thermo Labsystems, Egelsbach
- Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm	Kodak GmbH, Stuttgart
Röntgenfilm-Kassette	Procon x-Ray GmbH, Garbsen
Röntgenfilm-Prozessor X-Ray SRS-101A	Konica Minolta, München
Rollenmischer	Dunstable Beds, England

Sterilwerkbank Lamin air LFM 24725	Heraeus, Osterode
Thermoshaker	Biometra, Göttingen
Trockenschrank	Forma Scientific, Braunschweig
Überkopfschüttler	Heto, Wettenberg
Vortex REAX top	Heidolph, Bremen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wipptisch	GFL, Burgwedel
Zentrifugen:	
- Biofuge pico	Heraeus, Osterode
- Labofuge, Ausschwingmotor	Heraeus, Osterode
- Tischkühlzentrifuge 3K30	Sigma Laborzentrifugen, Deisenhofen

2.1.2 EDV

Adobe Photoshop 7.0.1	Adobe Systems, San Jose (USA)
AxioVision 3.1	Zeiss, Oberkochen
GraphPad Prism® 5.03 für Windows	GraphPad Software, San Diego California (USA)
Microsoft Office XP Version 2007	Microsoft, Redmond (USA)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Ampuwa®	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Combitips plus	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser	Menzel Gläser, Braunschweig
Einfrierboxen	Nalgene Labware, Rochester (USA)
Gewebekulturflaschen - 75 cm ²	Nunc, Roskilde (Dänemark)
Lab-Tek Chamber Slide™	Thermo Scientific, Waltham (USA)

Multiwell-Platten:

- 6-Well-Platte	Becton Dickinson, Heidelberg
- 96-Well-Platte	Becton Dickinson, Heidelberg
- 96-Well-Platte schwarz	Greiner Bio-One, Essen
Objektträger, 76 x 26 mm, Mattrand	Knittel Gläser, Braunschweig
Parafilm	Pechiney, Düsseldorf
Pipetten:	
- Pasteurpipetten, 150 mm, 230 mm	WU, Mainz
- Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Braunschweig
Pipettenspitzen, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Braunschweig
Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Kryoröhrchen 1,8 ml	Nalgene Labware, Rochester (USA)
Sterilfilter	Sarstedt, Braunschweig

2.1.4 Chemikalien

alamarBlue®	AbD Serotec, Düsseldorf
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
CelLytic™ M Cell Lysis Reagent	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue	Bio-rad, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Foetal calf Serum (FCS)	PAA, Linz (Österreich)
Glutamin	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	USB, Staufen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	BioRad, München

Methanol	J. T. Baker, Griesheim
Natriumchlorid	USB, Staufen
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAN, Aidenbach
Prosieve 50 Gel Solution	Cambrex, Wiesbaden
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Transferrin	Sigma Aldriche, St. Louis (USA)
Tris	USB, Staufen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypan-Blau (0,4 %)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-EDTA 0,05 %	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20, Sigma Ultra	Sigma, Deisenhofen

2.1.5 Kits

DeadEnd TM Fluorometric TUNEL System	Promega, Mannheim
ECL TM Immobilon Western	Millipore, Schwalbach
JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Assay Kit	Biotium, Köln

2.1.6 Proteine, Proteinaseinhibitoren und Proteinstandards

Proteinaseinhibitorcocktail	Sigma, Deisenhofen
Proteinstandard peqGold	peqlab, Erlangen
Rinderserumalbumin (BSA, 100 x)	New England Biolabs, Ipswich (USA)

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Primärantikörper

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Herkunft / Referenz
Aktin	Kaninchen	1:1000	Epitomics, Burlingame (USA)
Aktive Caspase-3	Kaninchen	1:1000	Abcam, Cambridge (UK)
GnRH-I-Rezeptor	Kaninchen	1:1000	Eigene Herstellung
GnRH-II-Rezeptor	Kaninchen	1:500	Eigene Herstellung

2.1.7.2 Sekundärantikörper

Folgender Sekundärantikörper wurde im Western-Blot 1 : 40000 in TBS-Tween verdünnt eingesetzt:

Esel anti-Kaninchen IgG, HRP-Konjugat

GE Healthcare, München

2.1.8 Versuchssubstanzen

2.1.8.1 2-Deoxy-D-Glukose

Tabelle 2: 2-Deoxy-D-Glukose

Substanz	Stammlösung	Herkunft
2-Deoxy-D-Glukose Grade III (164,16 g/mol)	1 mM (in Ampuwa)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

2.1.8.2 AN-152

Tabelle 3: AN-152

Substanz	Stammlösung	Herkunft
AEZS-108 (2133,23 g/mol)	5×10^{-4} M (in PBS)	Aeterna Zentaris, Frankfurt

2.1.8.3 GnRH-II-Antagonist

Tabelle 4: GnRH-II-Antagonist Ant-3

Substanz	Stammlösung	Herkunft
[Ac-D2NaI ¹ , D-4Cpa ² , D-3Pal ^{3,6} , Leu ⁸ , D-Ala ¹⁰]GnRH-II (1425,6 g/mol)	5×10^{-4} M (angelöst in 1 N Essigsäure, in PBS)	Eigenentwicklung und Auftragssynthese durch Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg

2.1.9 Medien für die Zellkultur und Versuche

Für die Kultur der Zelllinien wurde MEM-Earl Kulturmedium w Phenolrot als Grundmedium verwendet, welches mit 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FCS, 50 IU Insulin und 1 µg / ml Transferrin supplementiert wurde.

Zur Kryokonservierung diente MEM-Earl Kulturmedium mit 20 % FCS und 10 % DMSO.

Als Hungermedium wurde MEM-Earl w/o Phenolrot verwendet. Supplementiert wurde es mit 1 % Penicillin/Streptomycin, 5 % FCS, 50 IU Insulin, 1 µg / ml Transferrin, 2 % Glutamin und 1,1 g Natriumhydrogencarbonat.

2.1.10 Zelllinien

Tabelle 5: Verwendete humane Zelllinien

Zelllinie	Entität	Herkunft	Referenz
AN3 CA	Endometrium, Adenokarzinom	ATCC, Wesel	DAWE ET AL. 1964
EFO-21	Ovar, Adenokarzinom	DSMZ, Braunschweig	SIMON ET AL. 1983
HEC-1-A	Endometrium, Adenokarzinom	ATCC, Wesel	KURAMOTO 1972
NIH:OVCAR-3	Ovar, Adenokarzinom	ATCC, Wesel	HAMILTON ET AL. 1983

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellzahlbestimmung mit Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer. Dabei wurde aus einem Aliquot der Zellsuspension eine Verdünnung von 1:5 bis 1:20 mit Trypan-Blau hergestellt. Durch Trypan-Blau ist es möglich, vitale von letalen Zellen zu unterscheiden, da es die Membranen letaler Zellen blau färbt. Zur Ermittlung der vitalen Zellen wurden die ungefärbten Zellen in vier Großquadranten einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellzahl wurde anschließend nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl [ml}^{-1}\text{]} = (\text{Mittelwert der vier Großquadranten}) \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Ausgangsvolumen}$$

2.2.2 Kultivieren von Zellen

Alle Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert und jeden zweiten Tag mit frischem, vorgewärmtem Kulturmedium versorgt. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten an einer Sterilwerkbank.

Je nach Wachstumseigenschaften der jeweiligen Zelllinie wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen passagiert. Beim Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % wurde zunächst sämtliches Medium abgesaugt, die Kulturflasche mit PBS gewaschen und anschließend vorgewärmtes Trypsin-EDTA hineingegeben und bei 37° C inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von Kulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension mit 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Resuspension des Zellpellets mit Kulturmedium wurden die Zellen ausgedünnt wieder in Kultur genommen.

2.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Einfriermedium	MEM-Earl Kulturmedium mit 20 % FCS
	10 % DMSO

Zur Langzeitkonservierung wurde, nach vorheriger Konzentrationsbestimmung, die Zellsuspension in der Zentrifuge mit 1200 rpm für 5 min bei RT pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Je 1 ml dieser Zellsuspension wurde in zuvor beschriftete Kryoröhrchen überführt und zunächst über Nacht bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -150 °C gelagert.

2.2.4 Revitalisieren von Zellen

Das Revitalisieren der Zellen erfolgte durch kurzes Antauen des entsprechenden Kryoröhrchens im Wasserbad bei 37 °C. Die Zellsuspension wurde dann in ein Falcon Tube mit 9 ml Kulturmedium überführt und in der Zentrifuge mit 1200 rpm für 5 min bei RT pelletiert. Dieser Waschschrift diente dem Entfernen von DMSO. Anschließend wurde das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine 75 cm² große Zellkulturflasche überführt.

2.2.5 alamarBlue® Proliferations-Assay

Um das Proliferationsverhalten der Zellen zu untersuchen, wurde der alamarBlue® Assay verwendet. Bei diesem Assay wird die Anzahl lebender Zellen indirekt durch die Bestimmung der mitochondrialen metabolischen Aktivität (Elektronentransport) der Zellen bestimmt. Die Umsetzung des Farbstoffes alamarBlue®, von seinem oxidierten Zustand in den reduzierten Zustand, basiert dabei auf der Atmungskettenaktivität der Mitochondrien (AHMED ET AL. 1994).

alamarBlue® enthält den ungiftigen, wasserlöslichen, in oxidierte Form blauen Redox-Indikator Resazurin, der bei Reduktion zu rot fluoreszierendem Resorufin umgesetzt wird. Vitale, proliferierende Zellen verursachen eine Reduktion des Indikators und dadurch eine

Rotfärbung. Diese Farbänderung kann mit der UV-Spektrometrie und der Fluoreszenzspektrometrie gemessen werden. Ist die Proliferation und somit die Umsetzung gehemmt, fällt der Farbumschlag geringer aus.

Je nach Zelllinie wurde eine bestimmte, vorher ermittelte Anzahl an Zellen in 96-Well-Platten 24 h vor Versuchsbeginn ausgesät. Behandelt wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen 2DG, AN-152, GnRH-II-Antagonist und jeweils entsprechenden Kombinationen. Als Kontrolle diente Medium. Die Zellen wurden anschließend über 96 h inkubiert und nach Zugabe des alamarBlue®-Farbstoffes erfolgte die spektralphotometrische Messung bei $\lambda = 570$ nm und als Referenz bei $\lambda = 630$ nm im Multi-Detection Microplate Reader.

2.2.6 Zytotoxizitäts-Assay

2.2.6.1 *JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Assay*

10X Assay Puffer 1 : 10 mit destilliertem Wasser

JC-1-Reagenz 1 : 100 mit 10X Assay Puffer

Mit dem JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Assay wurde die zytostatische Wirkung der Versuchssubstanzen untersucht.

Eine der frühesten, charakteristischen Veränderungen des Apoptose-Prozesses ist der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, der durch Porenbildung in der Mitochondrienmembran zustande kommt. Der lipophile, kationische Fluoreszenzfarbstoff JC-1 kann sowohl die Plasmamembran als auch die Mitochondrienmembran passieren und eignet sich so zur Bestimmung des elektrochemischen Gradienten (SMILEY ET AL. 1991).

In vitalen Zellen reichert sich der Farbstoff im negativ geladenen Inneren der Mitochondrien an und bildet dort rot fluoreszierende Aggregate. In apoptotischen Zellen herrscht ein geringeres Membranpotential, wodurch JC-1 keine Aggregate bilden kann und als grün fluoreszierendes Monomer im Zellplasma vorliegt.

Die Inkubation der Zellen mit den Einzelsubstanzen und den Kombinationen erfolgte über 48 h. Zur Bestimmung des mitochondrialen Membranverlustes wurde der JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Assay nach Angaben des Herstellers verwendet. Die anschließende Messung erfolgte im Multi-Detection Microplate Reader.

2.2.6.2 TUNEL Assay

Ein charakteristisches Zeichen der späten Apoptose ist die Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen (SCHWARTZMAN & CIDLOWSKI 1993). An den Strangbrüchen der DNA entstehen freie 3'-OH-Enden, durch die sich apoptotische Zellen von nicht-apoptotischen Zellen unterscheiden lassen. Die entstandenen 3'-OH-Enden werden beim TUNEL Assay mit Hilfe einer terminalen Deoxynukleotidyl-Transferase mit Fluoreszin-12-dUTP markiert, wodurch die apoptotischen Zellen im Fluoreszenzmikroskop grün fluoreszierend dargestellt werden können (GAVRIELI ET AL. 1992). Im Gegensatz zu den grün fluoreszierenden apoptotischen Zellen stellen die nicht-apoptotischen Zellen sich rot dar und können so unterschieden werden.

Das DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System wurde an mit den Versuchsubstanzen behandelten Zellen durchgeführt und nach Herstellerangaben verwendet.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Herstellung der Western-Blot-Lysate

Zur Herstellung der Zelllysate wurden die jeweiligen Zellpellets zweimal mit PBS gewaschen und danach mit 1200 rpm für 10 min bei RT pelletiert. Je nach Größe wurden die Pellets in einem bestimmten Volumen Lysispuffer aufgenommen und in vorbereitete 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Um den Proteinabbau zu verhindern, wurde ein Proteaseinhibitorcocktail hinzugegeben. Es folgten 15 min bei RT und 800 rpm auf dem Schüttler und eine Zentrifugation mit 13.000 rpm bei 4° C für 25 min. Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und einer Proteinbestimmung zugeführt oder bei –80° C gelagert.

2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

(BRADFORD 1976)

Der Proteingehalt der Lysate wurde mit der Methode nach Bradford quantitativ bestimmt.

Durch die Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue an die Seitenketten von Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm hin zu 595 nm. Die Absorptionzunahme bei 595 nm, die sich durch einen Farbumschlag zeigt, ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lysate und kann photometrisch gemessen werden.

Zunächst wurde eine BSA-Lösung von 1 mg/ml mit Aqua bidest. hergestellt, aus der dann gemäß Tabelle 6 die Eichgerade pipettiert wurde.

Tabelle 6: Pipettierschema für die Eichgerade zur Proteinbestimmung

Eichgerade [mg/ml]	0	0,2	0,4	0,8	1,6
H ₂ O [μl]	5	4,5	4	3	1
BSA-Lsg. [μl]	0	0,5	1	2	4

Der Farbstoff Coomassie wurde 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt und filtriert. Die Lysate wurden jeweils 1:20 mit Aqua bidest. verdünnt. 50 μl der verdünnten Lysate und des Standards wurden mit 2,5 ml verdünnter Coomassie-Lösung versetzt und für 20-30 min inkubiert. Anschließend wurden je 350 μl jeder Probe in je ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Die Messung erfolgte bei $\lambda = 595$ nm im Multi-Detection Microplate Reader. Anhand der Eichgerade und der gemessenen Absorption der Proben konnte die jeweilige Proteinkonzentration berechnet werden.

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laufpuffer	6,06 g Tris 28,83 g Glycin 2,0 g 10 % SDS auf 2 l Aqua bidest.
Laemmli-Probenpuffer	1,6 ml Glycerin 3,2 ml 10 % SDS 2 ml 0,5 M Tris/HCl (pH = 6,8) 1,28 g DTT 0,4 ml 0,05 % Bromphenolblau 8 ml Aqua bidest.
Proteinstandard peqGOLD	peqlab, Erlangen

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei binden die Proteine im Überschuss zugesetztes Detergens (SDS) und tragen dann eine beständige negative Ladung, wodurch sie zur Anode wandern. Die negative Ladung der Proteine ist zu ihrem Molekulargewicht proportional und so erfolgt eine Auftrennung der SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix nach der Molmasse.

Bei der verwendeten Methode nach Laemmli (1970) wurden die Lysate zunächst in einem Sammelgel mit 5 % Polyacrylamid (vgl. Tabelle 7) konzentriert und dann in einem Trenngel mit 15 % Polyacrylamid (vgl. Tabelle 7) aufgetrennt (LAEMMLI 1970). Für die SDS-PAGE wurde die Elektrophorese-Apparatur nach Herstellerangaben mit den Gelen zusammengesetzt und mit Laufpuffer gefüllt.

Tabelle 7: Sammelgel und Trenngel

Material	Sammelgel Volumen	Trenngel Volumen
Aqua bidest.	3,1 ml	4,3 ml
ProSieve 50 Gel Solution	0,5 ml	3,0 ml
1,0 mM Tris	1,3 ml	2,5 ml
10 % SDS	50 μ l	100 μ l
10 % APS	50 μ l	100 μ l
TEMED	4 μ l	5 μ l

Die vorbereiteten Lysate wurden mit Laemmli-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95° C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde das Gel mit Hilfe einer Mikroliter-spritze beladen. In jedem Gel wurde die erste und letzte Tasche mit Proteinstandard befüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst bei 80 V für 30 min und anschließend bei 150 V für 1 h.

2.3.4 Western-Blot

Transferpuffer	3, 03 g Tris
	14, 41 g Glycin
	200 ml Methanol
	1000 ml Aqua bidest.

Die der Größe nach aufgetrennten Proteine werden bei diesem Verfahren aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen („Transfer“) (TOWBIN ET AL. 1979) um dann durch Reaktion mit spezifischen Antikörpern in der anschließend folgenden Immundetektion nachgewiesen zu werden.

Für den Western-Blot wurde ein Semi-Dry-System verwendet. Hierzu wurden für jedes Gel eine PVDF-Membran sowie sechs Whatman-Filterpapiere zugeschnitten und in Transferpuffer äquilibriert. Die Gele wurden nach der Elektrophorese aus der Elektrophorese-Apparatur entfernt und zusammen mit den äquilibrierten Bestandteilen im Blotmodul nach Herstellerangaben luftblasenfrei geschichtet. Das mit Transferpuffer gefüllte Blotmodul wurde so in die Blotting-Apparatur eingespannt, dass die PVDF-Membran der Anode zugewandt war. Der Transfer erfolgte bei RT mit 0,8 mA/cm² für 1,5 h.

2.3.5 Immundetektion

TBS (10 x)	30 g Tris 80 g NaCl 2 g KCl 900 ml Aqua bidest.; pH 7,5 (HCl)
TBS-Tween	50 ml TBS (10 x) 5 ml 10 % Tween 20 500 ml Aqua bidest.
blocking-Lösung	5 g Magermilchpulver 100 ml TBS-Tween

Zur Detektion der Proteine auf der PVDF-Membran wurde die Membran nach dem Transfer kurz in TBS-Tween gewaschen, um Rückstände von Methanol zu entfernen. Anschließend wurde für 1 h bei RT mit blocking-Lösung auf dem Wipptisch inkubiert. Alle nachfolgenden Waschstschritte in diesem Versuch wurden auf dem Wipptisch in Plastikschaalen bei RT durchgeführt. Nach 3 x 10 min Waschen mit TBS-Tween folgte die Inkubation der Membran über Nacht bei 4° C auf dem Schüttler mit TBS-Tween verdünntem Primärantikörper. Um ein Austrocknen der Membran zu verhindern, wurde die Plastikschaale luftdicht verschlossen. Am Folgetag wurde ungebundener Primärantikörper durch erneutes Waschen der Membran - 2 x 10 min - entfernt. Die Sekundärantikörperinkubation mit in TBS-Tween gelöstem, HRP-konjugiertem Antikörper erfolgte auf dem Wipptisch für 1 h bei RT. Anschließend wurde die Membran wieder 3 x 10 min in TBS-Tween gewaschen, um so ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Für die Detektion des Chemolumineszenzsignals wurde die Membran für 1 min in dem ECL-System inkubiert und in transparente Plastikfolie gelegt.

Die Dokumentation des Signals erfolgte mittels spezieller Röntgenfilme, die nach der Exposition in einer Röntgenfilmkassette im X-Ray Film Prozessor SRS-101A in einer Dunkelkammer entwickelt wurden. Die Belichtungszeiten wurden dabei von 1 sek bis zu 30 min gewählt.

2.4 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism® 5.03 für Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) durchgeführt. Es wurden Unterschiede von $p < 0,05$ als signifikant gewertet.

2.4.1 One-way ANOVA mit Newman-Keuls Multiple Comparison Test

Die One-way ANOVA mit anschließendem Newman-Keuls Multiple Comparison Test testet den Einfluss zweier variabler Faktoren auf die Messwerte eines Experimentes sowie deren Interaktion. Sie fand bei der statistischen Auswertung des alamarBlue® Proliferations-Assay und des JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Assay unter verschiedenen Konzentrationen im Vergleich untereinander und zur Kontrolle mit Lösungsmittel Verwendung.

Die Kontrolle wurde bei allen Versuchen 1.0 gesetzt, was 100 % entspricht.

3 Ergebnisse

3.1 GnRH-Rezeptor-Expression in gynäkologischen Karzinomzelllinien

Die Expression des GnRH-I- und GnRH-II-Rezeptors in den verwendeten Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien wurde mittels Western-Blot untersucht.

Nach Lyse der Zellen erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine mit anschließendem Western-Blot und Immundetektion (vgl. Kapitel 2.3, S. 20). Das in Abbildung 6 dargestellte Ergebnis bestätigt bei allen vier Zelllinien sowohl die Expression des GnRH-I-Rezeptors als auch die Expression des GnRH-II-Rezeptors.

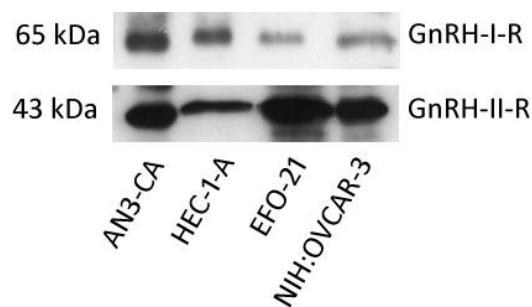


Abbildung 6: GnRH-Rezeptornachweis mittels Western-Blot

Die vier Zelllinien wurden mittels Western-Blot auf Expression des GnRH-I- und GnRH-II-Rezeptor untersucht. Die Expression beider Rezeptoren konnte für alle Zelllinien nachgewiesen werden.

3.2 Analyse der antiproliferativen Wirkung

3.2.1 2-Deoxy-D-Glukose und AN-152

Um herauszufinden, welchen Effekt 2-Deoxy-D-Glukose und AN-152 auf Endometrium- und Ovarialkarzinomzellen haben, wurde das Proliferationsverhalten der Zelllinien unter Exposition der Einzelsubstanzen und ihrer Kombination untersucht.

Hierzu wurden die Zelllinien AN3-CA, HEC-1-A, EFO-21 und NIH:OVCAR-3 in Hungermedium ausgesät und für 96 h mit ansteigenden Konzentrationen 2-Deoxy-D-Glukose (5 mM, 10 mM, 20 mM), ansteigenden Konzentrationen AN-152 (10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-5} M) und mit unterschiedlichen Kombinationen aus beiden inkubiert. Als Kontrolle diente Hungermedium. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen mit Hilfe des alamarBlue® Assay ermittelt (vgl. Kapitel 2.2.5). Die Versuche wurden als Triplikate in drei unabhängigen Experimenten und in drei verschiedenen Passagen wiederholt. Abbildung 7 und Abbildung 8 zeigen die Ergebnisse.

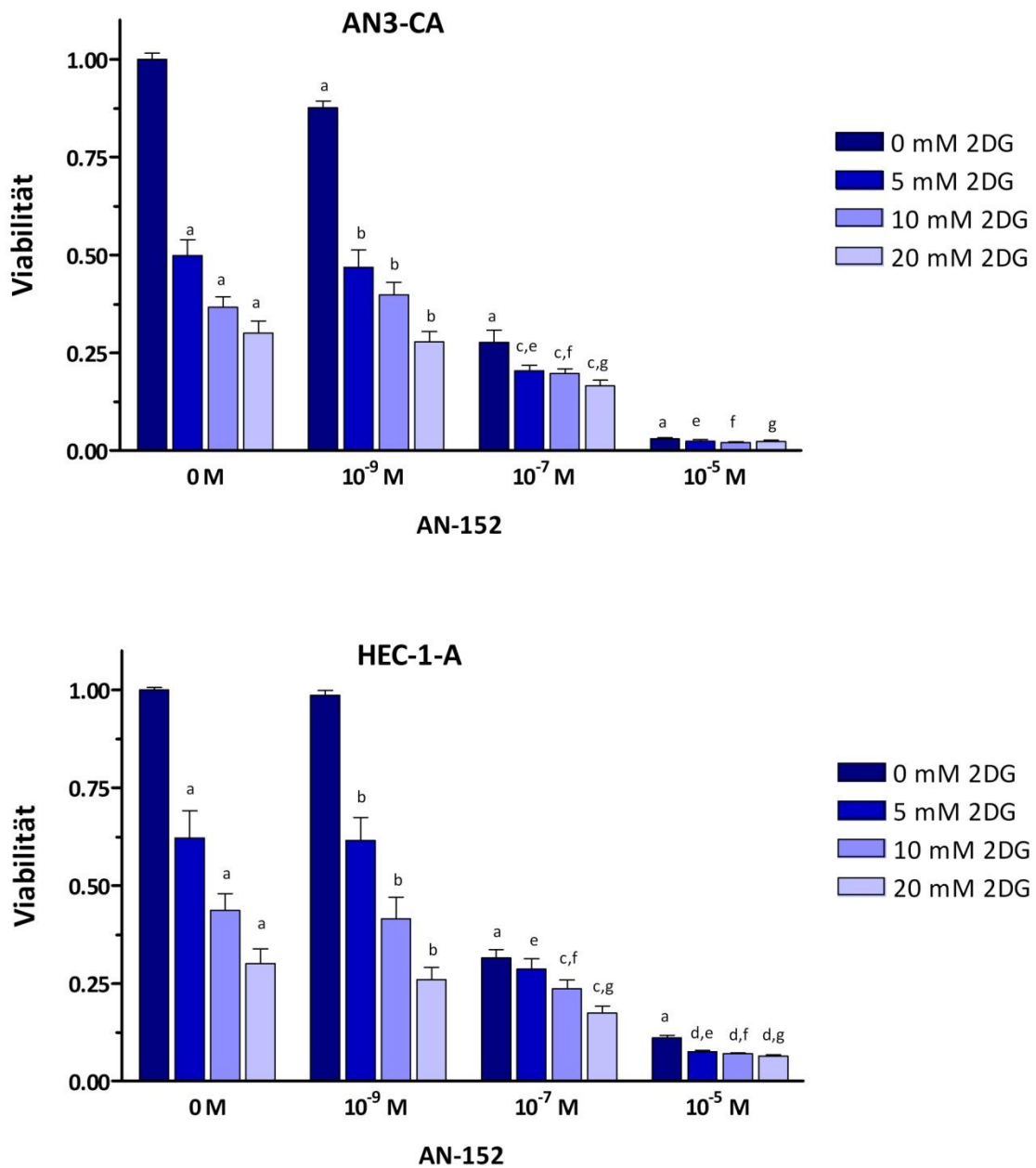


Abbildung 7: Proliferationshemmung der Endometriumkarzinomzelllinien AN-3CA und HEC-1-A

Behandelt wurde über 96h mit unterschiedlichen Einzeldosen AN-152, unterschiedlichen Einzeldosen Glykolyseinhibitor 2-Deoxyglukose (2DG) und jeweils entsprechenden Kombinationen (Kontrolle MEM-Zellkulturmedium). Die antiproliferative Wirkung wurde mittels alamarBlue Assay im Multidetektion Reader ermittelt. a, $p < 0,05$ vs. 0 M AN-152 / 0 M 2DG; b, $p < 0,05$ vs. 10^{-9} M AN-152 / 0 M 2DG; c, $p < 0,05$ vs. 10^{-7} M AN-152 / 0 M 2DG; d, $p < 0,05$ vs. 10^{-5} M AN-152 / 0 M 2DG; e, $p < 0,05$ vs. 0 M AN-152 / 5 mM 2DG; f, $p < 0,05$ vs. 0 M AN-152 / 10 mM 2DG; g, $p < 0,05$ vs. 0 M AN-152 / 20 mM 2DG

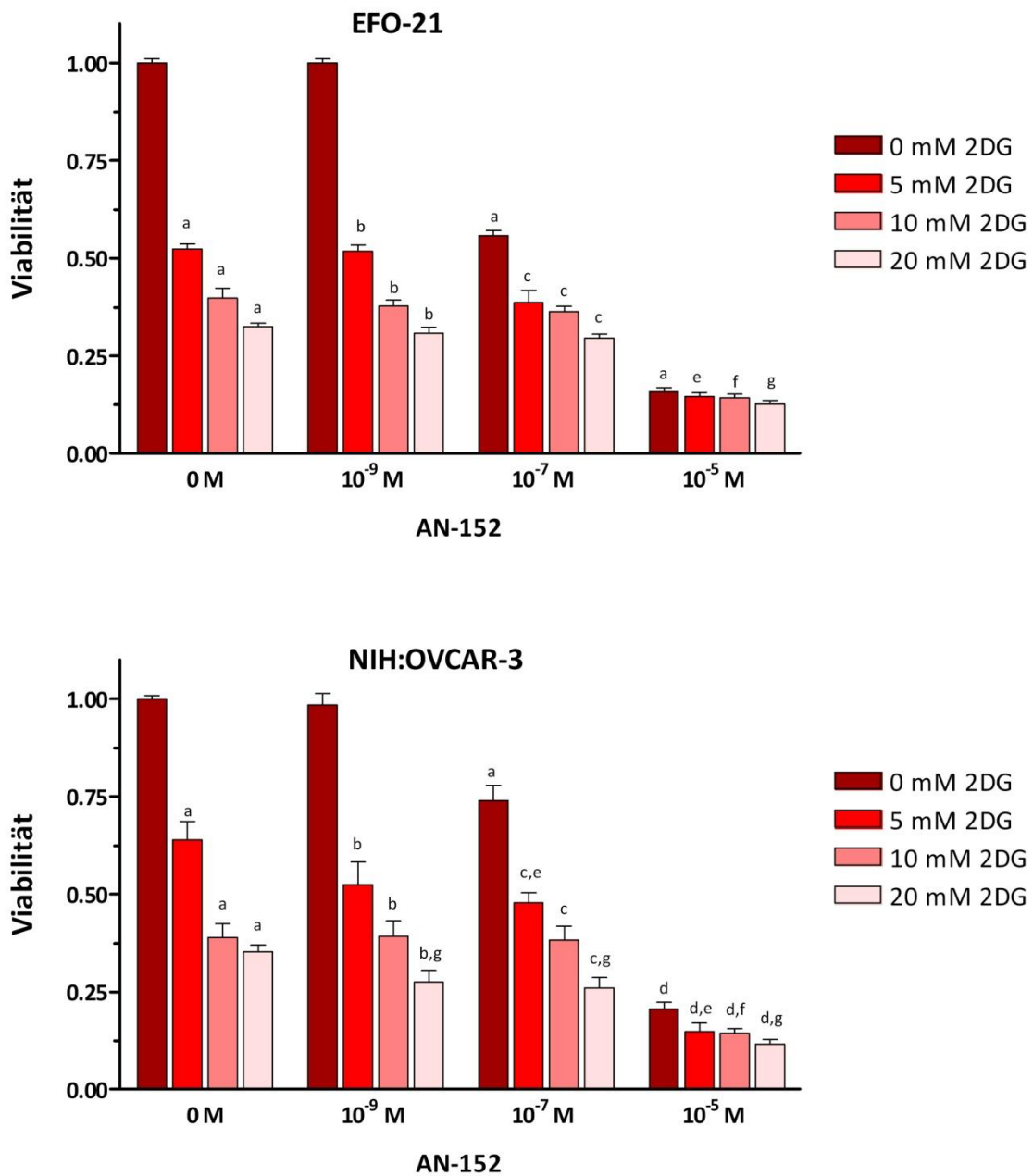


Abbildung 8: Proliferationshemmung der Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und NIH:OVCAR-3

Behandelt wurde über 96h mit unterschiedlichen Einzeldosen AN-152, unterschiedlichen Einzeldosen Glykolyseinhibitor 2-Deoxyglukose (2DG) und jeweils entsprechenden Kombinationen (Kontrolle MEM-Zellkulturmedium). Die antiproliferative Wirkung wurde mittels alamarBlue Assay im Multidetektion Reader ermittelt. a, $p < 0,05$ vs. 0 M AN-152 / 0 M 2DG; b, $p < 0,05$ vs. 10^{-9} M AN-152 / 0 M 2DG; c, $p < 0,05$ vs. 10^{-7} M AN-152 / 0 M 2DG; d, $p < 0,05$ vs. 10^{-5} M AN-152 / 0 M 2DG; e, $p < 0,05$ vs. 0 M AN-152 / 5 mM 2DG; f, $p < 0,05$ vs. 0 M AN-152 / 10 mM 2DG; g, $p < 0,05$ vs. 0 M AN-152 / 20 mM 2DG

Bei allen vier Zelllinien zeigte sich sowohl beim Glykolyseinhibitor 2DG als auch bei dem Hybridwirkstoff AN-152 eine dosisabhängige Proliferationshemmung. 2-Deoxy-D-Glukose hemmte in Konzentrationen ab 5 mM signifikant das Wachstum aller vier Zelllinien. AN-152 zeigte bei der Zelllinie AN3-CA einen signifikant höher antiproliferativen Effekt ab 10^{-9} M und bei den übrigen drei Zelllinien ab 10^{-7} M.

Die Kombination aus beiden Substanzen hemmte das Wachstum aller Zelllinien stärker als die Einzelsubstanzen. Bei den Zelllinien AN3-CA und EFO-21 ergaben sich signifikant geringere Zellzahlen bei der Kombination aus AN-152 10^{-9} M und 2-Deoxy-D-Glukose (5 mM, 10 mM, 20 mM) im Vergleich zur Einzelbehandlung mit AN-152 10^{-9} M und bei Kombination aus AN-152 10^{-7} M und 2-Deoxy-D-Glukose (5 mM, 10 mM, 20 mM) im Vergleich zur Einzelbehandlung mit AN-152 10^{-7} M. Bei den Zelllinien HEC-1-A und NIH:OVCAR-3 zeigten alle Kombinationen aus AN-152 und 2-Deoxy-D-Glukose eine signifikant höhere Proliferationshemmung im Vergleich zur jeweiligen Einzelkonzentration mit AN-152. Bezogen auf 2-Deoxy-D-Glukose zeigte die Kombination aus 2DG und AN-152 - im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 2DG - bei den Zelllinien AN3-CA, HEC-1-A und NIH:OVCAR-3 ab einer AN-152-Konzentration von 10^{-7} M und bei EFO-21 ab 10^{-5} M eine signifikant höhere Proliferationshemmung. Die Signifikanzen sind in Tabelle 8 ausführlich dargestellt.

Tabelle 8: Statistische Auswertung des Proliferationsassays bei Behandlung mit AN-152 und 2DG

One-way ANOVA mit Newman-Keuls	AN-3CA	HEC-1-A	EFO-21	NIH:OVCAR-3
0 M AN-152:				
20 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
20 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
20 mM 2DG vs. 10 mM 2DG	p > 0,05	p < 0,05	p < 0,01	p > 0,05
10 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001
5 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-9} M AN-152:				
20 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
20 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
20 mM 2DG vs. 10 mM 2DG	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,01	p > 0,05
10 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p > 0,05	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,05
5 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-7} M AN-152:				
20 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
20 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p > 0,05	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,001
20 mM 2DG vs. 10 mM 2DG	p > 0,05	p > 0,05	p < 0,05	p < 0,05
10 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,001
10 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p < 0,05
5 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,05	p > 0,05	p < 0,001	p < 0,001
10^{-5} M AN-152:				
20 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p > 0,05	p < 0,001	p > 0,05	p < 0,01
20 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
20 mM 2DG vs. 10 mM 2DG	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p > 0,05	p < 0,001	p > 0,05	p < 0,05
10 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
5 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p > 0,05	p < 0,001	p > 0,05	p < 0,05

AN-152:				
10^{-5} M AN-152 vs. 0 M AN-152	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-5} M AN-152 vs. 10^{-9} M AN-152	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-5} M AN-152 vs. 10^{-7} M AN-152	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-7} M AN-152 vs. 0 M AN-152	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-7} M AN-152 vs. 10^{-9} M AN-152	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-9} M AN-152 vs. 0 M AN-152	p < 0,001	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
0 M 2DG:				
10^{-5} M AN-152 vs. 0 M AN-152	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-5} M AN-152 vs. 10^{-9} M AN-152	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-5} M AN-152 vs. 10^{-7} M AN-152	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-7} M AN-152 vs. 0 M AN-152	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-7} M AN-152 vs. 10^{-9} M AN-152	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-9} M AN-152 vs. 0 M AN-152	p < 0,001	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
5 mM 2DG:				
10^{-5} M AN-152 vs. 0 M AN-152	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-5} M AN-152 vs. 10^{-9} M AN-152	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-5} M AN-152 vs. 10^{-7} M AN-152	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001
10^{-7} M AN-152 vs. 0 M AN-152	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05
10^{-7} M AN-152 vs. 10^{-9} M AN-152	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p > 0,05
10^{-9} M AN-152 vs. 0 M AN-152	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 mM 2DG:				
10^{-5} M AN-152 vs. 0 M AN-152	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-5} M AN-152 vs. 10^{-9} M AN-152	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-5} M AN-152 vs. 10^{-7} M AN-152	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001
10^{-7} M AN-152 vs. 0 M AN-152	p < 0,001	p < 0,01	p > 0,05	p > 0,05
10^{-7} M AN-152 vs. 10^{-9} M AN-152	p < 0,001	p < 0,01	p > 0,05	p > 0,05
10^{-9} M AN-152 vs. 0 M AN-152	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
20 mM 2DG:				
10^{-5} M AN-152 vs. 0 M AN-152	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-5} M AN-152 vs. 10^{-9} M AN-152	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-5} M AN-152 vs. 10^{-7} M AN-152	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001
10^{-7} M AN-152 vs. 0 M AN-152	p < 0,001	p < 0,01	p > 0,05	p < 0,05
10^{-7} M AN-152 vs. 10^{-9} M AN-152	p < 0,001	p < 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10^{-9} M AN-152 vs. 0 M AN-152	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p < 0,05
2DG:				
20 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
20 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
20 mM 2DG vs. 10 mM 2DG	p > 0,05	p < 0,05	p < 0,01	p > 0,05
10 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001
5 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

3.2.2 2-Deoxy-D-Glukose und GnRH-II-Antagonist

Mittels alamarBlue® Assay wurde untersucht, welche Wirkung der Glykolyseinhibitor 2-Deoxy-D-Glukose und der GnRH-II-Antagonist Ant-3 einzeln und in Kombination auf das Wachstumsverhalten der Karzinomzelllinien haben.

Nach Aussäen der Zelllinien AN3-CA, HEC-1-A, EFO-21 und NIH:OVCAR:3 in Hungermedium erfolgte eine Inkubation über 96 h mit ansteigenden Konzentrationen 2-Deoxy-D-Glukose (5 mM, 10 mM, 20 mM), ansteigenden Konzentrationen Ant-3 (10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-5} M) und mit den unterschiedlichen Kombinationen aus beiden. Als Kontrolle diente eine Inkubation mit Hungermedium. Die Viabilität wurde mittels alamarBlue® Assay bestimmt (vgl. Kapitel 2.2.5). Die Versuche wurden als Triplikate in drei unabhängigen Experimenten und in drei

verschiedenen Passagen wiederholt. Abbildung 9 und Abbildung 10 stellen den Einfluss der Substanzen auf das Proliferationsverhalten der Zellen graphisch dar.

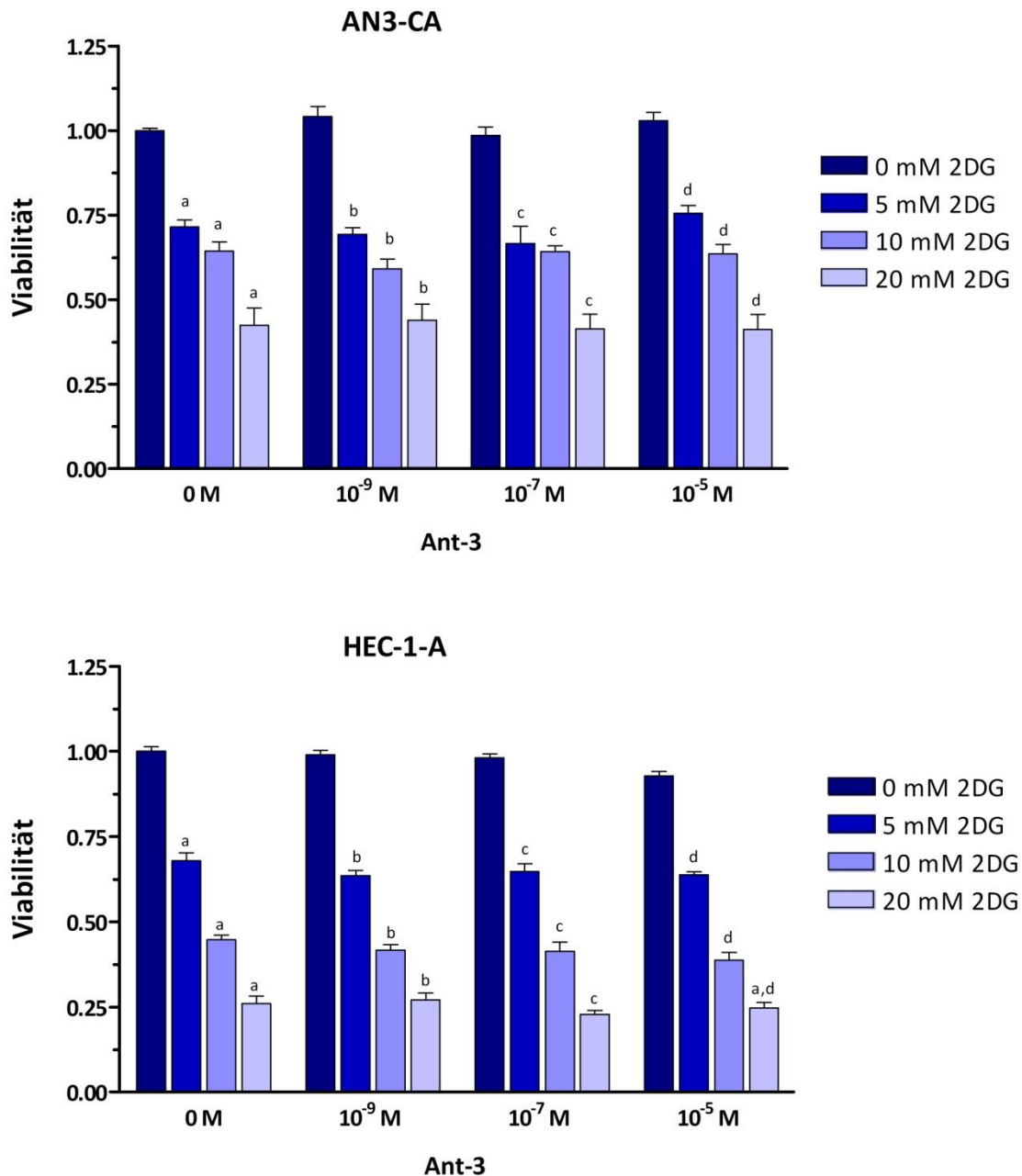


Abbildung 9: Proliferationshemmung der Endometriumkarzinomzelllinien AN-3CA und HEC-1-A

Behandelt wurde über 96h mit unterschiedlichen Einzeldosen Ant-3, unterschiedlichen Einzeldosen Glykolyseinhibitor 2-Deoxyglukose (2DG) und jeweils entsprechenden Kombinationen (Kontrolle MEM-Zellkulturmedium). Die antiproliferative Wirkung wurde mittels alamarBlue Assay im Multidetektion Reader ermittelt. a, $p < 0,05$ vs. 0 M Ant-3 / 0 M 2DG; b, $p < 0,05$ vs. 10⁻⁹ M Ant-3 / 0 M 2DG; c, $p < 0,05$ vs. 10⁻⁷ M Ant-3 / 0 M 2DG; d, $p < 0,05$ vs. 10⁻⁵ M Ant-3 / 0 M 2DG

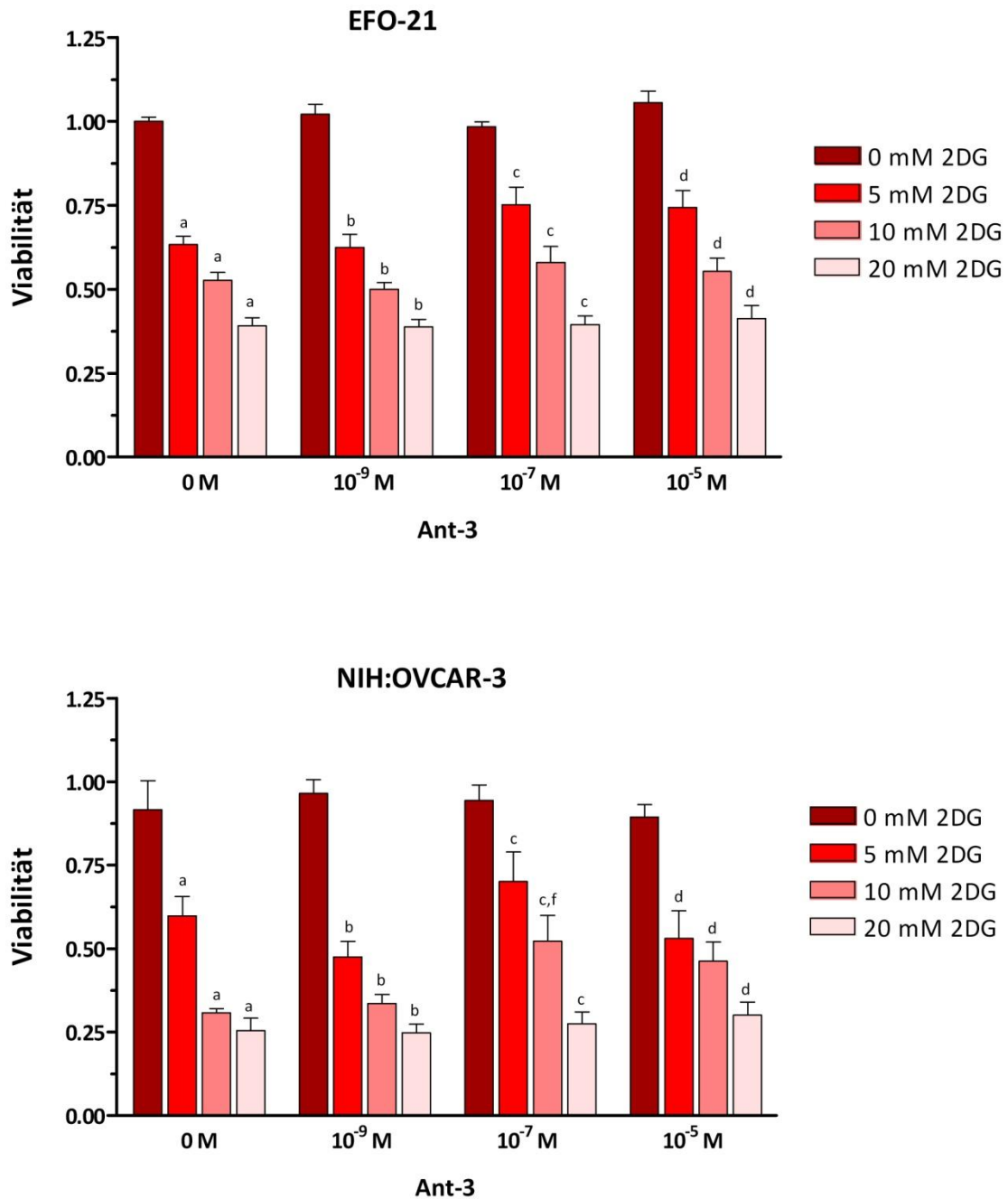


Abbildung 10: Proliferationshemmung der Endometriumkarzinomzelllinien EFO-21 und NIH:OVCAR-3

Behandelt wurde über 96h mit unterschiedlichen Einzeldosen Ant-3, unterschiedlichen Einzeldosen Glykolyseinhibitor 2-Deoxyglukose (2DG) und jeweils entsprechenden Kombinationen (Kontrolle MEM-Zellkulturmedium). Die antiproliferative Wirkung wurde mittels alamarBlue Assay im Multidetektion Reader ermittelt. a, $p < 0,05$ vs. 0 M Ant-3 / 0 M 2DG; b, $p < 0,05$ vs. 10⁻⁹ M Ant-3 / 0 M 2DG; c, $p < 0,05$ vs. 10⁻⁷ M Ant-3 / 0 M 2DG; d, $p < 0,05$ vs. 10⁻⁵ M Ant-3 / 0 M 2DG; e, $p < 0,05$ vs. 0 M Ant-3 / 5 mM 2DG; f, $p < 0,05$ vs. 0 M Ant-3 / 10 mM 2DG

Die Versuche zeigten eine dosisabhängige Proliferationshemmung der vier Zelllinien unter Behandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose. Der GnRH-II-Antagonist Ant-3 hatte bei der Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1-A in der Konzentration von 10^{-5} M eine antiproliferative Wirkung. In den Zelllinien AN3-CA, EFO-21 und NIH:OVCAR-3 zeigte sich keine signifikante Hemmung des Zellwachstums.

Bei den vier Zelllinien zeigten alle Kombinationen aus GnRH-II-Antagonist und 2-Deoxy-D-Glukose eine signifikant höhere Proliferationshemmung im Vergleich zur jeweiligen Einzelkonzentration des GnRH-II-Antagonisten. Die Kombination aus 2-Deoxy-D-Glukose mit 10 mM und GnRH-II-Antagonist mit 10^{-7} M hemmte bei der Ovarialkarzinomzelllinie NIH:OVCAR-3 das Zellwachstum signifikant stärker als 2-Deoxy-D-Glukose allein. Tabelle 9 zeigt ausführliche statistische Auswertung.

Tabelle 9: Statistische Auswertung des Proliferationsassays bei Behandlung mit Ant-3 und 2DG

One-way ANOVA mit Newman-Keuls	AN-3CA	HEC-1-A	EFO-21	NIH:OVCAR-3
0 M Ant-3:				
20 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
20 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
20 mM 2DG vs. 10 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p > 0,05
10 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p > 0,051	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,001
5 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-9} M Ant-3:				
20 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
20 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
20 mM 2DG vs. 10 mM 2DG	p > 0,01	p < 0,001	p < 0,01	p > 0,05
10 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,001
5 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10^{-7} M Ant-3:				
20 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
20 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
20 mM 2DG vs. 10 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,05
10 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p > 0,05	p < 0,001	p < 0,01	p > 0,05
5 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05
10^{-5} M Ant-3:				
20 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
20 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05
20 mM 2DG vs. 10 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05	p > 0,05
10 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,01	p > 0,05
5 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Ant-3:				
10^{-5} M Ant-3 vs. 0 M Ant-3	p > 0,05	p < 0,01	p > 0,05	p > 0,05
10^{-5} M Ant-3 vs. 10^{-9} M Ant-3	p > 0,05	p < 0,01	p > 0,05	p > 0,05
10^{-5} M Ant-3 vs. 10^{-7} M Ant-3	p > 0,05	p < 0,01	p > 0,05	p > 0,05
10^{-7} M Ant-3 vs. 0 M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10^{-7} M Ant-3 vs. 10^{-9} M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10^{-9} M Ant-3 vs. 0 M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

0 M 2DG:				
10 ⁻⁵ M Ant-3 vs. 0 M Ant-3	p > 0,05	p < 0,01	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁵ M Ant-3 vs. 10 ⁻⁹ M Ant-3	p > 0,05	p < 0,01	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁵ M Ant-3 vs. 10 ⁻⁷ M Ant-3	p > 0,05	p < 0,01	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁷ M Ant-3 vs. 0 M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁷ M Ant-3 vs. 10 ⁻⁹ M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁹ M Ant-3 vs. 0 M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
5 mM 2DG:				
10 ⁻⁵ M Ant-3 vs. 0 M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁵ M Ant-3 vs. 10 ⁻⁹ M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁵ M Ant-3 vs. 10 ⁻⁷ M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁷ M Ant-3 vs. 0 M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁷ M Ant-3 vs. 10 ⁻⁹ M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁹ M Ant-3 vs. 0 M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 mM 2DG:				
10 ⁻⁵ M Ant-3 vs. 0 M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁵ M Ant-3 vs. 10 ⁻⁹ M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁵ M Ant-3 vs. 10 ⁻⁷ M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁷ M Ant-3 vs. 0 M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁷ M Ant-3 vs. 10 ⁻⁹ M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁹ M Ant-3 vs. 0 M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
20 mM 2DG:				
10 ⁻⁵ M Ant-3 vs. 0 M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁵ M Ant-3 vs. 10 ⁻⁹ M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁵ M Ant-3 vs. 10 ⁻⁷ M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁷ M Ant-3 vs. 0 M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁷ M Ant-3 vs. 10 ⁻⁹ M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
10 ⁻⁹ M Ant-3 vs. 0 M Ant-3	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
2DG:				
20 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
20 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
20 mM 2DG vs. 10 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p > 0,05
10 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
10 mM 2DG vs. 5 mM 2DG	p > 0,05	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,001
5 mM 2DG vs. 0 mM 2DG	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

3.3 Untersuchung der Apoptoseinduktion

3.3.1 TUNEL Assay

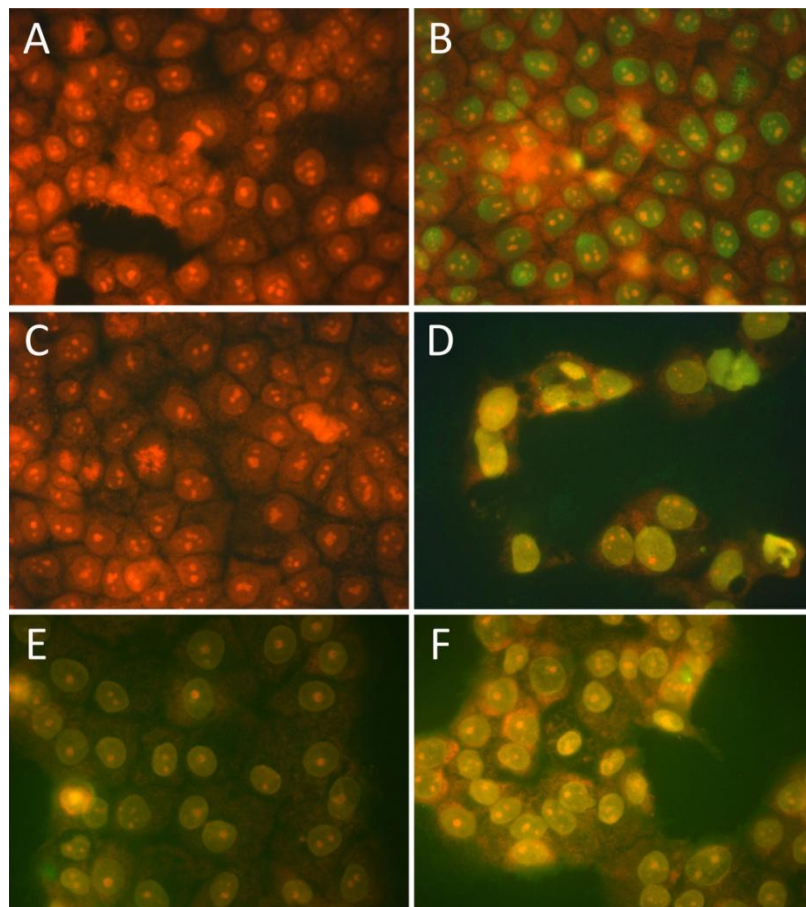
Um zu überprüfen, ob die beobachtete Viabilitätsminderung der behandelten Zelllinien durch Apoptose bedingt ist, wurde ein TUNEL Assay durchgeführt. Mit dem DeadEndTM Fluorometric TUNEL System können apoptotische Zellen von nicht-apoptotischen Zellen durch Fluoreszin-12-dUTP-Markierung unterschieden werden (vgl. Kapitel 2.2.6.2, S.19).

Hierfür wurden die Endometriumkarzinomzellen HEC-1-A ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Stimulation mit 2-Deoxy-D-Glukose (2DG) und AN-152 wie in Tabelle 10 dargestellt. Nach einer Inkubation von 48 h wurde das DeadEndTM Fluorometric TUNEL System nach Angaben des Herstellers verwendet und anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Tabelle 10: Inkubationsansatz 2DG und AN-152 (Kontrolle: MEM-Medium)

Versuchsansatz	1	2	3	4
2-Deoxy-D-glukose	0 mM	10 mM	0 mM	10 mM
AN-152	0 M	0 M	10^{-7} M	10^{-7} M

Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Unter Einzelexposition und unter Kombinationsbehandlung konnten überwiegend grün fluoreszierende, apoptotische Zellen beobachtet werden. In der Kontrolle zeigten sich dagegen rot fluoreszierende vitale Zellen.

**Abbildung 11:** TUNEL Assay zum Nachweis apoptotischer Zellen

Nach einer Inkubation über 48 h wurde der TUNEL Assay nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Medium-Kontrolle (C) zeigt keine apoptotischen Zellkerne. In den mit Versuchsubstanzen behandelten Zellen finden sich überwiegend grün fluoreszierende apoptotische Zellkerne. A: Negativkontrolle; B: Positivkontrolle; C: Medium-Kontrolle; D: 2DG; E: AN-152; F: 2DG + AN-152

3.3.2 JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Assay

3.3.2.1 2-Deoxy-D-Glukose und AN-152

Um herauszufinden, auf welchem Mechanismus die Viabilitätsminderung der Zelllinien durch 2-Deoxy-D-Glukose und AN-152 beruht, wurden die Zelllinien hinsichtlich der Apoptoseinduktion untersucht. Zusätzlich wurde untersucht, wie sich die Kombination aus beiden Versuchssubstanzen bezüglich der Apoptoseinduktion auswirkt. Hierzu wurde der JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Assay durchgeführt, mit dem die Frühapoptose durch Verlust des mitochondrialen Membranpotentials nachgewiesen werden kann (vgl. Kapitel 2.2.6).

Die Zelllinien AN3-CA, HEC-1-A, EFO-21 und NIH:OVCAR:3 wurden in Hungermedium für 48 h, wie in Tabelle 11 dargestellt, inkubiert und anschließend der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials gemessen. In Abbildung 12 und Abbildung 13 sind die Ergebnisse der gemessenen Triplikate zusammengestellt. Diese wurden in mindestens drei unabhängigen Versuchen und in mindestens drei verschiedenen Passagen erhoben.

Tabelle 11: Versuchsansätze 2DG und AN-152 (Inkubation mit Hungermedium als Kontrolle in 1)

Versuchsansatz	1	2	3	4	5	6
2-Deoxy-D-glukose	0 mM	10 mM	0 mM	10 mM	0 mM	10 mM
AN-152	0 M	0 M	10^{-9} M	10^{-9} M	10^{-7} M	10^{-7} M

Die Ergebnisse zeigen, dass der Glykolyseinhibitor 2DG bei allen Zelllinien - mit Ausnahme von AN3-CA - zu einer signifikanten Apoptoseinduktion führte und auch der Hybridwirkstoff AN-152 in einer Konzentration von 10^{-7} M in allen vier Zelllinien Apoptose induzierte.

Es zeigte sich ebenfalls, dass die Kombination aus beiden Substanzen zu einer signifikanten Apoptoseinduktion bei allen Zelllinien führt. Die Kombination aus 10 mM 2DG und 10^{-7} M AN-152 ergab, verglichen mit der alleinigen 2-Deoxy-D-glukose-Behandlung in den Zelllinien AN3-CA, HEC-1-A und NIH:OVCAR-3 eine signifikant höhere Apoptoseinduktion. Bei den Kombinationsbehandlungen (2DG mit 10 mM und AN-152 mit 10^{-9} bzw. 10^{-7} M) zeigte sich im Vergleich zur Einzelbehandlung mit AN-152 (10^{-9} bzw. 10^{-7} M) in den Zelllinien AN3-CA, HEC-1-A und NIH:OVCAR-3 ein signifikant stärkerer apoptoseinduzierender Effekt.

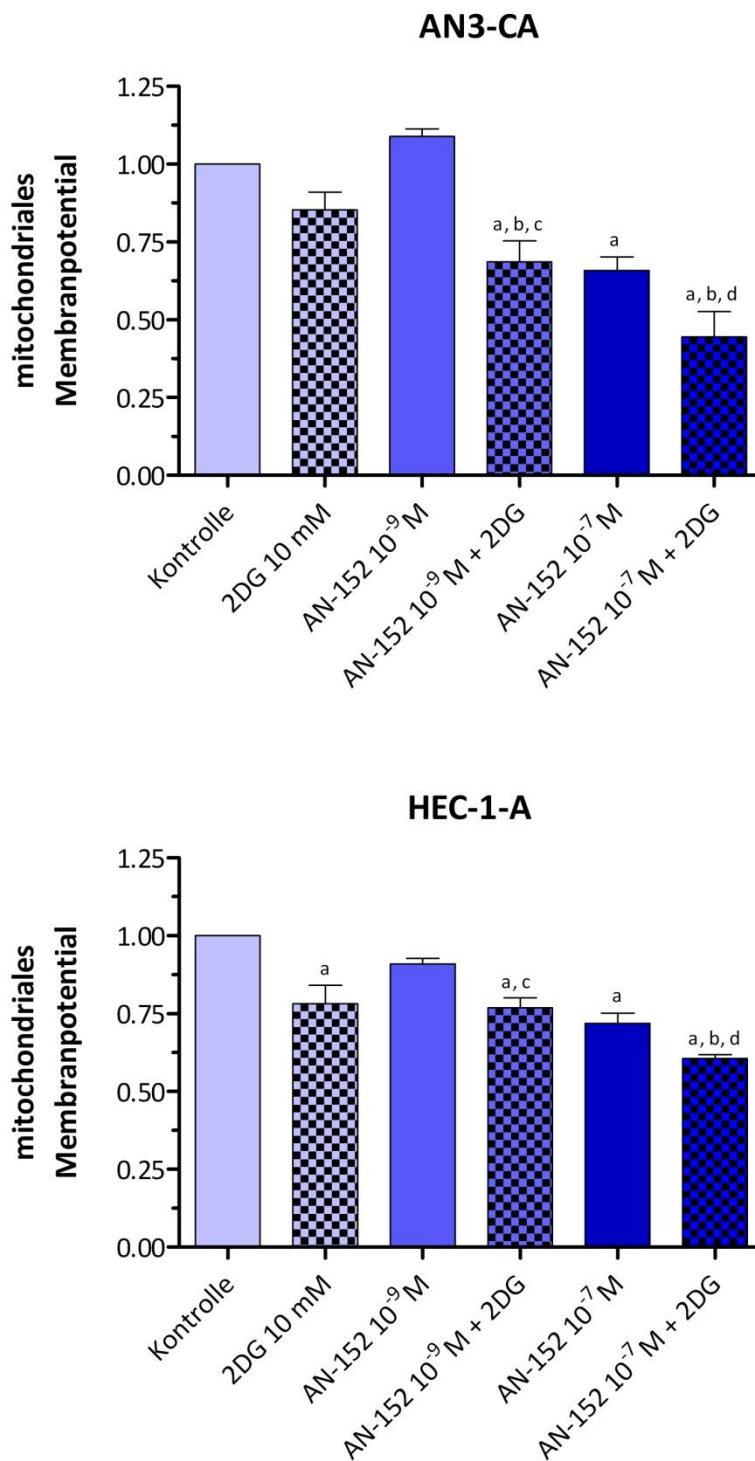


Abbildung 12: Apoptoseinduktion in den Endometriumkarzinomzelllinien AN-3CA und HEC-1-A

Behandelt wurde über 48h mit unterschiedlichen Konzentrationen AN-152, dem Glykolyseinhibitor 2-Deoxyglukose (2DG) in der Konzentration 10mM und mit entsprechenden Kombinationen (Kontrolle MEM-Zellkulturmedium). Die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials erfolgte mittels JC-1 Mitochondrial Detection Kit im Multidetektion Reader.

a) $p < 0,001$ vs. Kontrolle; b) $p < 0,001$ vs. 2DG 10 mM; c) $p < 0,001$ vs. AN-152 10⁻⁹ M; d) $p < 0,001$ vs. AN-152 10⁻⁷ M

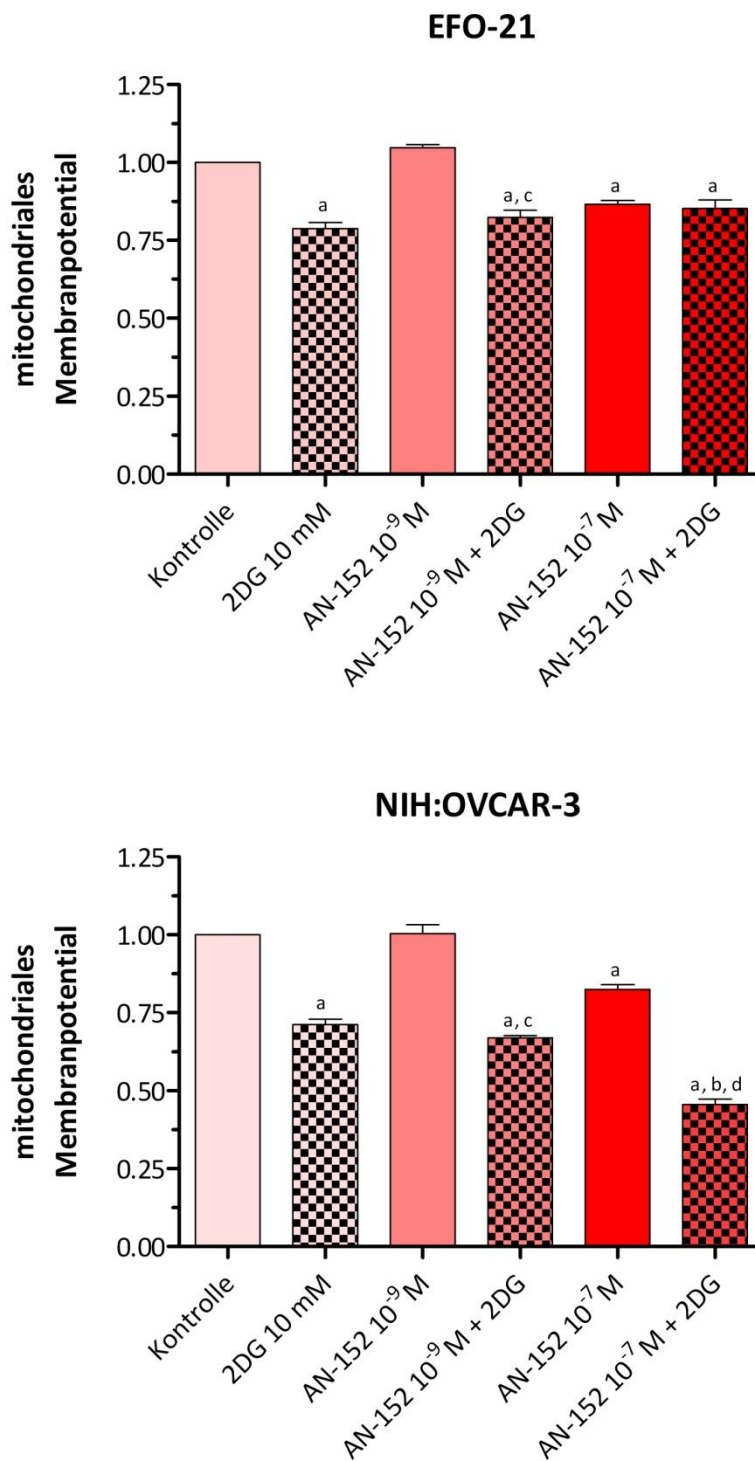


Abbildung 13: Apoptoseinduktion in den Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und NIH:OVCAR-3

Behandelt wurde über 48h mit unterschiedlichen Konzentrationen AN-152, dem Glykolyseinhibitor 2-Deoxyglukose (2DG) in der Konzentration 10mM und mit entsprechenden Kombinationen (Kontrolle MEM-Zellkulturmedium). Die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials erfolgte mittels JC-1 Mitochondrial Detection Kit im Multidetektion Reader. a) $p < 0,001$ vs. Kontrolle; b) $p < 0,001$ vs. 2DG 10 mM; c) $p < 0,001$ vs. AN-152 10⁻⁹ M; d) $p < 0,001$ vs. AN-152 10⁻⁷ M

3.3.2.2 2-Deoxy-D-Glukose und GnRH-II-Antagonist

Mit Hilfe des JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Assay (vgl. Kapitel 2.2.6), wurde überprüft, ob der viabilitätsmindernde Effekt auf die Karzinomzellen durch Induktion von Apoptose zustande kommt. Zusätzlich wurde die Kombination des Glykolyseinhibitors 2DG und des GnRH-II-Antagonisten Ant-3 auf ihre apoptoseinduzierende Wirkung untersucht.

Die Zelllinien AN3-CA, HEC-1-A, EFO-21 und NIH:OVCAR:3 wurden in Hungermedium ausgesät. In Tabelle 12 sind die Versuchsansätze gezeigt. Nach einer Inkubation von 48 h wurde die frühe Apoptose durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials nachgewiesen und die Ergebnisse als Balkendiagramm in Abbildung 14 und Abbildung 15 dargestellt. Die Versuche wurden als Triplikate gemessen, in mindestens drei unabhängigen Experimenten und in mindestens drei verschiedenen Passagen wiederholt.

Tabelle 12: Versuchsansätze 2DG und Ant-3 (Inkubation mit Hungermedium als Kontrolle in 1)

Versuchsansatz	1	2	3	4	5	6
2-Deoxy-D-glukose	0 mM	10 mM	0 mM	10 mM	0 mM	10 mM
Ant-3	0 M	0 M	10^{-9} M	10^{-9} M	10^{-7} M	10^{-7} M

Es zeigt sich, dass eine Behandlung mit 2DG bei allen Zelllinien zu einer im Vergleich zur Kontrolle signifikant höheren Apoptoseinduktion führte. Der GnRH-II-Antagonist zeigte in der Konzentration von 10^{-7} M ebenfalls einen signifikant höher apoptoseinduzierenden Effekt in allen Zelllinien und bei der Zelllinie NIH:OVCAR-3 schon ab 10^{-9} M.

Die Kombination aus 2DG und Ant-3 in der Konzentration 10^{-7} M führte im Vergleich zu beiden Einzelbehandlungen bei den Zelllinien HEC-1-A und NIH:OVCAR-3 zu signifikant mehr apoptotischen Zellen.

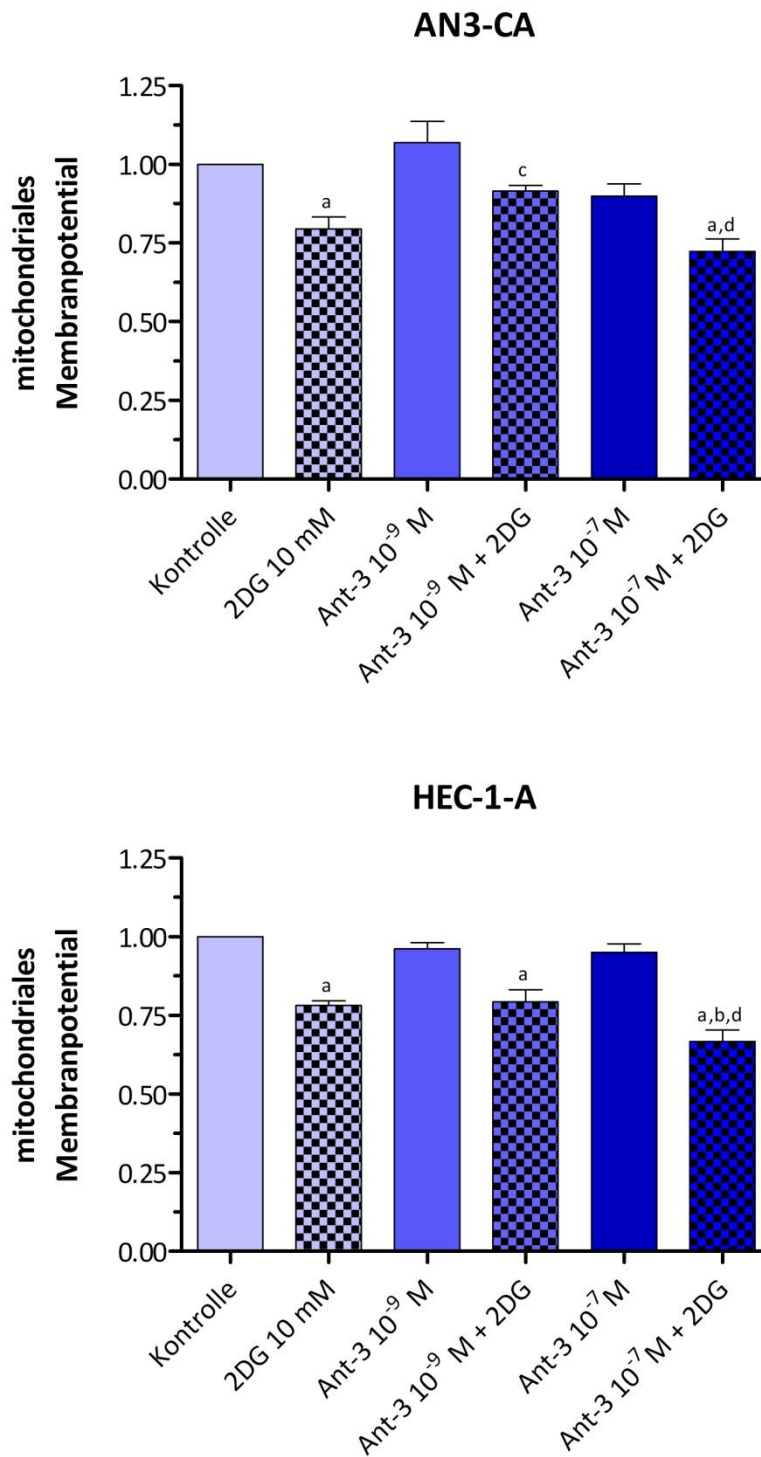


Abbildung 14: Apoptoseinduktion in den Endometriumkarzinomzelllinien AN-3CA und HEC-1-A

Behandelt wurde über 48h mit unterschiedlichen Konzentrationen Ant-3, dem Glykolyseinhibitor 2-Deoxyglukose (2DG) in der Konzentration 10mM und mit entsprechenden Kombinationen (Kontrolle MEM-Zellkulturmedium). Die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials erfolgte mittels JC-1 Mitochondrial Detection Kit im Multidetektor Reader.

a) $p < 0,001$ vs. Kontrolle; b) $p < 0,001$ vs. 2DG 10 mM; c) $p < 0,001$ vs. Ant-3 10⁻⁹ M; d) $p < 0,001$ vs. Ant-3 10⁻⁷ M

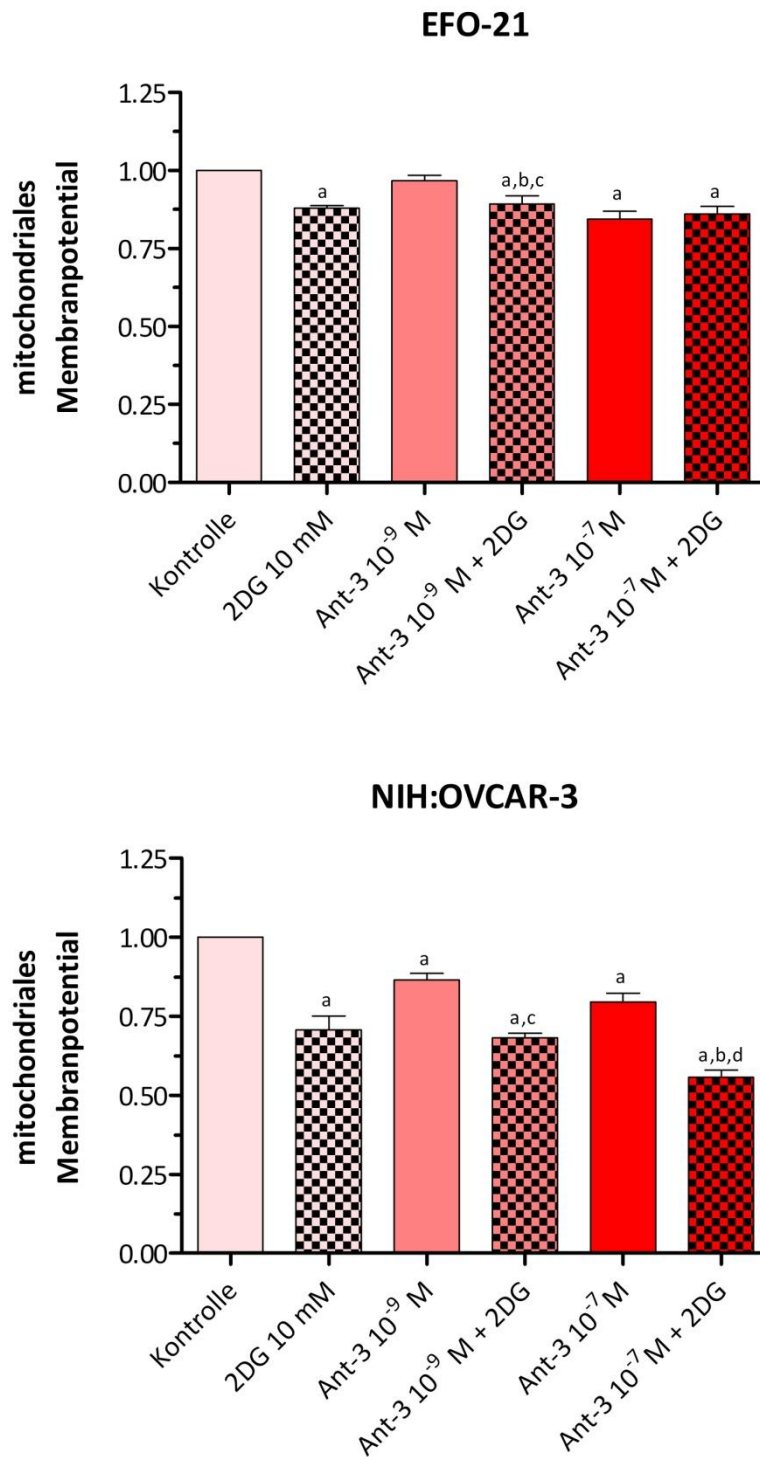


Abbildung 15: Apoptoseinduktion in den Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und NIH:OVCAR-3

Behandelt wurde über 48h mit unterschiedlichen Konzentrationen Ant-3, dem Glykolyseinhibitor 2-Deoxyglukose (2DG) in der Konzentration 10mM und mit entsprechenden Kombinationen (Kontrolle MEM-Zellkulturmedium). Die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials erfolgte mittels JC-1 Mitochondrial Detection Kit im Multidetektion Reader.

a) $p < 0,001$ vs. Kontrolle; b) $p < 0,001$ vs. 2DG 10 mM; c) $p < 0,001$ vs. Ant-3 10⁻⁹ M; d) $p < 0,001$ vs. Ant-3 10⁻⁷ M

3.4 Überprüfung des Mechanismus

3.4.1 Western-Blot unter Behandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose und AN-152

Um den apoptoseinduzierenden Mechanismus sowohl von den Einzelsubstanzen 2-Deoxy-D-Glukose und AN-152 als auch von deren Kombination zu überprüfen, wurde die aktive Caspase-3 mittels Western-Blot analysiert.

Hierzu wurde stellvertretend für die Endometriumkarzinome die Zelllinie HEC-1-A und für die Ovarialkarzinome die Zelllinie NIH:OVCAR-3 ausgewählt und, wie in Tabelle 13 dargestellt, für 72 h inkubiert. Es folgte eine Lyse der Zellen und eine gelelektrophoretische Auftrennung (vgl. Kapitel 2.3.3) mit anschließendem Western-Blot und Immundetektion (vgl. Kapitel 2.3.4 und 2.3.5) unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers für die aktive Caspase-3. Als Proteinkontrolle diente ein Aktinabgleich.

Tabelle 13: Western-Blot-Versuchsansätze: 2DG und AN-152 (Inkubation mit Hungermedium als Kontrolle in 1)

Versuchsansatz	1	2	3	4
2-Deoxy-D-glukose	0 mM	10 mM	0 mM	10 mM
AN-152	0 M	0 M	10^{-7} M	10^{-7} M

Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt. Bei beiden Zelllinien konnte die Analyse eine Aktivierung der Caspase-3 unter Behandlung mit 2DG und AN-152 bestätigen. Die Kombinationsbehandlung zeigte dabei in beiden Zelllinien eine verstärkte Caspase-3-Aktivierung.

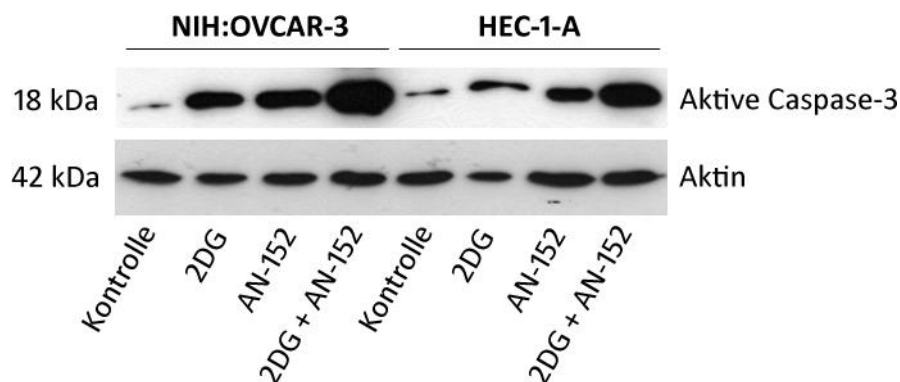


Abbildung 16: Western-Blot-Analyse der Caspase-3-Aktivität

Die Zelllinien NIH:OVCAR-3 und HEC-1-A wurden für 72 h mit 10 mM 2-Deoxy-D-Glukose, 10^{-7} M AN-152 und der Kombination aus beiden inkubiert. Die anschließende Detektion erfolgte mittels Western-Blot. Für beide Zelllinien konnte eine Caspase-3-Aktivität bei Behandlung mit 2DG oder AN-152 nachgewiesen werden. Die Kombinationsbehandlung zeigte in beiden Zelllinien eine höhere Caspase-3-Aktivität als die Exposition der Einzelsubstanzen.

3.4.2 Western-Blot unter Behandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose und GnRH-II-Antagonist

Mittels Western-Blot wurde, um den Mechanismus der Apoptoseinduktion durch 2-Deoxy-D-Glukose und dem GnRH-II-Antagonisten Ant-3 zu überprüfen, die Caspase-3-Aktivierung in den behandelten Zellen analysiert.

Die Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1-A und die Ovarialkarzinomzelllinie NIH:OVCAR-3 wurden dafür mit den beiden Versuchssubstanzen für 72 h, wie in Tabelle 14 dargestellt, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Kapitel 2.3.3). Es folgte ein Western-Blot und eine Immundetektion (vgl. Kapitel 2.3.4 und 2.3.5) der aktivierten Caspase-3 sowie von Aktin zur Proteinkontrolle. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 14: Western-Blot-Versuchsansätze: 2DG und Ant-3 (Inkubation mit Hungermedium als Kontrolle in 1)

Versuchsansatz	1	2	3	4
2-Deoxy-D-glukose	0 mM	10 mM	0 mM	10 mM
Ant-3	0 M	0 M	10^{-7} M	10^{-7} M

Bei der Zelllinie NIH:OVCAR-3 kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einer Aktivierung der Caspase-3 unter Behandlung mit 2DG und Ant-3. Dies konnte für die Zelllinie HEC-1-A nicht bestätigt werden. Die Kombinationsbehandlung zeigte für beide Zelllinien im Vergleich zu den Einzeldosen keine verstärkte Caspase-3-Aktivierung.

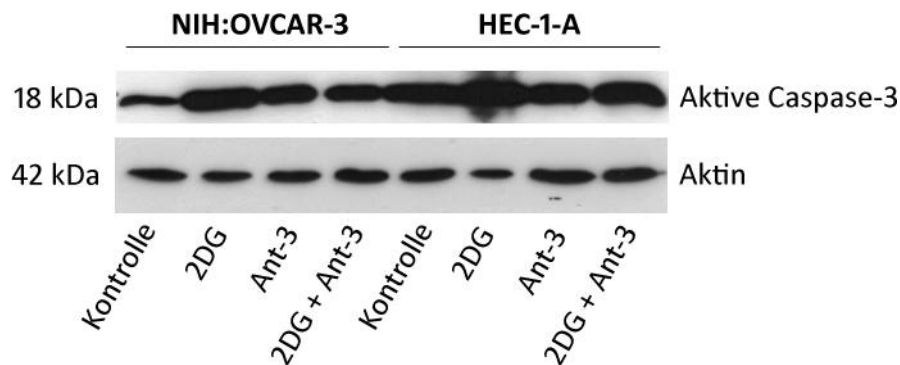


Abbildung 17: Western-Blot-Analyse der Caspase-3-Aktivität

Die Zelllinien NIH:OVCAR-3 und HEC-1-A wurden für 72 h mit 10 mM 2-Deoxy-D-Glukose, 10^{-7} M AN-152 und der Kombination aus beiden inkubiert. Die anschließende Detektion erfolgte mittels Western-Blot. Eine erhöhte Caspase-3-Aktivität konnte für die behandelten Ovarialkarzinomzelllinien NIH:OVCAR-3 festgestellt werden.

4 Diskussion

Therapeutische Selektivität ist einer der wichtigsten Gesichtspunkte in der Chemotherapie von Karzinomen. Um eine gezielte Schädigung des Tumorgewebes zu erreichen - ohne dabei gesunde Zellen anzugreifen - und um Nebenwirkungen zu reduzieren, ist es wichtig, die biologischen Unterschiede zwischen normalen Zellen und Tumorzellen zu berücksichtigen. Eine Veränderung in malignen Zellen ist die erhöhte Glukoseaufnahme und die Glykolysesteigerung zur Gewinnung von ATP (WARBURG 1930). Die gesteigerte Glykolyse der Tumorzellen stellt somit einen Angriffspunkt für eine selektive Therapie von Karzinomen dar.

Es konnte gezeigt werden, dass es durch gezielte Inhibierung der Glykolyse zum Zelltod entarteter Zellen kommt. Ein wirksamer Glykolyseinhibitor ist das Glukoseanalogon 2-Deoxy-D-Glukose (2DG), das anstelle von Glukose in die Zellen aufgenommen wird und dort nicht weiter verstoffwechselt werden kann. 2DG wird intensiv zur Tumorthherapie erforscht. Es konnte gezeigt werden, dass 2DG in verschiedenen Tumorentitäten zum Zelltod der malignen Zellen führt (AFT ET AL. 2002, BELL ET AL. 1998 sowie LEE ET AL. 1997). Eine weitere Möglichkeit zur selektiven Therapie von Karzinomen stellt die rezeptorvermittelte Therapie („receptor targeted therapy“) dar. Um selektiv Tumoren des Reproduktionstraktes zu erreichen, bieten sich GnRH-Analoga an, da nur Zellen der Hypophyse und des Reproduktionstraktes GnRH-Rezeptoren an ihrer Oberfläche besitzen und die Tumorzellen dieser Entitäten den GnRH-Rezeptor in einer höheren Dichte exprimieren als die nicht entarteten Zellen (REUBI 2003). Eine sich hieraus ergebende therapeutische Möglichkeit ist der von SCHALLY ET AL. (1999) entwickelt Hybridwirkstoff AN-152. Hierbei ist das Chemotherapeutikum Doxorubicin kovalent an eine Seitenkette des GnRH-I-Agonisten [D-Lys⁶]GnRH gekoppelt und gelangt dadurch nur in Zellen, die den GnRH-I-Rezeptor exprimieren. AN-152 wirkt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* apoptoseinduzierend (GRÜNDKER ET AL. 2002c sowie NAGY ET AL. 2005).

Man nimmt an, dass neben dem GnRH-I-Rezeptor-System mit dem GnRH-II-Rezeptor noch ein weiteres System existiert (GRÜNDKER ET AL. 2004). Es stellt eine weitere Option zur rezeptorvermittelten Tumorthherapie dar. Für GnRH-II-Antagonisten konnte gezeigt werden, dass sie in humanen Endometrium- und Ovarialkarzinomen *in vitro* und *in vivo* Apoptose induzieren (FISTER ET AL. 2007). Die GnRH-II-Antagonisten wirken dabei auch über den GnRH-I-Rezeptor (FISTER ET AL. 2009). Ein innovativer Ansatz, um verschiedene Angriffspunkte nutzen zu können und um mögliche Nebenwirkungen zu reduzieren, ist die Kombinationstherapie. Sie kommt bei vielen soliden und nicht-soliden Tumoren zum Einsatz (MAYER 2009 sowie MCKELVEY ET AL. 1976).

In der vorliegenden Arbeit sollte nun ermittelt werden, ob die Kombinationstherapie aus Glykolyseinhibition und rezeptorvermittelter Therapie an humanen Endometrium- und Ovarialkarzinomen zu einer therapeutisch effektiveren Wirksamkeit führt, als dies für die Einzel-

substanzen zutrifft. Damit wäre auch eine Dosisreduktion der einzelnen Wirksubstanzen bei kombinierter Therapie möglich.

4.1 GnRH-Rezeptor-Expression

Zunächst galt es zu überprüfen, ob die Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien die GnRH-Rezeptoren exprimieren, um eine Wirkung der GnRH-Analoga zu gewährleisten. Es ist bekannt, dass 80 % der Endometrium- und Ovarialkarzinome den GnRH-I-Rezeptor an ihrer Oberfläche besitzen (EMONS ET AL. 1989, IMAI ET AL. 1994 sowie SRKALOVIC ET AL. 1990). Die Expression des GnRH-II-Rezeptors in humanen Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien konnte ebenfalls von GRÜNDKER ET AL. 2002b nachgewiesen werden.

Mittels Western-Blot-Analysen konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass die vier untersuchten Tumorentitäten sowohl den GnRH-I-Rezeptor als auch den GnRH-II-Rezeptor exprimieren (vgl. Abbildung 6, S. 24). Somit konnte eine Analyse der Wirkung der GnRH-Analoga in Kombination mit dem Glykolyseinhibitor 2-Deoxy-D-Glukose folgen.

4.2 Antiproliferative und zytostatische Effektivität der Kombinationsbehandlung *in vitro*

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung der Kombinationsbehandlung bestehend aus Glykolyseinhibition mit 2-Deoxy-D-Glukose (2DG) und rezeptorvermittelter Therapie mit AN-152 oder GnRH-II-Antagonist auf Endometrium- und Ovarialkarzinome *in vitro* zu untersuchen.

Zunächst wurde mittels Proliferationsassay der Effekt der Einzelsubstanzen und ihrer Kombination auf die Viabilität der Karzinomzelllinien untersucht (vgl. Kapitel 3.2.1, S. 24 und 3.2.2, S. 28). Es zeigte sich, dass bei allen Zelllinien der verschiedenen Karzinomentitäten eine signifikant dosisabhängige Viabilitätsminderung sowohl durch den Glykolyseinhibitor 2DG als auch durch den Hybridwirkstoff AN-152 erreicht werden konnte. Die Daten dieser Arbeit zeigen ebenfalls, dass 2DG in Kombination mit AN-152 zu signifikant höheren antiproliferativen Effekten führte als in Einzelinkubation. Bei der Kombination aus 2DG in der Konzentration von 5 mM und AN-152 in der Konzentration von 10^{-7} M konnte das Zellwachstum bei allen vier Zelllinien um mindestens 50 % reduziert werden. Eine signifikant höhere Proliferationshemmung von 2DG in Kombination mit dem GnRH-II-Antagonisten konnte in der Ovarialkarzinomzelllinie NIH:OVCA-3 erreicht werden. WESTPHALEN ET AL. (2000) zeigten, dass AN-152 in Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien eine proliferationshemmende Wirkung besitzt. Für 2-Deoxy-D-Glukose konnten ZHANG XD ET AL. (2006) für verschiedene Tumorzelllinien, unter anderem auch für das Ovarialkarzinom, einen antiproliferativen Effekt nachweisen. Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit für 2-Deoxy-D-Glukose und AN-152 decken

sich in dieser Hinsicht somit mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Zudem konnte nun gezeigt werden, dass die Kombination aus Glykolyseinhibition und AN-152 eine additive antiproliferative Wirkung auf die hier verwendeten Karzinomzelllinien besitzt. Bei der Zelllinie NIH:OVCAR-3 fand sich ebenfalls ein additiver Effekt bei der Kombination von 2DG und Ant-3 (vgl. Abbildung 7 bis Abbildung 10).

Zur Klärung der Frage, ob die beobachtete Viabilitätsminderung durch Induktion von Apoptose bedingt ist, wurde zunächst ein TUNEL Assay an der Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1-A durchgeführt (vgl. Kapitel 3.3.1, S. 32). Dabei konnte qualitativ gezeigt werden, dass die Substanzen 2-Deoxy-D-Glukose und AN-152 sowie deren Kombination in den Zellen Apoptose induzieren (vgl. Abbildung 11, S. 33). Für den GnRH-II-Antagonisten ließ sich die Apoptose nicht qualitativ nachweisen. Anschließend folgte die quantitative Analyse mittels JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Assay, womit die frühe Apoptose durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials nachgewiesen werden kann (vgl. Kapitel 2.2.6). Die in Kapitel 3.3.2.1 (S. 34) und 3.3.2.2 (S. 37) dargestellten Ergebnisse konnten zeigen, dass die Behandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose bei Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien Apoptose induziert (vgl. Abbildung 12 bis Abbildung 15). Des Weiteren zeigten diese Daten, dass auch der Hybridwirkstoff AN-152 eine apoptoseinduzierende Wirkung auf die Karzinomzelllinien besitzt (vgl. Abbildung 12 und Abbildung 13) und der GnRH-II-Antagonist Ant-3 ebenfalls in allen vier Zelllinien Apoptose auslöst (vgl. Abbildung 14 und Abbildung 15). Die Erkenntnisse zur zytostatischen Effektivität aller drei Versuchssubstanzen befinden sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zu soliden Tumoren. AFT ET AL. (2002) zeigten bei *in-vitro*-Untersuchungen von Brustkrebszellen einen apoptoseinduzierenden Effekt für 2-Deoxy-D-Glukose bei einer Konzentration von 16 mM. ZHANG XD ET AL. (2006) beobachteten, dass der antiproliferative Effekt von 2DG je nach Zelllinie in unterschiedlich starkem Ausmaß und mit oder ohne Apoptose einhergehen kann. Für den Hybridwirkstoff AN-152 bestätigten GÜNTHERT ET AL. (2004b) die Apoptoseinduktion bei Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien. Die Induktion von Apoptose durch GnRH-II-Antagonisten konnte von FISTER ET AL. (2007) in beiden Karzinomentitäten nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei der Kombinationsbehandlung der Zelllinien mit den Substanzen 2-Deoxy-D-Glukose und AN-152 die Apoptoserate der Tumorzellen signifikant höher war als bei Behandlung mit den jeweiligen Einzelsubstanzen. Für die Kombinationsbehandlung mit Ant-3 konnte dieser Effekt für die zwei Zelllinien HEC-1-A und NIH:OVCAR-3 nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Kombinationsbehandlung aus Glykolyseinhibition mit 2-Deoxy-D-Glukose und rezeptorvermittelter Therapie mit dem Hybridwirkstoff AN-152 eine additive viabilitätsmindernde und antiproliferative Wirkung auf Endomet-

rium- und Ovarialkarzinomzelllinien erzielt werden konnte. Auch die Kombination des Glykolyseinhibitors mit dem GnRH-II-Antagonisten konnte in einer Zelllinie einen additiven viabilitätsmindernden und antiproliferativen Effekt bewirken. Die vorliegende Arbeit kommt damit zu dem Ergebnis, dass durch die Inhibition der Glykolyse die zytostatische Wirkung der GnRH-Analoga auf Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien signifikant erhöht werden konnte.

Die Erkenntnisse einer verstärkenden zytostatischen Wirkung von 2-Deoxy-D-Glukose konnte auch in anderen Arbeiten bestätigt werden. Bei der Kombination 2-Deoxy-D-Glukose mit Cisplatin wurde eine erhöhte Zytotoxizität *in vitro* bei humanen Kopf- und Halstumoren beobachtet (SIMONS ET AL. 2007). In Brustkrebszellen verstärkte 2-Deoxy-D-Glukose den zytostatischen Effekt von Doxorubicin (ZHANG F & AFT 2009).

4.3 Molekulare Wirkung der Kombinationsbehandlung

Eine weitere Frage dieser Arbeit war die Überprüfung des molekularen Wirkmechanismus der Kombinationsbehandlung bestehend aus Glykolyseinhibition mit 2-Deoxy-D-Glukose (2DG) und rezeptorvermittelter Therapie mit AN-152 oder GnRH-II-Antagonist (Ant-3). Die von anderen Arbeitsgruppen belegte zentrale Bedeutung der Caspase-3-Aktivierung in der Apoptoseinduktion aller drei Versuchssubstanzen (AFT ET AL. 2002, FISTER ET AL. 2007 sowie KIDD ET AL. 2008) legte es nahe, die Aktivierung der Caspase-3 auch unter Kombinationsbehandlung zu überprüfen (vgl. Kapitel 3.4.1, S. 40 und 3.4.2, S. 41).

Eine Aktivierung der Caspase-3 unter Exposition der Einzelsubstanzen 2DG und AN-152 konnte mittels Western-Blot für die Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien bestätigt werden. Unter Exposition mit Ant-3 ergab sich eine Caspase-3-Aktivierung für die Ovarialkarzinomzelllinie NIH:OVCAR-3. Die vorliegenden Daten (vgl. Abbildung 16 und Abbildung 17) ließen für die Kombinationsbehandlung aus 2DG und AN-152 eine höhere Aktivität von Caspase-3 beobachten als es bei den Einzelexpositionen der Fall war. Dies war bei der Kombination aus 2DG und Ant-3 nicht zu beobachten. Eine Aktivierung der Caspase-3 führt über die mitochondriale Signalkaskade zur Apoptose und zu einer konsekutiven DNA-Fragmentierung im Nukleus (LAKHANI ET AL. 2006). Es konnte somit bestätigt werden, dass die drei Wirksubstanzen über den durch die Mitochondrien vermittelten intrinsischen Weg Apoptose induzieren. In der vorliegenden Arbeit wurde zudem gezeigt, dass durch die Kombination 2DG und AN-152 eine vermehrte Induktion der Caspase-3-Aktivität erreicht werden konnte.

Die erhobenen Daten dieser Arbeit lassen im Zusammenhang mit den Erkenntnissen zur Funktion und Bedeutung der Caspase-3 den Schluss zu, dass die zytostatische Wirkung der Kombinationsbehandlung aus Glykolyseinhibition mit 2-Deoxy-D-Glukose und rezeptorver-

mittelter Therapie mit dem Hybridwirkstoff AN-152 durch eine vermehrte Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs vermittelt wird.

4.4 Ausblick auf die Möglichkeiten der klinischen Anwendung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass die Behandlung der Endometrium- und Ovarialkarzinome mit beiden Substanzen, dem Glykolyseinhibitor 2-Deoxy-D-Glukose und dem Hybridwirkstoff AN-152, *in vitro* zu einer signifikant höheren zytostatischen Wirkung führte als die Behandlung mit nur einer der beiden Substanzen. Sowohl die Wirkung an sich als auch der Wirkmechanismus über den intrinsischen Apoptoseweg konnte einheitlich für die untersuchten Tumorentitäten bestätigt werden. Die Kombinationsbehandlung aus Glykolyseinhibition mit 2DG und dem GnRH-II-Antagonisten Ant-3 zeigte zwar für die Apoptoseinduktion einen additiven Effekt, dieser führte aber in den Viabilitätsuntersuchungen zu keiner signifikant verstärkenden antiproliferativen Wirkung. Hier wirkte der Glykolyseinhibitor in Einzelexposition stark proliferationshemmend und der GnRH-II-Antagonist konnte diese Wirkung nicht erhöhen. Man kann somit vermuten, dass der antiproliferative Effekt des GnRH-II-Antagonisten *in vitro* zu schwach ist und dadurch keine signifikant additive Wirkung in der Kombinationsbehandlung mit dem stark antiproliferativ wirkenden Glykolyseinhibitor 2DG zu erzielen ist.

Die Glykolyseinhibition zur Kombinationsbehandlung ist ein rationaler Therapieansatz, der für die Behandlung solider Tumoren in Kombination mit Radiotherapie bereits klinisch erprobt wird (SINGH ET AL. 2005). 2-Deoxy-D-Glukose als Glykolyseinhibitor stellt für die Kombinationstherapie eine attraktive Option dar. 2DG wirkt vor allem im Tumorgewebe, da dort eine erhöhte Glykolyse durch die malignen Zellen stattfindet. Ferner kann es durch seine zytostatische und antiproliferative Wirkung zu einer Verstärkung des apoptotischen Effektes anderer Zytostatika beitragen. Eine erhöhte Apoptoserate konnte in chemotherapieresistenten Ovarialkarzinomzellen bei einer kombinierten Gabe mit Rapamycin (Sirolimus) bereits beobachtet werden (LOAR ET AL. 2010).

Der zytostatische Effekt von AN-152 ist vor allem durch seine Wirksubstanz Doxorubicin und durch seine zielgerichtete Wirkweise ein attraktiver Partner für die Kombinationstherapie mit der Glykolyseinhibition. Es ließ sich schon für andere solide Tumore gezeigt werden, dass durch 2-Deoxy-D-Glukose die zytostatische Wirkung von Doxorubicin verstärkt werden kann (MASCHEK ET AL. 2004 sowie ZHANG F & AFT 2009). Durch seine rezeptorvermittelte Aufnahme wirkt AN-152 nur in Zellen, die den GnRH-I-Rezeptor exprimieren und trägt somit auch zu einer selektiven Tumorthherapie bei, was zu einer Reduktion von Nebenwirkungen im Vergleich zu reinem Doxorubicin führt (GRÜNDKER ET AL. 2002c).

Eine zielgerichtete Therapie aus Glykolyseinhibition und dem an einen GnRH-I-Agonisten gekoppelten Chemotherapeutikum Doxorubicin kann sich als effektive Strategie in der Behandlung von vor allem inoperablen, chemotherapieresistenten oder rezidivierenden Endometrium- und Ovarialkarzinomen herausstellen. Die Kombination aus Glykolyseinhibition mit 2DG und rezeptorvermittelter Therapie mit AN-152 sollte vor diesem Hintergrund und bei der in dieser Arbeit *in vitro* dargestellten signifikanten Wirkungsverbesserung an Endometrium- und Ovarialkarzinomen als sinnvolle Option für die aktuelle Therapie präklinisch *in vivo* evaluiert werden sollte.

Für den GnRH-II-Antagonisten wurde bereits eine apoptoseinduzierende Wirkung über den intrinsischen Signalweg mit Aktivierung der Caspase-3 nachgewiesen. Auch *in vivo* zeigte sich eine starke antitumorale Wirkung (FISTER ET AL. 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte nun ein additiver apoptoseinduzierender Effekt des GnRH-II-Antagonisten in Kombination mit Glykolyseinhibition *in vitro* nachgewiesen werden. Dieser fiel nicht so stark aus wie bei der Kombination von AN-152 und Glykolyseinhibition. Ein Grund dafür ist, dass es sich bei der Behandlung mit GnRH-II-Antagonisten um eine endokrine Therapie handelt und AN-152 - aufgrund des enthaltenen Chemotherapeutikums Doxorubicin - eine stärkere zytostatische Potenz besitzt. Die starke zytostatische Wirkung von Doxorubicin geht trotz der Selektivität durch rezeptorvermittelte Aufnahme mit mehr Nebenwirkungen einher als eine nebenwirkungsarme endokrine Therapie mit GnRH-II-Antagonisten. Zudem könnte durch Modifizierung der Aminosäurestruktur des GnRH-II-Antagonisten eine stärkere antiproliferative Wirkung erreicht werden. Auch für den GnRH-II-Antagonisten in Kombination mit Glykolyseinhibition ist deshalb eine präklinische Evaluation *in vivo* zu diskutieren.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Glykolyseinhibition zur Kombinationstherapie sowohl mit GnRH-I-Analoga als auch mit GnRH-II-Analoga *in vitro* als wirksam erweist. Um den klinischen Nutzen für die onkologische Therapie umfassend zu eruieren, sind daher auch weitere Experimente zur präklinischen Evaluation *in vivo* sinnvoll.

5 Zusammenfassung

Der Großteil der Patientinnen mit gynäkologischen Karzinomen kann heute durch eine Operation von der Erkrankung geheilt werden. Für Patientinnen mit inoperablen, chemotherapieresistenten oder rezidivierenden Karzinomen werden jedoch noch Therapieoptionen mit kurativem Potential gesucht. Eine gesteigerte Glykolyse zur Energiegewinnung wurde als entscheidend für das Überleben von Tumorzellen beschrieben und stellt somit einen selektiven Angriffspunkt in der onkologischen Therapie dar. Einen weiteren Angriffspunkt zur zielgerichteten Behandlung gynäkologischer Karzinome stellen GnRH-Rezeptoren dar, die im Wesentlichen nur von Zellen des Reproduktionstraktes exprimiert werden. In dieser Arbeit wurde deshalb die zytostatische Wirkung des Glykolyseinhibitors 2-Deoxy-D-Glukose in Kombination mit dem zytostatischen GnRH-I-Analogen AN-152 und einem GnRH-II-Antagonisten umfassend *in vitro* analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Kombinationsbehandlung die Viabilität signifikant stärker reduzierte als die Einzelbehandlung. Die beobachtete Viabilitätsminderung kam dabei durch Apoptoseinduktion zustande, was im TUNEL Assay gezeigt werden konnte. Auch für die Apoptoseinduktion ergab sich bei Kombinationsbehandlung ein signifikant stärkerer Effekt als bei Einzelbehandlung. Die zytostatische Wirkung wurde dabei durch Aktivierung des intrinsischen mitochondrialen Apoptosewegs vermittelt. Der additive Effekt konnte bei der Effektor-Caspase-3 bestätigt werden. Die beiden GnRH-Analoga unterschieden sich in der Viabilitätsminderung und Apoptoseinduktion in ihrer Potenz. Das mit dem Zytostatikum Doxorubicin gekoppelte GnRH-I-Analogen AN-152 bewirkte dabei einen höheren additiven Effekt als der rein endokrin wirkende GnRH-II-Antagonist. Die zentrale Bedeutung der Glykolyse in malignen Geweben und die umfangreichen Erfahrungen mit GnRH-Analoga bei gynäkologischen Karzinomen machen eine Kombinationsbehandlung aus beiden Komponenten, Glykolyseinhibitor und GnRH-Analogen, mit den Ergebnissen dieser Arbeit zu einer rationalen Ergänzung der onkologischen Therapie fortgeschrittener Endometrium- und Ovarialkarzinome, die es in weiteren *in-vitro*- sowie *in-vivo*-Untersuchungen zu überprüfen gilt.

6 Literaturverzeichnis

- Aft RL, Zhang FW, Gius D (2002): Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. *Br J Cancer* 87(7): 805-812.
- Ahmed SA, Gogal RM, Jr., Walsh JE (1994): A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 170(2): 211-224.
- Akhmedkhanov A, Zeleniuch-Jacquotte A, Toniolo P (2001): Role of exogenous and endogenous hormones in endometrial cancer: review of the evidence and research perspectives. *Ann N Y Acad Sci* 943: 296-315.
- Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I (2005): Endometrial cancer. *Lancet* 366(9484): 491-505.
- Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I (2007): Treatment modalities in endometrial cancer. *Curr Opin Oncol* 19(5): 479-485.
- Belani CP (2000): Chemotherapy regimens in advanced non small-cell lung cancer: recent randomized trials. *Clin Lung Cancer* 1(2): 7-10.
- Bell SE, Quinn DM, Kellett GL, Warr JR (1998): 2-Deoxy-D-glucose preferentially kills multi-drug-resistant human KB carcinoma cell lines by apoptosis. *Br J Cancer* 78(11): 1464-1470.
- Bernstein L, Deapen D, Cerhan JR, Schwartz SM, Liff J, McGann-Maloney E, Perlman JA, Ford L (1999): Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 91(19): 1654-1662.
- Blomenrohr M, Heding A, Sellar R, Leurs R, Bogerd J, Eidne KA, Willars GB (1999): Pivotal role for the cytoplasmic carboxyl-terminal tail of a nonmammalian gonadotropin-releasing hormone receptor in cell surface expression, ligand binding, and receptor phosphorylation and internalization. *Mol Pharmacol* 56(6): 1229-1237.
- Blum RH, Carter SK (1974): Adriamycin. A new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann Intern Med* 80(2): 249-259.

- Booser DJ, Hortobagyi GN (1994): Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Focus on drug resistance. *Drugs* 47(2): 223-258.
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Buzdar AU, Marcus C, Smith TL, Blumenschein GR (1985): Early and delayed clinical cardiotoxicity of doxorubicin. *Cancer* 55(12): 2761-2765.
- Castellon E, Clementi M, Hitschfeld C, Sanchez C, Benitez D, Saenz L, Contreras H, Huidobro C (2006): Effect of leuprolide and cetorelix on cell growth, apoptosis, and GnRH receptor expression in primary cell cultures from human prostate carcinoma. *Cancer Invest* 24(3): 261-268.
- Chen Z, Lu W, Garcia-Prieto C, Huang P (2007): The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr* 39(3): 267-274.
- Dawe CJ, Banfield WG, Morgan WD, Slatick MS, Curth HO (1964): Growth in continuous culture, in hamsters, of cells from a neoplasm associated with acanthosis nigricans. *J Natl Cancer Inst* 33: 441-456.
- Eicke N, Gunthert AR, 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(5): 1223-1229.
- Emons G, Pahwa GS, Brack C, Sturm R, Oberheuser F, Knuppen R (1989): Gonadotropin releasing hormone binding sites in human epithelial ovarian carcinomata. *Eur J Cancer Clin Oncol* 25(2): 215-221.
- Emons G, Ortmann O, Becker M, Irmer G, Springer B, Laun R, Holzel F, Schulz KD, Schally AV (1993): High affinity binding and direct antiproliferative effects of LHRH analogues in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 53(22): 5439-5446.
- Emons G, Sindermann H, Engel J, Schally AV, Grundker C (2009): Luteinizing hormone-releasing hormone receptor-targeted chemotherapy using AN-152. *Neuroendocrinology* 90(1): 15-18.

- Fekete M, Wittliff JL, Schally AV (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(3): 137-147.
- Fister S, Gunthert AR, 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(4): 1750-1756.
- Fister S, Gunthert AR, Aicher B, Paulini KW, 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(16): 6473-6481.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119(3): 493-501.
- Goodman MT, Howe HL (2003): Descriptive epidemiology of ovarian cancer in the United States, 1992-1997. *Cancer* 97(10): 2615-2630.
- Gründker C (2000): Cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone conjugates and their use in gynecological cancer therapy. *Eur J Endocrinol* 143(5): 569-572.
- Gründker C, Emons G (2005): GnRH in cancers of reproductive organs. In: Lunenfeld B (ed). GnRH analogs in human reproduction. London: Taylor and Francis: 16-28
- Gründker C, Gunthert AR, Millar RP, 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(3): 1427-1430.
- Gründker C, Gunthert AR, Westphalen S, Emons G (2002b): Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers. *Eur J Endocrinol* 146(1): 1-14.
- Gründker C, Volker P, Griesinger F, Ramaswamy A, Nagy A, Schally AV, Emons G (2002c): 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(3): 528-537.

- Gründker C, Günthert AR, Emons G (2006): Zielzellspezifische Chemotherapie über den GnRH-Rezeptor. *Frauenarzt* 47(7): 590-592.
- 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(1): 141-149.
- Gründker C, Fost C, Fister S, Nolte N, Gunthert AR, Emons G (2010): Gonadotropin-releasing hormone type II antagonist induces apoptosis in MCF-7 and triple-negative MDA-MB-231 human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res* 12(4): R49.
- Günthert AR, Gründker C, Bongertz T, Nagy A, Schally AV, 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(3): 255-264.
- Günthert AR, Gründker C, Bongertz T, Schlott T, Nagy A, Schally AV, 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(4): 1164-1172.
- Günthert AR, Gründker C, Olota A, Lasche J, Eicke N, Emons G (2005): Analogs of GnRH-I and GnRH-II inhibit epidermal growth factor-induced signal transduction and resensitize resistant human breast cancer cells to 4OH-tamoxifen. *Eur J Endocrinol* 153(4): 613-625.
- Hamilton T, Young R, McKoy W, Grotzinger K, Green J, Chu W, Wang-Peng J, Rogan A, Green W, Ozols R (1983): Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Research* 43(11): 5379-5389.
- Imai A, Ohno T, Iida K, Fuseya T, Furui T, Tamaya T (1994): Gonadotropin-releasing hormone receptor in gynecologic tumors. Frequent expression in adenocarcinoma histologic types. *Cancer* 74(9): 2555-2561.

- Kaplan O, Navon G, Lyon RC, Faustino PJ, Straka EJ, Cohen JS (1990): Effects of 2-deoxyglucose on drug-sensitive and drug-resistant human breast cancer cells: toxicity and magnetic resonance spectroscopy studies of metabolism. *Cancer Res* 50(3): 544-551.
- Kauffman AS (2004): Emerging functions of gonadotropin-releasing hormone II in mammalian physiology and behaviour. *J Neuroendocrinol* 16(9): 794-806.
- Kidd M, Schally AV, Pfragner R, Malfertheiner MV, Modlin IM (2008): Inhibition of proliferation of small intestinal and bronchopulmonary neuroendocrine cell lines by using peptide analogs targeting receptors. *Cancer* 112(6): 1404-1414.
- Kuramoto H (1972): Studies of the growth and cytogenetic properties of human endometrial adenocarcinoma in culture and its development into an established line. *Acta Obstet Gynaecol Jpn* 19(1): 47-58.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Jr., Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, Flavell RA (2006): Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311(5762): 847-851.
- Landau BR, Lubs HA (1958): Animal responses to 2-deoxy-D-glucose administration. *Proc Soc Exp Biol Med* 99(1): 124-127.
- Laszlo J, Humphreys SR, Goldin A (1960): Effects of glucose analogues (2-deoxy-D-glucose, 2-deoxy-D-galactose) on experimental tumors. *J Natl Cancer Inst* 24: 267-281.
- Lee YJ, Galoforo SS, Berns CM, Tong WP, Kim HR, Corry PM (1997): Glucose deprivation-induced cytotoxicity in drug resistant human breast carcinoma MCF-7/ADR cells: role of c-myc and bcl-2 in apoptotic cell death. *J Cell Sci* 110(5): 681-686.
- Loar P, Wahl H, Kshirsagar M, Gossner G, Griffith K, Liu JR Inhibition of glycolysis enhances cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *Am J Obstet Gynecol* 202(4): 371-378.
- Mariani A, Webb MJ, Keeney GL, Haddock MG, Calori G, Podratz KC (2000): Low-risk corpus cancer: is lymphadenectomy or radiotherapy necessary? *Am J Obstet Gynecol* 182(6): 1506-1519.

- Maschek G, Savaraj N, Priebe W, Braunschweiger P, Hamilton K, Tidmarsh GF, De Young LR, Lampidis TJ (2004): 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. *Cancer Res* 64(1): 31-34.
- Mayer RJ (2009): Targeted therapy for advanced colorectal cancer--more is not always better. *N Engl J Med* 360(6): 623-625.
- McKelvey EM, Gottlieb JA, Wilson HE, Haut A, Talley RW, Stephens R, Lane M, Gamble JF, Jones SE, Grozea PN, et al. (1976): Hydroxyldaunomycin (Adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma. *Cancer* 38(4): 1484-1493.
- Millar R, Conklin D, Lofton-Day C, Hutchinson E, Troskie B, Illing N, Sealton SC, Hapgood J (1999): A novel human GnRH receptor homolog gene: abundant and wide tissue distribution of the antisense transcript. *J Endocrinol* 162(1): 117-126.
- Mohanti BK, Rath GK, Anantha N, Kannan V, Das BS, Chandramouli BA, Banerjee AK, Das S, Jena A, Ravichandran R, et al. (1996): Improving cancer radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: phase I/II clinical trials on human cerebral gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 35(1): 103-111.
- Nagy A, Schally AV (2005): Targeting of cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analogs to breast, ovarian, endometrial, and prostate cancers. *Biol Reprod* 73(5): 851-859.
- Neill JD, Duck LW, Sellers JC, Musgrove LC (2001): A gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor specific for GnRH II in primates. *Biochem Biophys Res Commun* 282(4): 1012-1018.
- Neill JD (2002): GnRH and GnRH receptor genes in the human genom. *Endocrinology* 143(3): 737-743.
- Ozalp SS, Yalcin OT, Tanir M, Kabukcuoglu S, Etiz E (2002): Multidrug resistance gene-1 (Pgp) expression in epithelial ovarian malignancies. *Eur J Gynaecol Oncol* 23(4): 337-340.
- Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P (2006): Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25(34): 4633-4646.

- Randall ME, Filiaci VL, Muss H, Spirtos NM, Mannel RS, Fowler J, Thigpen JT, Benda JA (2006): Randomized phase III trial of whole-abdominal irradiation versus doxorubicin and cisplatin chemotherapy in advanced endometrial carcinoma: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* 24(1): 36-44.
- Reubi JC (2003): Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev* 24(4): 389-427.
- Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, Nair RM, Debeljuk L, White WF (1971): Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science* 173(4001): 1036-1038.
- Schally AV, Nagy A (1999): Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors. *Eur J Endocrinol* 141(1): 1-14.
- Schwartzman RA, Cidlowski JA (1993): Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev* 14(2): 133-151.
- Silverberg SG (2000): Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol* 19(1): 7-15.
- Simon WE, Albrecht M, Hansel M, Dietel M, Holzel F (1983): Cell lines derived from human ovarian carcinomas: growth stimulation by gonadotropic and steroid hormones. *J Natl Cancer Inst* 70(5): 839-845.
- Simons AL, Ahmad IM, Mattson DM, Dornfeld KJ, Spitz DR (2007): 2-Deoxy-D-glucose combined with cisplatin enhances cytotoxicity via metabolic oxidative stress in human head and neck cancer cells. *Cancer Res* 67(7): 3364-3370.
- Singh D, Banerji AK, Dwarakanath BS, Tripathi RP, Gupta JP, Mathew TL, Ravindranath T, Jain V (2005): Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-d-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme. *Strahlenther Onkol* 181(8): 507-514.
- Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD, Jr., Chen LB (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(9): 3671-3675.

- Srkalovic G, Wittliff JL, Schally AV (1990): Detection and partial characterization of receptors for [D-Trp⁶]-luteinizing hormone-releasing hormone and epidermal growth factor in human endometrial carcinoma. *Cancer Res* 50(6): 1841-1846.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Bio-technology* 24: 145-149.
- Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, Vermorken JB, Mangioni C, Madronal C, Franchi M, Tateo S, Zanetta G, Scarfone G, et al. (2003): Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: european organisation for research and treatment of cancer-adjuvant chemotherapy in ovarian neoplasm trial. *J Natl Cancer Inst* 95(2): 113-125.
- von Georgi R, Franke FE, Munstedt K (2003): Influence of surgery and postoperative therapy and tumor characteristics on patient prognosis in advanced ovarian carcinomas. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 111(2): 189-196.
- Warburg O: The metabolism of Tumors. Costable: London 1930
- Weiss RB (1992): The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol* 19(6): 670-686.
- Westphalen S, Kotulla G, Kaiser F, Krauss W, Werning G, Elsasser HP, Nagy A, Schulz KD, Grundker C, Schally AV, et al. (2000): Receptor mediated antiproliferative effects of the cytotoxic LHRH agonist AN-152 in human ovarian and endometrial cancer cell lines. *Int J Oncol* 17(5): 1063-1069.
- White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD (1998): Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(1): 305-309.
- Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Inagaki N, Yamada Y, Inoue K, Manabe T, Imura H (1990): Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 170(1): 223-230.
- Zhang F, Aft RL (2009): Chemosensitizing and cytotoxic effects of 2-deoxy-D-glucose on breast cancer cells. *J Cancer Res Ther* 5(1): 41-43.

Zhang XD, Deslandes E, Villedieu M, Poulain L, Duval M, Gauduchon P, Schwartz L, Icard P (2006): Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines in vitro. *Anticancer Res* 26(5A): 3561-3566.

7 Veröffentlichung

In Vorbereitung:

Reutter M, Emons G, Gründker C: Inhibition of glycolysis enhances antitumor efficacy of cytotoxic LHRH analog AESZ-108 (AN-152).