

**Induktion von Apoptose in  
gynäkologischen Karzinomen  
*in vitro* und *in vivo* durch  
Antagonisten des Gonadotropin-  
Releasing Hormons Typ II**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Stefanie Fister**

aus Erfurt

Göttingen 2007

D7

Referent: Prof. Dr. R. Hardeland

Korreferent: Jun.-Prof. Dr. R. Heinrich

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Januar 2008

*Meiner Familie*

## ZUSAMMENFASSUNG

In humanen Endometrium-, Ovarial- und Mammakarzinomen werden GnRH-I und GnRH-II und ihre Rezeptoren als Teil eines negativen, autokrinen Regulationssystems der Zellproliferation exprimiert. Basierend auf einer Tumorzell-spezifischen Signaltransduktion inhibieren GnRH-I und GnRH-II Agonisten die mitogene Signaltransduktion der Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Dies resultiert in einer Inhibition der Proliferation von gynäkologischen Karzinomzellen. Die Induktion von Apoptose ist hier nicht beteiligt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Effekte von GnRH-II Antagonisten auf gynäkologische Karzinomzelllinien *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass GnRH-II Antagonisten bereits in nanomolaren Konzentrationen Apoptose dosisabhängig induzieren und somit zu einer Reduktion der Zellzahl in gynäkologischen Karzinomzelllinien führen. Die apoptotischen Effekte sind über den mitochondrialen Signalweg vermittelt, resultieren in einer Aktivierung der Effektor-Caspase-3 und in der Degradation der DNA im Nukleus. Diese Effekte konnten auf verschiedene *in vivo* Tumormodelle übertragen werden. Dabei war das Wachstum gynäkologischer Karzinome xenotransplanteder Nacktmäuse signifikant gehemmt und führte sogar zum Wachstumsstillstand der Tumoren. Auch hier waren die Effekte Apoptose-vermittelt. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass GnRH-II Antagonisten sowohl an den GnRH-I Rezeptor als auch an den putativen GnRH-II Rezeptor binden und die Aktivierung der Stress-aktivierten MAPKs p38/SAPK2 und JNK/SAPK1 induzieren.

Zusammengenommen konnte in dieser Arbeit der Vorteil von GnRH-II Antagonisten in einer nebenwirkungsarmen Antitumor-Therapie dargestellt werden. Sie wirken nicht wie andere GnRH Analoga nur über die Rezeptoren der Hypophyse durch eine Blockade der Steroidhormonsynthese, sondern induzieren direkt in den Tumorzellen Rezeptor-vermittelt Apoptose. Die grundlegenden Mechanismen zur Signaltransduktion, die der Induktion von Apoptose zugrunde liegen, konnten außerdem aufgeklärt werden.

# INHALT

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>I</b>
<b>INHALT</b> .....	<b>II</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Gonadotropin-Releasing Hormon Typ I und II</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Die Geschichte eines Hormons .....	1
1.1.2 GnRH-I in der Hypophyse .....	2
1.1.3 Der hypophysäre GnRH-I Rezeptor .....	3
1.1.4 Signaltransduktion des GnRH-I Rezeptors in der Hypophyse .....	4
1.1.5 Signaltransduktion des GnRH-I Rezeptors in Gynäkologischen Tumoren .....	6
1.1.6 GnRH-II und sein Rezeptor .....	8
<b>1.2 GnRH Analoga als Pharmazeutika</b> .....	<b>9</b>
1.2.1 Entwicklung von GnRH Analoga .....	9
1.2.2 Struktur von GnRH Agonisten und Antagonisten .....	11
1.2.3 GnRH Analoga in der Gynäkologie und Geburtshilfe .....	13
1.2.4 Wirkung von GnRH Analoga <i>in vitro</i> .....	14
<b>1.3 Gynäkologische Karzinome</b> .....	<b>15</b>
1.3.1 Mammakarzinom .....	15
1.3.1.1 Epidemiologie und Ätiologie .....	15
1.3.1.2 Endokrine Therapie .....	17
1.3.2 Ovarialkarzinom .....	18
1.3.2.1 Epidemiologie und Ätiologie .....	18
1.3.2.2 Endokrine Therapie .....	19
1.3.3 Endometriumkarzinom .....	20
1.3.3.1 Epidemiologie und Ätiologie .....	20
1.3.3.2 Endokrine Therapie .....	21
<b>1.4 Fragestellung und Zielsetzung</b> .....	<b>22</b>
<b>2 MATERIAL</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1 Geräte</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2 Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>25</b>

---

<b>2.3</b>	<b>Chemikalien</b> .....	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>GnRH Analoga</b> .....	<b>25</b>
<b>2.5</b>	<b>Puffer und Lösungen</b> .....	<b>26</b>
<b>2.6</b>	<b>Kulturmedien und Medienzusätze</b> .....	<b>27</b>
2.6.1	Kulturmedien für Bakterien .....	27
2.6.2	Kultur- und Einfriermedien für eukaryotische Zellen.....	27
<b>2.7</b>	<b>Biologisches Material</b> .....	<b>28</b>
2.7.1	Mikroorganismen .....	28
2.7.2	Zelllinien .....	28
2.7.3	Mausstamm .....	29
<b>2.8</b>	<b>Plasmide</b> .....	<b>30</b>
<b>2.9</b>	<b>Oligonukleotide</b> .....	<b>30</b>
<b>2.10</b>	<b>Enzyme</b> .....	<b>31</b>
<b>2.11</b>	<b>Antikörper</b> .....	<b>31</b>
<b>2.12</b>	<b>Inhibitoren</b> .....	<b>32</b>
<b>2.13</b>	<b>Kommerzielle Reaktionssysteme</b> .....	<b>32</b>
<b>2.14</b>	<b>Software</b> .....	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellkultivierung</b> .....	<b>34</b>
3.1.1	Kultivierung und Passagieren adhärenter Zellen.....	34
3.1.2	Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zellen .....	34
3.1.3	Zellzählung.....	34
3.1.4	Alamar-Blue Proliferations-Assay .....	35
3.1.5	Präparation von Tumorzellen für <i>in vivo</i> Experimente.....	35
3.1.6	Transiente Transfektion adhärenter Zellen.....	36
3.1.7	Stimulation mit GnRH Analoga .....	36
3.1.8	Östradiol-Screen Assay .....	37
3.1.9	Präparation von Zellmembranen .....	37
3.1.10	GnRH-I Rezeptor-Bindungsstudien.....	38
3.1.11	CRE-Reporter Gen Assay .....	39

---

<b>3.2</b>	<b>Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Apoptose</b> .....	<b>39</b>
3.2.1	Zellmorphologie mittels Phasenkontrastmikroskopie .....	39
3.2.2	Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials.....	40
3.2.3	Quantifizierung der Apoptose mittels Durchflusszytometrie.....	40
3.2.4	TUNEL Assay .....	41
<b>3.3</b>	<b>Versuchstiere</b> .....	<b>42</b>
3.3.1	Haltungsbedingungen von Labormäusen.....	42
3.3.2	Tumormodell .....	42
3.3.3	Subkutane Tumorzellinjektion.....	43
3.3.4	Kontrolle des Tumorwachstums .....	43
3.3.5	Versuchskonzeption.....	43
3.3.6	Sektion .....	45
3.3.7	Gewinnung von Serum aus Mäuseblut.....	45
3.3.8	Gewebegewinnung und Aufbereitungsverfahren .....	45
<b>3.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>46</b>
3.4.1	Isolierung von Nukleinsäuren .....	46
3.4.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA für die Transfektion .....	46
3.4.1.2	Isolierung von RNA aus Tumorgewebe .....	46
3.4.1.3	Isolierung von RNA aus adhärenenten Zellen .....	47
3.4.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	47
3.4.3	Reverse Transkription.....	47
3.4.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	48
3.4.5	Agarose-Gelelektrophorese .....	50
<b>3.5</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>51</b>
3.5.1	Präparation von Zelllysaten .....	51
3.5.2	Quantifizierung von Proteinen nach Bradford.....	51
3.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	52
3.5.4	Western Blot .....	53
3.5.5	Detektion und Visualisierung .....	54
3.5.6	<i>Strippen</i> von Nitrocellulosemembranen.....	54
<b>3.6</b>	<b>Histologische Methoden</b> .....	<b>55</b>
3.6.1	Einbettung von Tumoren in Paraffin .....	55
3.6.2	Anfertigung von Paraffinschnitten.....	55
3.6.3	Entparaffinierung/Rehydrierung von Paraffinschnitten .....	55
3.6.4	Immunfärbung der Gewebeschnitte.....	55
3.6.5	Färbung mit Hämatoxylin-Eosin.....	56
3.6.6	Tissue Array .....	56

---

<b>3.7</b>	<b>Dokumentation und statistische Analysen .....</b>	<b>57</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>58</b>
<b>4.1</b>	<b>Design und Struktur der GnRH-II Antagonisten .....</b>	<b>58</b>
<b>4.2</b>	<b>Effekte von GnRH-II Antagonisten auf die Proliferation und Induktion von Apoptose <i>in vitro</i>.....</b>	<b>59</b>
4.2.1	Antiproliferative Effekte der GnRH-II Antagonisten auf gynäkologische Karzinomzelllinien .....	59
4.2.2	Induktion von Apoptose <i>in vitro</i> .....	60
4.2.2.1	Morphologische Veränderungen der Zellen.....	60
4.2.2.2	Quantifizierung mittels DNA-Degradation .....	61
4.2.2.3	Aktivierung der Caspase-3.....	63
4.2.2.4	Beeinflussung des mitochondrialen Membranpotentials .....	64
<b>4.3</b>	<b>Effekte von GnRH-II Antagonisten <i>in vivo</i>.....</b>	<b>65</b>
4.3.1	Effekte auf das Tumorstadium im Nacktmausmodell.....	65
4.3.1.1	Ovarialkarzinom .....	65
4.3.1.2	Endometriumkarzinom .....	67
4.3.1.3	Mammakarzinom.....	68
4.3.2	Induktion von Apoptose <i>in vivo</i> .....	71
4.3.3	Wirkung der GnRH-II Antagonisten über die Hypophyse .....	72
4.3.3.1	Uterus-Ovarialgewicht der Nacktmäuse .....	72
4.3.3.2	Maus-Serumabhängige Proliferation <i>in vitro</i> .....	73
4.3.4	Wachstumsfaktor-Rezeptorexpression in den Tumoren nach Behandlung mit GnRH-II Antagonisten.....	74
<b>4.4</b>	<b>Interaktion mit der Signaltransduktion gynäkologischer Karzinomzelllinien .....</b>	<b>76</b>
4.4.1	GnRH-II Rezeptorverteilung im Menschen.....	76
4.4.2	GnRH Rezeptor Expression in gynäkologischen Karzinomzelllinien .....	77
4.4.3	Rezeptor-Bindungs-Assay .....	78
4.4.4	Funktionalitäts-Assay.....	79
4.4.5	Einfluss von Pertussis Toxin auf die Induktion von Apoptose .....	81
4.4.6	Interaktion mit der IGF-Rezeptor Signalkaskade.....	82
4.4.7	Interaktion mit der MAPK-Signalkaskade .....	83
4.4.7.1	Effekt auf die Aktivität der ERK1/2.....	83
4.4.7.2	Effekt auf die Aktivität von p38 und JNK.....	84
4.4.7.3	Einfluss auf die MAPK-Aktivität nach GnRH-I Rezeptor <i>knock down</i> .....	85

---

<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>88</b>
<b>5.1</b>	<b>Induktion von Apoptose in gynäkologischen Karzinomen</b> .....	<b>88</b>
5.1.1	Reduktion der Zellzahl durch Apoptose.....	88
5.1.2	Mechanismen der Apoptoseinduktion.....	89
<b>5.2</b>	<b>GnRH-II Antagonisten-induzierte Signalwege</b> .....	<b>90</b>
5.2.1	Interaktion mit der PKB/Akt-Signaltransduktion.....	90
5.2.2	Interaktion mit MAPK-Signalwegen .....	92
5.2.3	MAPK und Apoptose.....	94
5.2.4	GnRH Rezeptor vermittelte Signaltransduktion .....	96
<b>5.3</b>	<b>Effekte der GnRH-II Antagonisten <i>in vivo</i></b> .....	<b>98</b>
5.3.1	Inhibition des Tumorwachstum .....	98
5.3.2	Induktion von Apoptose <i>in vivo</i> .....	100
5.3.3	GnRH Rezeptor-Downregulation .....	100
5.3.4	Wirkung über die Hypophyse.....	102
5.3.5	Therapeutischer Einsatz von GnRH-II Antagonisten.....	104
<b>5.4</b>	<b>Fazit und Ausblick</b> .....	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURANGABEN</b> .....	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>135</b>
<b>7.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>135</b>
<b>7.2</b>	<b>Code für Aminosäuren</b> .....	<b>139</b>
7.2.1	Natürliche Aminosäuren .....	139
7.2.2	Nicht-natürliche Aminosäuren.....	140
<b>7.3</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>140</b>
<b>7.4</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>145</b>
<b>7.5</b>	<b>Formelverzeichnis</b> .....	<b>146</b>
<b>7.6</b>	<b>Firmenindex</b> .....	<b>146</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>149</b>
	<b>PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>150</b>

---

**LEBENS LAUF ..... 152**

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 GONADOTROPIN-RELEASING HORMON TYP I UND II

### 1.1.1 DIE GESCHICHTE EINES HORMONS

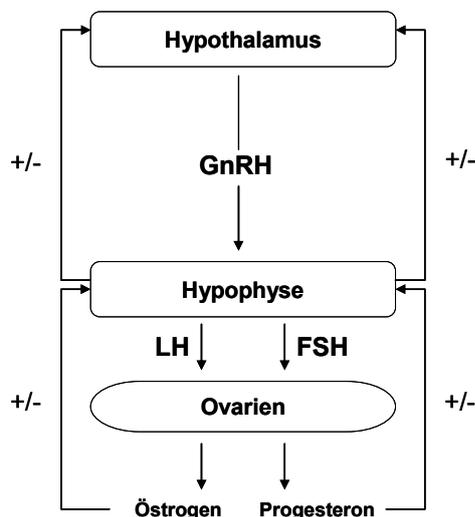
Im Jahr 1971 wurde das hypothalamische Dekapeptid Luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon (LHRH) erstmals von Schally und Guillemin unabhängig voneinander strukturell charakterisiert und dessen Wirkung in der Hypophyse beschrieben (Amoss et al., 1971; Schally et al., 1971). Für ihre Arbeiten zum Thema „Peptidhormon-Produktion des Gehirns“ wurden beide im Jahr 1977 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Das Hormon wurde in *Gonadotropin-Releasing Hormone* (GnRH) umbenannt, als bekannt wurde, dass es auch die Sekretion des Follikel-stimulierenden Hormons (FSH) induziert (Fink, 1976; Matsuo et al., 1971; McCann et al., 2001). Die zuerst entdeckte Variante wurde später GnRH-I genannt, um sie von anderen Isoformen, die bis heute gefunden wurden, zu unterscheiden. Es sind weitere 22 strukturelle Varianten in Tieren bekannt, die in den meisten Fällen nach dem Ursprungsorganismus benannt wurden, in dem sie entdeckt wurden. In fast allen Vertebraten ist ein weiterer Subtyp des Gonadotropin-Releasing Hormons bekannt, das GnRH-II, welches zuerst im Huhn entdeckt und somit *chicken* GnRH-II genannt wurde (Miyamoto et al., 1984). Im Laufe der Jahre wurde GnRH-II in einer Vielzahl von Vertebraten, z.B. in Maulwürfen (Kasten et al., 1996), Mäusen (Chen et al., 1998), Schweinen (Montaner et al., 1999), Schafen und Kühen (Millar, 2003) und verschiedenen Primaten, einschließlich des Menschen (Latimer et al., 2000; Lescheid et al., 1997; Urbanski et al., 1999; White et al., 1998), entdeckt. Die Omnipräsenz von GnRH-II im Reich der Vertebraten legt nahe, dass das Hormon evolutionär konserviert ist und eine wichtige biologische Funktion einnimmt (Temple et al., 2003).

Die Gene für GnRH-I und -II liegen entsprechend auf den Chromosomen acht (Yang-Feng et al., 1986) und 20 (Carolsfeld et al., 2000). Beide Gene haben die

gleiche modulare Struktur von drei Introns und vier Exons, welche für das *precursor* Polypeptid, bestehend aus Signalpeptid, Dekapeptid und GnRH-assoziiertem Peptid (GAP), dessen Funktion weitgehend unbekannt ist, kodieren (Limonta et al., 2003). Bei nicht-säugetenden Vertebraten ist eine dritte strukturelle Variante des GnRHs, das GnRH-III, bekannt (Dubois et al., 2002).

### 1.1.2 GNRH-I IN DER HYPOPHYSE

GnRH-I spielt eine wichtige Schlüsselrolle bei der Kontrolle der Reproduktion von Vertebraten einschließlich des Menschen und wurde zuerst in Gehirnen von Schweinen und Schafen entdeckt (Burgus et al., 1972; Matsuo et al., 1971). Das Neurohormon wird pulsatil, d.h. in periodischen Abständen, alle 30 bis 120 min von Neuronen des Hypothalamus in das hypophysäre Portalnervensystem sezerniert (Knobil, 1990). GnRH-I bindet dort spezifisch an die hochaffinen, membranständigen Rezeptoren (GnRH-I Rezeptoren) der gonadotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens, die über die G-Proteine  $\alpha_{q/11}$  an den Phospholipase C Signalweg gekoppelt sind (Hsieh and Martin, 1992; Shah and Milligan, 1994). Durch die Bindung an den Rezeptor reguliert

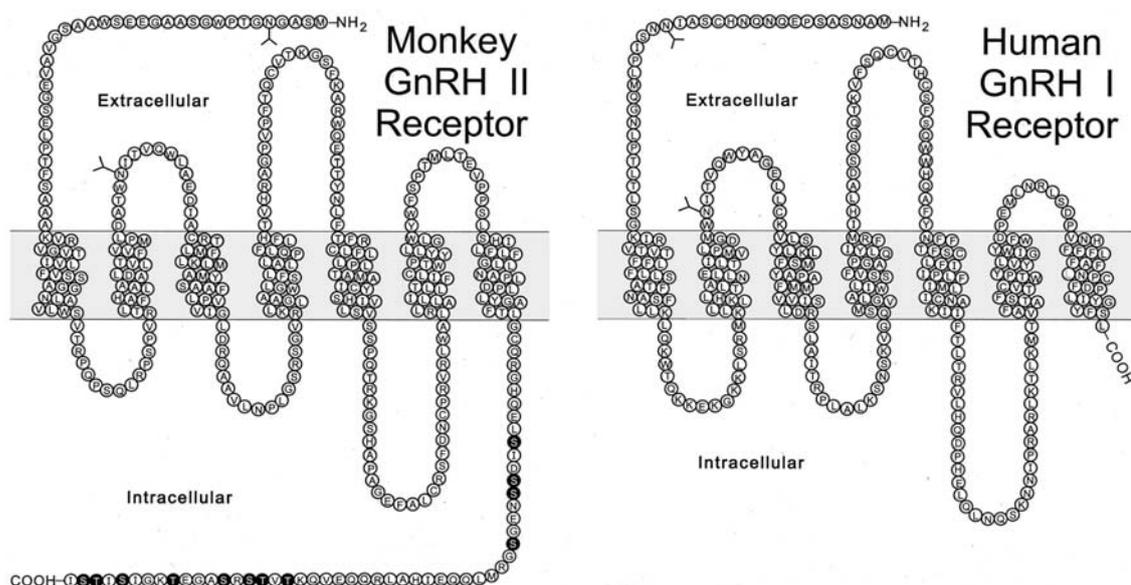


**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung des Rückkopplungsmechanismus' der Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden-Achse. GnRH-I stimuliert die Sekretion von LH und FSH in der Hypophyse, während diese Hormone für die Steroidhormonsynthese in den Ovarien verantwortlich sind. Durch einen *feedback* Mechanismus wird die Ausschüttung der Hormone reguliert.

GnRH-I die Synthese und Sekretion des Luteinisierenden Hormons (LH) und des Follikel-Stimulierenden Hormons (FSH) (Naor, 1990; Stojilkovic et al., 1994). Durch die Freisetzung dieser Hormone wird in den Ovarien die Follikelreifung hervorgerufen und die Steroidhormonsynthese (Östrogen, Progesteron) aktiviert. Durch verschiedene Rückkopplungsmechanismen wird die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse reguliert (Abb. 1.1).

### 1.1.3 DER HYPOPHYSÄRE GnRH-I REZEPTOR

Der humane GnRH-I Rezeptor wurde erstmals 1992 von Kakar *et al.* kloniert und sequenziert (Kakar et al., 1992). Das GnRH-I Rezeptor Gen liegt auf Chromosom vier. Der Rezeptor gehört zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR, *G-protein coupled receptor*), dessen Signale über heterotrimeren GTP-Proteine vermittelt werden. GPCRs gehören zur Familie der Sieben-Transmembran-Rezeptoren (7-TMR) bei denen die sieben transmembranen Helices über Peptidschleifen miteinander verbunden sind. Das

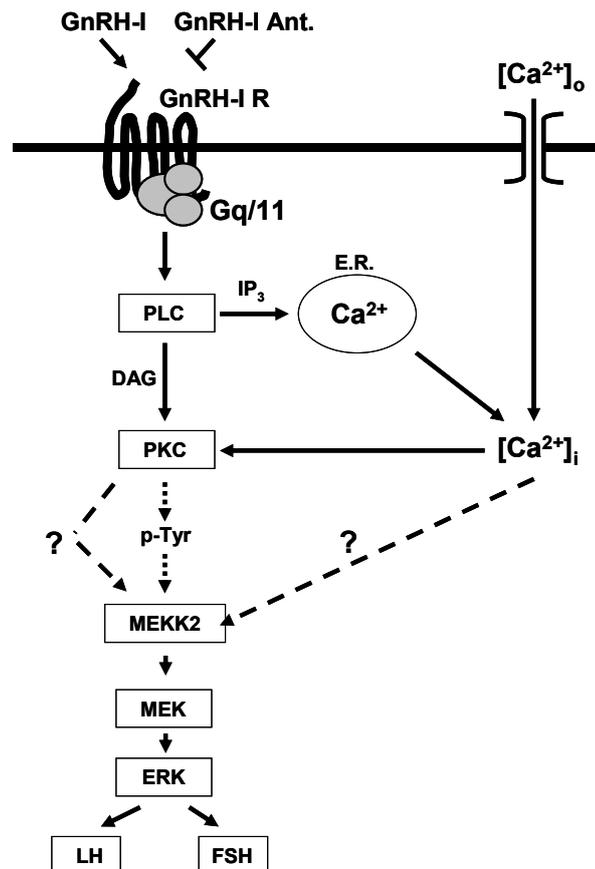


**Abb. 1.2: Strukturvergleich des GnRH-II Rezeptors beim Affen mit dem humanen GnRH-I Rezeptor.** Der GnRH-II Rezeptor besitzt im Gegensatz zum GnRH-I Rezeptor einen zytosomatischen Schwanz, was nach Phosphorylierung zu einer schnelleren Internalisierung des Rezeptors führt. Phosphorylierungsmöglichkeiten an den Aminosäuren Serin und Threonin im cytoplasmatischen Schwanz des Affen GnRH-II Rezeptors sind schwarz hinterlegt. Glykosylierungsschnittstellen sind mit (Y) markiert (Neill, 2002a).

glykosylierte, aminoterninale Ende befindet sich auf der extrazellulären Seite während das carboxyterminale Ende auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert ist. Während GPCRs mit extrazellulärer Liganden-Bindungsdomäne durch lange N-Termini und kurze C-Termini gekennzeichnet sind, fehlt dem GnRH-I Rezeptor der intrazelluläre Carboxyterminus komplett (Abb. 1.2), was ihn zu einer Besonderheit unter den GPCRs macht (Sealfon et al., 1997; Stojilkovic et al., 1994). Nach der Bindung von GnRH-I an seinen Rezeptor wird der Ligand-Rezeptor-Komplex durch rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert. Die Internalisierung ist aber keine essentielle Voraussetzung für die Sekretion der Gonadotropine LH und FSH (Hopkins and Gregory, 1977).

#### **1.1.4 SIGNALTRANSDUKTION DES GNRH-I REZEPTORS IN DER HYPOPHYSE**

Nach der Bindung von GnRH-I an den Rezeptor kommt es zur Konformationsänderung der Rezeptoranteile, wodurch eine Interaktion mit den assoziierten G-Proteinen ermöglicht wird. In der Hypophyse handelt es sich dabei um die G-Proteine  $\alpha_{q/11}$ , welche zu einer kalziumabhängigen Signaltransduktion führen, bei der die Phospholipase C (PLC) eine Schlüsselposition einnimmt (Naor et al., 2000). Nach der primären Aktivierung der PLC hydrolysiert diese das membrangebundene Inositol-Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ( $PIP_2$ ). Als Produkte der Hydrolyse entstehen die *second messenger* Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat ( $IP_3$ ) (Kraus et al., 2001; McArdle et al., 2002; Ruf et al., 2003).  $IP_3$  diffundiert an die Oberfläche des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und bindet dort an  $IP_3$ -spezifische Rezeptoren. Dadurch wird die Freisetzung von intrazellulär gespeicherten  $Ca^{2+}$ -Ionen hervorgerufen, welche hauptsächlich an der frühen Zellantwort beteiligt sind (Berridge, 1993; Keizer et al., 1995). Das membranassoziierte DAG aktiviert auf den GnRH-I Stimulus hin, ebenfalls kalziumabhängig, die Proteinkinase C (PKC). Die PKC leitet ihrerseits verschiedene Phosphorylierungsschritte zytoplasmatischer und nukleärer Proteine ein und aktiviert eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, die die Induktion oder Repression spezifischer mRNAs induzieren. Die Signal-



**Abb. 1.3: Graphische Darstellung der GnRH-I Rezeptor Signaltransduktion in der Hypophyse.** Nach GnRH-Stimulation der hypophysären GnRH-I Rezeptoren erfolgt die Aktivierung des G-Proteins  $\alpha_q$ , dem eine Kalzium-abhängige Signaltransduktion folgt. Nach Aktivierung der Phospholipase C (PLC) wird die mitogene Signaltransduktion über die Proteinkinase C (PKC) reguliert und die Synthese der Gonadotropine Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) initiiert. Gestrichelte Pfeile geben indirekte Signalwege an und durchgezogene Pfeile indirekte Signalwege.

transduktion über den GnRH-I Rezeptor nach Aktivierung der PKC resultiert in einer Aktivierung der vier mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) *extracellular regulated kinase1/2* (ERK1/2), *p38 (stress-activated protein kinase syn. SAPK2)*, *c-Jun N-terminal kinase* (JNK; syn. SAPK1) und *big MAPK* (BMK), die alle an der Regulierung der Zellantwort beteiligt sind und somit die Steuerung der Genexpression auf Transkriptionsebene einleiten (Bonfil et al., 2004; Harris et al., 2002; Levi et al., 1998; Roberson et al., 1999). Die aktivierten MAPK sind sowohl an der Synthese der Gonadotropine LH und FSH als auch an der der GnRH-I Rezeptor Expression beteiligt (Abb. 1.3).



Neben seinen physiologischen Bindungsstellen in der Adenohypophyse wurden GnRH-I und sein Rezeptor auch in verschiedenen peripheren, reproduktiven Organen sowie deren Tumoren gefunden (Chegini et al., 1996; Emons et al., 1997; Hsueh and Jones, 1981; Lin et al., 1995; Minaretzis et al., 1995). Die Expression von GnRH-I und seinem Rezeptor konnte in ca. 80 % der humanen Ovarial- und Endometriumkarzinome sowie in ca. 50 % der Mammakarzinome nachgewiesen werden (Irmer et al., 1994; Mangia et al., 2002; Völker et al., 2002). Die Sequenz des GnRH-I Rezeptors, vorkommend in gynäkologischen Karzinomen, stimmt mit der Sequenz des hypophysären Rezeptors überein (Gründker et al., 2001b; Kakar et al., 1994). Daher war es nahe liegend, dass die Mechanismen zur Signaltransduktion mit denen der Hypophyse übereinstimmen. Die Mechanismen um PLC, PKC und die Adenylcyclase sind zwar pharmakologisch induzierbar, werden aber nicht durch GnRH-I aktiviert (Emons et al., 1996a). In gynäkologischen Karzinomen, ebenso im Prostatakarzinom, aktiviert das durch GnRH-I induzierte G-Protein  $\alpha_i$  eine Phosphotyrosinphosphatase (PTP), wodurch die Tyrosin-Autophosphorylierung von Wachstumsfaktorrezeptoren gehemmt wird. Dies führt zu einer Inhibition der mitogenen Wachstumsfaktor-Signaltransduktion (Emons et al., 1997; Gründker et al., 2001b; Gründker et al., 2000b; Limonta et al., 1999). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die *epidermal growth factor* (EGF)-induzierte Aktivierung der MAPK ERK1/2 mit Hilfe von GnRH-I und dessen Analoga inhibiert werden kann (Gründker et al., 2000b). *Downstream* führt dies zu einer Inhibition des Transkriptionsfaktors *c-fos*. Darüber hinaus sind GnRH-I und seine Agonisten in der Lage den *nuclear factor kappa B* (NF $\kappa$ B) zu aktivieren und die Zellen somit vor Zytostatika-induzierter Apoptose zu schützen (Fister et al., 2007b; Gründker et al., 2000a). Ebenso werden das Aktivator-Protein 1 (AP-1) und der Transkriptionsfaktor *c-jun* aktiviert und dadurch der Zellzyklus in der G<sub>0/1</sub>-Phase arretiert (Gründker et al., 2001a). Des Weiteren wird durch GnRH-Analoga die Invasion und Migration von Mammakarzinomzellen inhibiert, indem sie die Sekretion des durch Osteoblasten erzeugten Chemokins *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1) reduzieren (von Alten et al., 2006) (Abb. 1.4).

### 1.1.6 GNRH-II UND SEIN REZEPTOR

GnRH-II wurde erstmals im Jahr 1998 im Menschen beschrieben (White et al., 1998). Die Aminosäuresequenz von GnRH-II ist 70 % homolog zu GnRH-I. Die Dekapeptide unterscheiden sich durch drei Aminosäuren an den Positionen fünf, sieben und acht (Tab. 1.1). Aufgrund der großen Homologie ist anzunehmen, dass GnRH-II durch Genduplikation von GnRH-I entstanden ist. Da die Struktur von GnRH-II vom Fisch zum Säugetier hoch konserviert ist (100 %), im Gegensatz zu GnRH-I, das nur zu 60 % identisch ist, und in unterschiedlichen Gewebearten nachgewiesen wurde, geht man davon aus, dass ihm eine besonders bedeutende physiologische Funktion zukommt, welche bisher nicht direkt aufgeklärt werden konnte (Kauffman, 2004).

Die Existenz von drei verschiedenen GnRH Isoformen lässt die Vermutung zu, dass drei verschiedene Rezeptoren für GnRH existieren. 2001 wurde ein neuer Rezeptor, hochspezifisch für GnRH-II, beim Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) kloniert (Millar et al., 2001). Zur gleichen Zeit haben Neill *et al.* den GnRH-II Rezeptor beim Rhesusaffen kloniert (Neill et al., 2001). Im Gegensatz zum GnRH-I Rezeptor besitzt der GnRH-II Rezeptor einen cytoplasmatischen Schwanz (Abb. 1.2), was nach Phosphorylierung zu einer schnelleren Internalisierung des Rezeptors führt und andere Signaltransduktionsmechanismen aktiviert (Millar et al., 2001). Beim Menschen konnte der GnRH-II Rezeptor bisher nicht als vollständiges Transkript nachgewiesen werden, da sich in seiner DNA-Sequenz ein *in-frame* Stoppcodon (zweites Exon), sowie eine *frameshift* Mutation (zw. AS neun und zehn) befinden (Millar, 2003; Neill et al., 2001). Es wird vermutet, dass der funktionsfähige GnRH-II Rezeptor in verschiedenen *Splice*-Varianten exprimiert wird (Neill et al., 2004) oder als Fünf-Transmembran-Rezeptor (TMR) aktiv ist,

Tab. 1.1: Primärstruktur der Dekapeptide GnRH-I und GnRH-II

AS-Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GnRH-I	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>
GnRH-II	pGlu	His	Trp	Ser	<b>His</b>	Gly	<b>Trp</b>	<b>Tyr</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>

dem die ersten beiden Transmembrandomänen fehlen (Neill, 2002a). Eine solche Variante ist vom Chemokin Rezeptor her bekannt, bei dem das N-terminale Segment direkt an die TM-3 bindet und demnach eine Deletion der TM-1 und 2 hervorgerufen wird (Ling et al., 1999). Außerdem wurde der GnRH-II Rezeptor beim Schwein ebenfalls als 5-TMR nachgewiesen (Neill et al., 2004). Das vorzeitige Stoppcodon TGA im GnRH-II Rezeptor könnte durch den Einbau der Aminosäure Selenocystein übergangen werden und somit zum translatierbaren Codon dekodiert werden (Bertram et al., 2001). Für das Umgehen des *frameshifts* ist lediglich ein Gen retroviralen Ursprungs bei Säugetieren bekannt (Namy et al., 2004). Unterstützt wird diese Hypothese auch durch das Identifizieren eines humanen GnRH-II Rezeptor-ähnlichen Proteins, welches in der Plazenta und Karzinomen des Reproduktionstraktes nachgewiesen wurde und vom Molekulargewicht einem 5-Transmembran-Rezeptor entsprechen könnte (Eicke et al., 2005).

Die mRNA des putativen GnRH-II Rezeptors wird ubiquitär in menschlichen Geweben exprimiert. Es wird jedoch vermutet, dass es sich dabei um unvollständige Rezeptor-Transkripte handelt (Neill, 2002a).

Die Signaltransduktion des GnRH-II Rezeptors in gynäkologischen Karzinomen entspricht der des GnRH-I Rezeptors, indem GnRH-II mit der mitogenen Wachstumsfaktorrezeptor-Signaltransduktion interagiert und ebenfalls eine PTP aktiviert, die die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors hemmt (Eicke et al., 2006) (Abb.1.4).

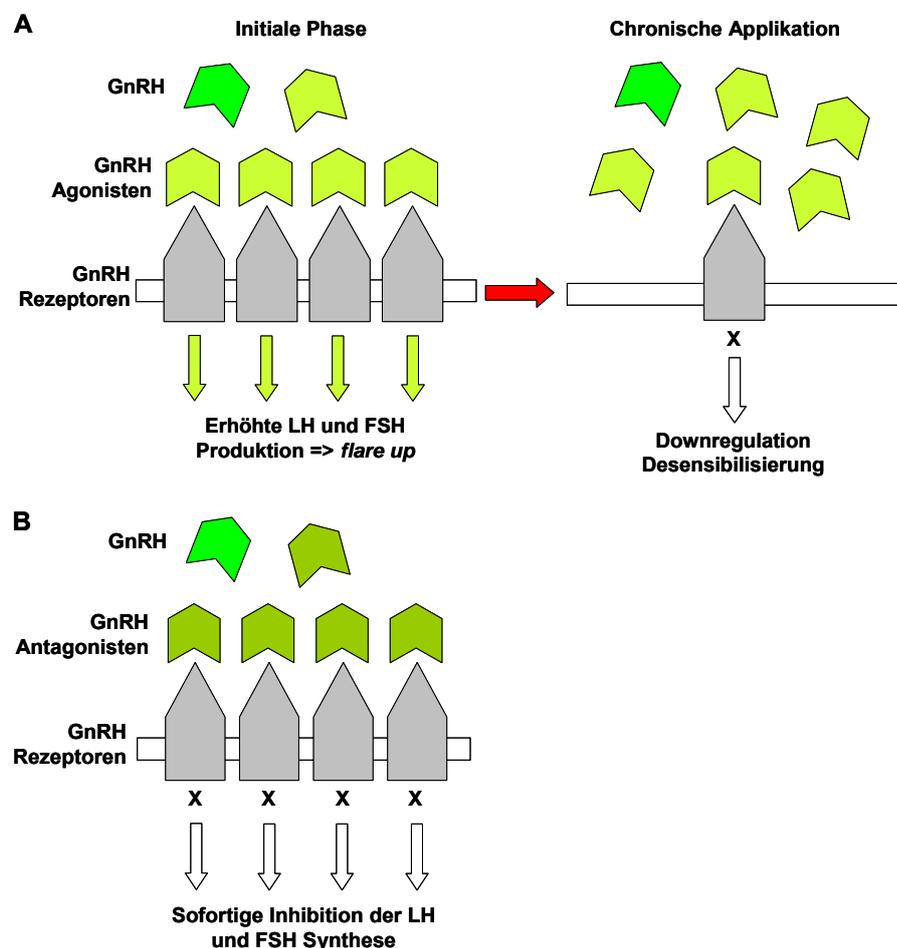
## **1.2 GNRH ANALOGA ALS PHARMAZEUTIKA**

### **1.2.1 ENTWICKLUNG VON GNRH ANALOGA**

Die ersten GnRH-I Agonisten wurden bereits wenige Monate nach der Veröffentlichung der Struktur des Neurohormons entwickelt, in der großen Hoffnung die Fertilität zu erhöhen. Schon 1979 wurde erkannt, dass nach einer initial erhöhten Synthesephase von LH und FSH zu Beginn der Verabreichung von GnRH-I Agonisten (*flare up* Effekt) die Produktion der Steroidhormone zum Erliegen kommt (Cusan et al., 1979). Der Mechanismus der Desensibilisierung

ist nur wenig verstanden. Durch die Desensibilisierung wird die GnRH-I Rezeptor und  $G_{q/11}$  Expression herunterreguliert, was zu einer verminderten Signaltransduktion von PKC, cAMP und  $Ca^{2+}$  führt (Labrie et al., 1981). Als Folge der entstandenen Desensibilisierung sind die gonadotropen Hypophysenzellen gegenüber dem nativen GnRH-I wie auch dem GnRH-I Agonisten refraktär.

Die Entwicklung von GnRH-I Antagonisten dauerte wesentlich länger, aufgrund des gegensätzlichen Mechanismus' im Vergleich zu den Agonisten (Abb. 1.5), da mindestens vier Aminosäuren ausgetauscht werden, um eine entsprechende pharmakologische Wirkung zu erzielen (van Loenen et al., 2002). GnRH-I



**Abb. 1.5: Wirkungsmechanismus von GnRH-I Agonisten (A) und GnRH-I Antagonisten (B).** Bei der Verabreichung von GnRH-I Agonisten kommt es initial zu einem Anstieg der LH und FSH Synthese (*flare up* Effekt). Eine chronische Applikation führt zur *Downregulation* der Rezeptoren und zur Desensibilisierung gegenüber GnRH-I. Im Gegensatz dazu führt eine Verabreichung von GnRH-I Antagonisten zur sofortigen Inhibition der LH und FSH Synthese und die GnRH-I Rezeptoren bleiben erhalten.

Antagonisten binden zwar mit hoher Affinität an den Rezeptor, eine Induktion der Signaltransduktion unterbleibt jedoch. Sie fungieren als kompetitive Inhibitoren. Nach Verabreichung von GnRH-I Antagonisten kommt es nicht zu einer Dimerisierung des GnRH-I Rezeptors, wie dies bei der Gabe von GnRH-I Agonisten vorkommt. Nach subkutaner Administration kommt es zu einem schnellen Abfall von LH und FSH, der *flare up* Effekt bleibt somit aus (Felberbaum et al., 2000). Allerdings mussten die Entwickler zu Beginn mit einem höheren Nebenwirkungsspektrum rechnen, da es häufig zu Histaminausschüttung an Injektionsstellen, Ödembildung und allergischen Reaktionen kam (Flouret et al., 1992; Schmidt et al., 1984). Die sich mittlerweile in der dritten Generation befindlichen GnRH-I Antagonisten sind jedoch sehr gut verträglich (Bajusz et al., 1988).

## 1.2.2 STRUKTUR VON GNRH AGONISTEN UND ANTAGONISTEN

Die Halbwertszeit des nativen Proteins ist sehr kurz (zwei bis zehn Minuten) und GnRH-I wird nach wenigen Minuten von degradierenden Endonukleasen im Blutkreislauf abgebaut. Seit der Entwicklung der ersten Agonisten wurden mehrere tausend GnRH-I Analoga entwickelt und für neue therapeutische Zwecke analysiert (Felberbaum et al., 2000; Karten and Rivier, 1986). GnRH-I Analoga zeichnen sich durch mindestens eine Aminosäuresubstitution im

Tab. 1.2: Einige auf dem Markt befindliche GnRH-I Analoga. Aminosäuresubstitutionen sind in fett dargestellt.

GnRH-I Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Goserelin	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	<b>D-Ser</b> (tBu)	Leu	Arg	Pro	<b>AzGly</b>
Buserelin	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	<b>D-Ser</b> (tBu)	Leu	Arg	<b>Pro NEt</b>	
Triptorelin	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	<b>D-Trp</b>	Leu	Arg	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>
GnRH-I Antagonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cetrorelix	<b>D-2NaI</b>	<b>D-4Cpa</b>	<b>D-3Pal</b>	Ser	Tyr	<b>D-Cit</b>	Leu	Arg	Pro	<b>D-Ala-NH<sub>2</sub></b>
Ganirelix	<b>D-2NaI</b>	<b>D-4Cpa</b>	<b>D-3Pal</b>	Ser	Tyr	<b>D-hArg</b> (Et) <sub>2</sub>	Leu	<b>D-hArg</b> (Et) <sub>2</sub>	Pro	<b>D-Ala-NH<sub>2</sub></b>

Vergleich zum nativen Protein aus. Die Anzahl und jeweilige Position der Substitution bestimmt, ob es sich dabei um einen Agonisten oder Antagonisten handelt. Der Austausch zu D-Aminosäuren führt zu einer deutlich erhöhten Halbwertszeit der Dekapeptide und die Affinität zum Rezeptor wird erhöht. In Tabelle 1.2 sind einige der wichtigsten GnRH-I Analoga zusammengefasst. Der erste GnRH-I Antagonist (Cetrorelix) wurde erst 1999 zugelassen. Wenige Jahre später folgte Ganirelix, während mehrere GnRH-I Agonisten schon über einen großen Zeitraum ihre Anwendung in der Klinik finden. Andere GnRH-I Antagonisten befinden sich in verschiedenen klinische Phase II oder III Studien. Agonisten zeichnen sich durch eine Aminosäuresubstitution an Position sechs des Dekapeptids aus. Der Austausch führt zu einer Stabilisierung der Tertiärstruktur und zu einer verstärkten Affinität zum Rezeptor im Vergleich zum nativen Protein (Karten and Rivier, 1986; Sealfon et al., 1997). Da die Positionen eins bis drei essentiell für die Bindung an den Rezeptor sind und auch für dessen Aktivierung, spielt der Austausch dieser Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von GnRH-I Antagonisten (Karten and Rivier, 1986). Für die Bindung an den Rezeptor ist zusätzlich die zehnte Aminosäure von Bedeutung, da auch sie bei Antagonisten ausgetauscht und für die Bindung an den Rezeptor entscheidend ist. Antagonisten zeichnen sich außerdem durch den Einbau von nicht-natürlichen D-Aminosäuren aus, die die Stabilität des Dekapeptids drastisch erhöhen.

Der Vorteil von Antagonisten gegenüber Agonisten ist das Ausbleiben des *flare up* Effektes und somit eine sofortige Suppression der LH und FSH Synthese. Ein Vorlauf von zwei Wochen bis zum Einsetzen der Wirkung wird somit vermieden (Klingmuller et al., 1993).

GnRH-II Analoga sind bisher nicht auf dem pharmazeutischen Markt erschienen und befinden sich in verschiedenen Entwicklungsphasen. Aufgrund der Homologie der beiden Hormone werden strukturelle Veränderungen äquivalent zu denen der GnRH-I Analoga vorgenommen.

### 1.2.3 GNRH ANALOGA IN DER GYNÄKOLOGIE UND GEBURTSHILFE

Das native GnRH spielt im klinischen Alltag nur eine untergeordnete Rolle und kommt nur bei sehr wenigen Indikationen zum Einsatz, wie z.B. der hypothalamischen Amenorrhoe oder dem Kallmann Syndrom. Bei der hypothalamischen Amenorrhoe liegt eine fehlende oder verminderte GnRH Sekretion zu Grunde, die durch die Gabe von GnRH behoben werden kann.

GnRH-I Analoga finden aufgrund ihrer Stabilität und ihrer ca. 100- bis 200-fachen Rezeptoraffinität ein viel breiteres Anwendungsspektrum im Bereich der Gynäkologie und Geburtshilfe. Aufgrund der zentralen Rolle in der Sexualhormonsekretion erstreckt sich das therapeutische Potential sowohl auf erkrankte als auch auf gesunde Organismen. Von besonderer Bedeutung sind dabei die Ovulationsinduktion im Rahmen der *in vitro* Fertilisation (IVF) (Engel et al., 2006), sowie die Behandlung der frühzeitigen Pubertät (Roth, 2002), Endometriose (Olive, 2004) und steroidhormonabhängiger Tumoren (Robertson and Blamey, 2003). Prämenopausale Frauen, die eine Chemotherapie erhalten, werden mit GnRH-I Analoga zur Gonadenprotektion behandelt, da die Ovarien in einen Ruhezustand versetzt werden (Potolog-Nahari et al., 2007), bei dem es nicht zur Schädigung der sich schnell teilenden Primordialfollikel kommt. Dieser vollständig reversible Prozess wird auch als chemische Kastration bezeichnet, bei dem sich nach Beendigung der Therapie die physiologische Zyklusfunktion nach sechs Wochen wieder einstellt (Gordon et al., 1993).

GnRH-I Analoga finden ebenfalls Anwendung in der Therapie des androgenabhängigen Prostatakarzinoms (Labrie et al., 2005), da sie beim Mann ebenfalls die Steroidhormonsynthese inhibieren.

Aufgrund der Expression von GnRH Rezeptoren in Ovarial- und Endometriumkarzinomen (80 %), sowie in Mammakarzinomen (50 %) (Mangia et al., 2002; Völker et al., 2002) ist der therapeutische Nutzen auch in der direkten Krebstherapie von Bedeutung. GnRH-I Analoga werden derzeit nur in der ablativen Therapie steroidhormonabhängiger Karzinome eingesetzt, da die Steroidhormonsynthese zum Erliegen kommt und die Tumoren sich nicht mehr durch autokrine Mechanismen erhalten können (Fekete et al., 1989; Limonta et al., 1992).

Als häufige Nebenwirkungen der Langzeittherapie mit GnRH-I Analoga treten der Zustand der Postmenopause und die daraus resultierenden Beschwerden auf, sowie der osteoporotisch bedingte Verlust an Knochenmasse. Östrogene inhibieren den durch Osteoklasten hervorgerufenen Knochenabbau, sowie die unter Östrogenmangel auftretende Kollagenolyse (Conn and Crowley, 1991).

#### **1.2.4 WIRKUNG VON GNRH ANALOGA *IN VITRO***

Aufgrund der Expression von GnRH und seiner Rezeptoren in gynäkologischen Karzinomen, wurde der Einfluss von GnRH Analoga auf Endometrium-, Ovarial- und Mammakarzinomzellen *in vitro* analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Rezeptor-positiven Zelllinien zeit- und dosisabhängig durch GnRH-I Analoga in ihrer Proliferation gehemmt werden können. Bereits im nanomolaren Bereich von 1 nm Triptorelin (GnRH-I Agonist) konnte die Zellzahl signifikant reduziert werden (Emons et al., 1993a; Emons et al., 1993c; Günthert et al., 2005). Für den GnRH-I Antagonisten Cetrorelix wurden ähnliche antiproliferative Effekte erzielt (Castellon et al., 2006; Gründker et al., 2004). Cetrorelix wirkt antagonistisch am GnRH-I Rezeptor und agonistisch am GnRH-II Rezeptor (Sun et al., 2001). Dies konnte an GnRH-I Rezeptor-negativen Zelllinien nach *knock down* des Rezeptors nachgewiesen werden. Die wachstumsinhibierenden Effekte von Triptorelin in diesen Zellen wurden aufgehoben, während Cetrorelix weiterhin antiproliferativ wirkte (Gründker et al., 2004). Dieser Effekt spricht für das Vorhandensein eines zweiten GnRH Rezeptors beim Menschen. Es scheint sich somit um eine Kreuzreaktion (*cross-reaction*) der GnRH Analoga an den beiden Rezeptoren zu handeln. Die Wirkung von Cetrorelix auf die Induktion von Apoptose in gynäkologischen Karzinomzellen wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen analysiert und kommt zu unterschiedlichen Ergebnissen. Zum einen konnten apoptotische Effekte als Ursache der antiproliferativen Eigenschaften nachgewiesen werden (Chen et al., 2005; Tang et al., 2002), die von anderen Gruppen jedoch nicht bestätigt wurden .

Noch stärkere antiproliferative Effekte konnten für den GnRH-II Agonisten [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II nachgewiesen werden (Gründker et al., 2002a; Günthert et al.,

2005). Auf GnRH-II Rezeptor-negative Zelllinien hat der GnRH-II Agonist keinen wachstumsinhibierenden Effekt. GnRH-II wird nicht über den GnRH-I Rezeptor reguliert, sondern wirkt über ein autonomes GnRH-II Rezeptorsystem, (Eicke et al., 2006).

Für alle GnRH Analoga konnte eine Interaktion mit der mitogenen Wachstumsfaktorrezeptor-Signalkaskade als Teil eines autokrinen/parakrinen Regulationsmechanismus' nachgewiesen werden, bei der die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors inhibiert wird. Dadurch kommt es zu einer GnRH vermittelten Reduktion der mitogenen MAPK-Aktivität und zum Erliegen des Zellzyklus, was in einer Inhibition der Proliferation resultiert.

## **1.3 GYNÄKOLOGISCHE KARZINOME**

### **1.3.1 MAMMAKARZINOM**

#### **1.3.1.1 EPIDEMIOLOGIE UND ÄTIOLOGIE**

Das Mammakarzinom ist der häufigste, vorkommende Tumor in der weiblichen Bevölkerung und stellt zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr die häufigste Todesursache bei Frauen dar. Jede achte bis zehnte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Weltweite epidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Inzidenz in den westlichen Industrieländern deutlich höher ist, als in den Entwicklungsländern und Japan (Katanoda and Qiu, 2007). Es ist nicht gesichert, ob das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken in den letzten Jahren zugenommen hat. Moderne Diagnostikverfahren und eine höhere Lebenserwartung können jedoch erklären, warum heutzutage mehr Frauen an Brustkrebs erkranken bzw. die Tumoren in einem früheren Stadium entdeckt werden.

Epidemiologische Studien zeigen, dass die Entstehung eines Mammakarzinoms ein multifaktorielles Geschehen ist. Dabei spielen Mutationen in den DNA Reparaturgenen BRCA-1 und BRCA-2 beim hereditären Mammakarzinom eine bedeutende Rolle, da sie die Möglichkeit an Brustkrebs zu erkranken um das zehnfache bis zwanzigfache erhöhen (Claus et al., 1994). Allerdings ist diese genetische Prädisposition nur ein Teil der Ursachen

für die Entstehung des Karzinoms. Weitere Risikofaktoren sind Alkoholkonsum (Terry et al., 2007), Adipositas (Schaffler et al., 2007), eine frühe Menarche (Apter et al., 1989), Kinderlosigkeit oder späte Schwangerschaften (Newcomb et al., 1994) und Mastopathie (Goodwin et al., 1995). Das Risiko der postmenopausalen Hormonersatztherapie wird kontrovers diskutiert und konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden (Emons, 2001; Shah and Wong, 2006).

Das Mammakarzinom ist in seinem klinischen und morphologischen Erscheinungsbild sehr vielfältig und wurde daher von der WHO (*World Health Organisation*) im Jahre 1981 klassifiziert und später auch in pathogenetischer Hinsicht aktualisiert. Mammakarzinome werden in invasive und nicht-invasive Karzinome (*Carcinoma in situ*) unterteilt und nach ihrem Ursprungsort benannt. Seltene Karzinome werden nach Ausbreitungsart und Bindegewebsanteil beschrieben (Paget-Karzinom, inflammatorisches Mammakarzinom). Mittels *Grading* wird die histopathologische Differenzierung des Tumors bestimmt, bei der Tubulusbildung, Kernmorphologie und Mitoserate als Kriterien gelten (Bloom and Richardson, 1957). Die TNM-Klassifikation nach der FIGO (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*) beschreibt die Größe des Tumors (T), den Lymphknotenbefall (N) und die Fernmetastasierung (M) (Susemihl, 1975) und bietet die Grundlage für mögliche Therapieoptionen.

Eine breite klinische Relevanz hat der Hormonrezeptorstatus erreicht, bei dem Mammakarzinome standardisiert auf Östrogen-, Progesteron- und HER2/neu-Rezeptorstatus untersucht werden (Slamon et al., 1989; Thorpe et al., 1987).

Eine Standardtherapie gibt es heute nicht mehr, da die neusten Therapien immer komplexer und auch individuell einsetzbar sind. In 90 % der Fälle wird bei Brustkrebspatientinnen eine Chemotherapie durchgeführt (adjuvant), oft auch vor einer Operation (neoadjuvant). Dies hat den Vorteil einer brusterhaltenden OP, nach der jedoch häufig eine Strahlentherapie empfohlen wird, da sich oft noch mikroskopisch kleine Tumorrreste in der Brust befinden. Bei hormonabhängigen Tumoren ohne Lymphknotenbefall kann evtl. auf eine Chemotherapie verzichtet und eine Antihormontherapie angestrebt werden, die abhängig vom menopausalen Status der Frau ist.

Bei HER2/neu Überexpression kann eine Antikörpertherapie mit Trastuzumab (Herceptin®) veranlasst werden. Dabei handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der gegen den Wachstumsfaktorrezeptor *cerb-B2* (HER2/neu) gerichtet ist (Goldenberg, 1999).

#### **1.3.1.2 ENDOKRINE THERAPIE**

Vor über 100 Jahren machte Beatson die Entdeckung, dass eine Ovariectomie bei Frauen eine Regression des fortgeschrittenen Brustkrebses bewirken kann (Beatson, 1896). Dies war die Geburtsstunde der Hormontherapie (syn. Antihormontherapie, endokrine Therapie) beim Mammakarzinom. Es folgten Adrenalektomie (Dao and Huggins, 1955) und Hypophysektomie (Pearson and Ray, 1959), die ebenfalls eine Tumorregression induzieren konnten. Später wurden die Therapie mit Androgenen, Glukokortikoiden und Östrogenen eingeführt (Kennedy, 1962). Vor über 30 Jahren wurde Tamoxifen als erstes Antiöstrogen etabliert (Legha and Carter, 1976), was mit einer Blockade der Östrogenrezeptoren einhergeht. Als Vorläufer für weitere Östrogenrezeptor-Inhibitoren (Bruning, 1992; Valavaara et al., 1988), wird Tamoxifen in der postchirurgischen, adjuvanten systemischen Therapie des Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinoms eingesetzt. Die Hormontherapie in der Prämenopause war lange Zeit umstritten und bis Mitte der Neunzigerjahre wurde nur etwa ein Drittel der Frauen so behandelt. Antihormonelle Behandlungen zählen heute beim primären Mammakarzinom zur Therapie der Wahl (Goldhirsch et al., 2005), da sie vergleichsweise nur eine geringe Toxizität, tolerable Nebenwirkungen und einen geringen therapeutischen Aufwand aufweisen.

Prämenopausal werden Frauen heute mit GnRH-I Analoga behandelt (Emons et al., 2003; Klijn and de Jong, 1982). Dadurch erreichen sie den Zustand der Postmenopause, die chemische Kastration. Sobald dieser Zustand erreicht ist, werden sie wie postmenopausale Frauen weiter behandelt. In der Postmenopause werden Frauen mit selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM, *selective estrogen receptor modulator*), wie Tamoxifen, behandelt oder erhalten eine Therapie mit Aromatasehemmern (nicht-steroidal: Anastrozol, Letrozol, Aminoglutethimid; steroidal: Exemestan, Formestan, Testolacton),

durch die die Bildung von Östrogen im Fett- und Muskelgewebe durch eine Enzymblockade der Cytochrom-abhängigen Monooxygenasen inhibiert wird (Brueggemeier et al., 2005; Santen et al., 1978). Die Aromatase katalysiert die Umwandlung von Androstendion zu Östron, einem Vorläufer von Östradiol.

Ein neuer Ansatz besteht in der Therapie mit selektiven Östrogenrezeptor-Destruktoren (SERD, *selective estrogen receptor destructor*), wie Fulvestrant (Faslodex®) (Robertson, 2001). Dieser neue Östrogenrezeptorantagonist ist auch in der Lage die Anzahl der Östrogenrezeptoren zu reduzieren, um somit die Östrogensynthese zu inhibieren, wozu andere Antiöstrogene bisher nicht fähig waren.

Ein großes Problem stellen die auftretenden Resistenzen bei der Antihormontherapie dar (Dowsett et al., 2005; Riggins et al., 2007), die man mit Fulvestrant umgehen will (Johnston et al., 2005; Perey et al., 2007).

## **1.3.2 OVARIALKARZINOM**

### **1.3.2.1 EPIDEMIOLOGIE UND ÄTIOLOGIE**

Das Ovarialkarzinom ist der fünfthäufigste maligne Tumor bei der Frau und stellt in den westlichen Industrieländern die führende Todesursache bei den Genitalmalignomen dar (Oriel et al., 1999). Eine von 70 Frauen wird im Laufe ihres Lebens an einem Ovarialkarzinom erkranken (Wingo et al., 1995). Aufgrund der fehlenden spezifischen und sensitiven Früherkennung wird das Ovarialkarzinom in nur 26 % der Fälle mit Beschränkung auf die Ovarien entdeckt. In den meisten Fällen ist das Karzinom bereits ins kleine Becken gewachsen oder fernmetastasiert (Goodman and Howe, 2003). Fehlende Symptome erschweren die frühe Diagnostik ebenfalls. Die höchste Inzidenz liegt bei 80 Jahren, die Diagnose wird jedoch am häufigsten zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr gestellt (Tortolero-Luna and Mitchell, 1995). Faktoren für die Prognose sind der Differenzierungsgrad, der histologische Subtyp, die Tumorausbreitung, der Ploidiegrad, sowie das Alter und der Allgemeinzustand der Patientin (de Souza and Friedlander, 1992; Schueler et al., 1993).

Das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, wird durch die Einnahme oraler Kontrazeptiva und häufige Schwangerschaften vermindert (Walker et al.,

2002). Aus diesen epidemiologischen Beobachtungen stellt sich die Hypothese, dass eine verringerte Anzahl an Ovulationen vor dem Karzinom schützen kann (La Vecchia et al., 2001). Hingegen treten bei Frauen mit geringer Anzahl an Schwangerschaften, früher Menarche und später Menopause gehäuft Ovarialkarzinome auf. Eine erhöhte Anzahl an Ovulationen, ebenso wie ein erhöhter Östrogenspiegel in der Follikelflüssigkeit, werden als mitogener Stimulus angesehen, der zur Karzinogenese führen kann (Godwin et al., 1993). Eine positive Familienanamnese spricht in 5 % der Fälle ebenfalls für ein erhöhtes Erkrankungsrisiko, bei der Mutationen in den BRCA-Genen vorliegen (Walker et al., 2002).

Dem histologischen Aufbau entsprechend, werden die Tumoren von der WHO und der FIGO in drei Gruppen eingeteilt: epitheliale Ovarialtumoren, Stromatumoren und Keimzelltumoren. Das histologische *Grading* richtet sich nach dem Differenzierungsgrad der Tumoren. Die Stadieneinteilung nach der FIGO entspricht der TNM-Klassifikation und erläutert die Ausbreitung des Tumors.

Als therapeutische Maßnahme werden fast immer bei einem radikal chirurgischen Eingriff die Ovarien, Eileiter, Uterus und befallene Lymphknoten entfernt und anschließend eine Chemotherapie durchgeführt (Ozols, 1992).

#### **1.3.2.2 ENDOKRINE THERAPIE**

Die endokrine Therapie beim Ovarialkarzinom ist nicht vollständig etabliert. Es wurden viele klinische Phase II Studien mit GnRH-I Analoga an Patientinnen mit Platin-Resistenz durchgeführt, da bei ungefähr 80 % der Tumoren Rezeptoren für GnRH-I gefunden werden konnten (Völker et al., 2002). Bei 9 % konnte eine objektive Remission und bei 26 % der Patientinnen eine Stabilität der Krankheit erzielt werden (Emons and Schulz, 2000). Eine Kombination aus Chemotherapie und GnRH-I Analoga bringt keinen Vorteil für Patientinnen, was aus einer Neutralisierung des antiproliferativen Effekts auf Tumorzellen und dem Schutz vor der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose resultieren könnte (Gründker et al., 2000a). GnRH-I Analoga finden daher keine große Anwendung in der Therapie des Ovarialkarzinoms, da die Patientinnen keinen signifikanten Vorteil von der Therapie haben.

Ovarialkarzinome exprimieren außerdem Rezeptoren für Östrogene (63 %), Androgene (69 %), Progesterone (50 %) und Glukokortikoide (88 %) (Galli et al., 1981). Trotz dessen konnten bei der Behandlung mit Antiöstrogenen und Gestagenen nur sehr geringe Remissionserfolge erzielt werden (Emons et al., 1993b). Der Hormonrezeptorstatus ist somit im Gegensatz zum Mammakarzinom unabhängig vom Therapieschema. Die endokrine Therapie beim Ovarialkarzinom spielt somit eine sehr untergeordnete Rolle.

### **1.3.3 ENDOMETRIUMKARZINOM**

#### **1.3.3.1 EPIDEMIOLOGIE UND ÄTIOLOGIE**

Das Endometriumkarzinom oder Korpuskarzinom ist der häufigste, maligne Tumor des weiblichen Genitaltraktes. Die Krankheit tritt meistens bei postmenopausalen Frauen im Alter zwischen 65 und 75 Jahren auf und nur selten (5 %) bei Frauen, die jünger als 40 Jahre sind. Die Inzidenz hängt von verschiedenen Risikofaktoren endogenen und exogenen Ursprungs ab. Als endogene Risikofaktoren werden Adipositas, Diabetes (*diabetes mellitus*), frühe und späte Menarche und Nulliparität angesehen (Bristow, 1999). Als exogene Faktoren für die Entstehung des Endometriumkarzinoms werden die Östrogen-Ersatztherapie, die Tamoxifen-Langzeittherapie bei vorangegangenen Mammakarzinom und eine vorherige Bestrahlung angesehen (Bernstein et al., 1999; Horwitz et al., 1981).

Als dominierender Risikofaktor wird die Langzeiteinwirkung von Östrogen auf das Endometrium gesehen. Ein kontrovers diskutiertes Gebiet ist dabei die Hormonerersatztherapie in der Postmenopause (Emons et al., 2004), da es sich beim Endometrium um ein hormonsensitives Gewebe handelt und sich das Risiko, an einem Endometriumkarzinom zu erkranken, dadurch signifikant erhöht.

Pathogenetisch wird das Karzinom in zwei unterschiedliche Karzinomtypen eingeteilt: hormonabhängiges und hormonunabhängiges Endometriumkarzinom. Hormonabhängige Karzinome sind meist hoch differenziert, während hormonunabhängige Karzinome meist schlecht differenziert sind und eine wesentlich schlechtere Prognose aufweisen

(Akhmedkhanov et al., 2001). Die Prognose ist im Gegensatz zum Ovarialkarzinom allerdings sehr günstig, da die Diagnose zu 70 % im FIGO Stadium I gestellt wird und die 5-Jahres-Überlebensrate somit 74 % beträgt. Histologisch werden Endometriumkarzinome nach ihrem Differenzierungsgrad von gut bis gering differenziert eingeteilt.

Bei der Therapie des Endometriumkarzinoms steht der operative Eingriff an primärer Stelle, der sich jedoch nach Ausdehnung des Tumors, Zustand der Patientin und Prognosefaktoren richtet. Oft wird dies mit einer prä- oder postoperativen Strahlentherapie kombiniert. Beim chirurgischen Eingriff werden Uterus, Ovarien, Zervix und benachbarte Lymphknoten entfernt. Für eine adjuvante Chemotherapie liegt keine Indikation vor.

### **1.3.3.2 ENDOKRINE THERAPIE**

Die endokrine Therapie des Endometriumkarzinoms rückt immer weiter in den Vordergrund. Der Einfluss von Östrogen und Progesteron auf das Wachstum des Endometriums ist weitgehend bekannt. Bei Progesteron-Rezeptor-reichen Tumoren spricht eine Gestagentherapie sehr gut an. Neben einem deutlich verbesserten Allgemeinzustand der Patientin, kann eine Tumorremission vorübergehend oder anhaltend erreicht werden. Wenn der Gestageneffekt aufgrund der Abnahme der Progesteron-Rezeptoren ausbleibt (Philipson et al., 1985), kann mit einer Tamoxifengabe als *second line* Therapie begonnen werden, um den Zustand der Patientin weiterhin zu verbessern. Das Antiöstrogen Tamoxifen kann zu ähnlichen Heilungs- und Regressionserfolgen führen wie beim Mammakarzinom. Die Ursache liegt in der teilweise östrogenen Wirkung partialagonistischer Antiöstrogene, zu denen auch Tamoxifen gehört (Satyaswaroop et al., 1984). Speziell Tamoxifen wirkt antagonistisch im Mammagewebe und agonistisch im Endometrium. Mit diesen Eigenschaften kann das Wachstum von Endometriumkarzinomen nicht nur stimuliert sondern auch induziert werden (Gusberg, 1990). Der reine Antagonist Fulvestrant könnte somit in der Therapie des Endometriumkarzinoms einen besonderen Stellenwert erlangen (Hoffman and Khan, 2006; O'Regan et al., 1998).

In der endokrinen Therapie des fortgeschrittenen, metastasierten, inoperablen oder rezidierten Endometriumkarzinoms kommen auch Aromatasehemmer

und GnRH-I Analoga zum Einsatz (Emons et al., 1993c; Thigpen et al., 1999). Damit können Remissionen von bis zu 30 % erreicht werden (Jeyarajah et al., 1996). In ca. 80 % der Endometriumkarzinome konnten Rezeptoren für GnRH-I entdeckt werden (Pahwa et al., 1991), welche für einen direkten Therapieansatz von Nutzen sein könnten.

## 1.4 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

GnRH-I Analoga finden bereits ein breites Anwendungsspektrum im Bereich der Gynäkologie und Geburtshilfe. Den Agonisten kommt im klinischen Alltag dabei eine besondere Bedeutung zu, wobei sich GnRH-I Antagonisten aufgrund ihrer schnellen und gezielten Wirkungsweise immer stärker etablieren. Die Signaltransduktion von GnRH Analoga in der Hypophyse und in gynäkologischen Karzinomen ist weitgehend aufgeklärt und kann so therapeutisch genutzt werden. Für das kürzlich entdeckte GnRH-II konnten *in vitro* sogar noch stärkere Effekte auf die antiproliferativen Eigenschaften von gynäkologischen Karzinomzellen gezeigt werden als für GnRH-I Analoga.

Eine Kombination dieser Vorteile stellt die für diese Arbeit entwickelte neue Substanzklasse der GnRH-II Antagonisten dar. Die GnRH-II Antagonisten sollen hinsichtlich ihrer Wirkungsweise *in vitro* etabliert werden. Dafür soll ihr Einfluss auf das Proliferationsverhalten und die Induktion von Apoptose in humanen Endometrium-, Ovarial- und Mammakarzinomzelllinien untersucht werden. Die den GnRH-II Antagonisten zugrunde liegenden Mechanismen und deren Interaktionen mit der mitogenen Signaltransduktion sollen in gynäkologischen Karzinomen analysiert werden. Darüber hinaus sollen die Antagonisten *in vivo* im Nacktmausmodell mit Xenotransplantaten gynäkologischer Tumoren untersucht werden. Dabei soll der Einfluss auf das Tumorwachstum und ebenso der Einfluss der GnRH-II Antagonisten auf die membranständigen GnRH-I Rezeptoren der Hypophyse untersucht werden. Die Tumorpräparate sollen nach Beendigung der *in vivo* Versuche hinsichtlich Hormonrezeptorstatus bzgl. der Rezeptor Downregulation und Apoptoseinduktion untersucht werden.

Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, dass die neu entwickelten GnRH-II Antagonisten als neue Pharmazeutika in der direkten, endokrinen Therapie GnRH Rezeptor-positiver Tumoren etabliert werden. Wie bereits beschrieben, stellt das Mammakarzinom den häufigsten Tumor bei der Frau dar. Neue endokrine Therapien sind dabei aufgrund ihrer tolerablen Nebenwirkungen besonders schonend für die Patientin.

Die Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen der induzierten Signaltransduktion kann die Therapie in ihrer Anwendung noch expliziter gestalten. Des Weiteren kann die Analyse der GnRH-II Antagonisten und deren *in vitro* Effekte einen wichtigen Beitrag dazu leisten, den GnRH-II Rezeptor endgültig zu identifizieren.

## 2 MATERIAL

### 2.1 GERÄTE

Analysenwaage BP161P	Sartorius
Autoklav, 2540 EL	Tuttnauer
Biofuge pico	Heraeus Holding
Brutschrank, Model 3121 S/N 28439532	Forma Scientific
Elektrophoresekammer, DNA	OWL Separation Systems
FACScalibur™	BD Biosciences
Kodak digital science™ electrophoresis documentation and analysis system DC120	Kodak
Glas-Glas Potter	B.Braun
Labofuge 400R	Heraeus Holding
Magnetrührer MR3000	Heidolph
Mini-Protean™ III Cell and Systems	Bio-Rad
Mikroskop, IX51	Olympus
Mikrowaage, elektronisch, M2P	Sartorius
Multi-Detection Microplate Reader, Synergy HT, BIO-TEK	
pH-Meter CG 22	Schott Geräte
Phasenkontrastmikroskop, axiovert 25	Zeiss
Polaroid Land-Kamera, MP 4	Polaroid
Power Supply, 1000/500	Bio-Rad
Power-Supply, 200/2.0	Bio-Rad
Rotations-Mikrotom Cut 4050	Slee Mainz
Schüttler Titramax 1000	Heidolph
Spektralphotometer (Biophotometer)	Eppendorf
Sterilwerkbank, LaminAir® HA 2448 GS	Heraeus Holding
Thermocycler T3000	Biometra
Thermomixer compact	Eppendorf
Ultrazentrifuge (UZ <sup>6</sup> ) Sorvall	Thermo Fisher Scientific
UV-Transilluminator	Biometra

Vortex Genie 2™	Bender & Hobein
Waage, Kern 440-47	Kern
Wasserbad	Memmert
X-Ray Film Prozessor, SRS-101A	Konica

## 2.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien (Einmalartikel) wurden von den Firmen Biozym, Eppendorf, Greiner bio-one, Nunc und Sarstedt bezogen.

## 2.3 CHEMIKALIEN

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von den folgenden Firmen bezogen: Merck, PAA, Roth und Sigma-Aldrich. Die Chemikalien entsprechen dem höchsten zur Verfügung stehenden Reinheitsgrad, soweit nicht anders angegeben.

## 2.4 GNRH ANALOGA

Der GnRH-I Agonist Triptorelin wurde freundlicherweise von Ferring Pharmaceuticals und der GnRH-I Antagonist Cetrorelix von Aeterna Zentaris zur Verfügung gestellt. Die verwendeten GnRH-II Antagonisten Ant-1, Ant-2 und Ant-3 (Tab. 2.1) und der Agonist [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II wurden in unserem Auftrag von der Firma Peptide Specialty Laboratories GmbH synthetisiert. Die Lieferung erfolgte als HPLC-aufgereinigtes TFA-Salz, das in 1 N Essigsäure angelöst wurde.

Tab. 2.1 Verwendete GnRH Analoga

GnRH Analoga	Strukturabweichungen vom nativen Protein	Referenz
Triptorelin	[D-Trp <sup>6</sup> ]	Ferring
GnRH-I Agonist		Pharmaceuticals

Cetrorelix GnRH-I Antagonist	[(AcD-2Nal <sup>1</sup> ), (D-4Cpa <sup>2</sup> ), (D-3Pal <sup>3</sup> ), (D-Cit <sup>6</sup> ), (D-Ala <sup>10</sup> )]	Aeterna Zentaris GmbH
[D-Lys <sup>6</sup> ]GnRH-II GnRH-II Agonist	[D-Lys <sup>6</sup> ]	(Gründker et al., 2002a)
Ant-1 GnRH-II Antagonist	[(AcD-2Nal <sup>1</sup> ), (D-4Cpa <sup>2</sup> ), (D-3Pal <sup>3</sup> ), (D-Lys <sup>6</sup> ), (D-Ala <sup>10</sup> )]	(Fister et al., 2007a)
Ant-2 GnRH-II Antagonist	[(AcD-2Nal <sup>1</sup> ), (D-4Cpa <sup>2</sup> ), (D-3Pal <sup>3</sup> ), (D-Lys <sup>6</sup> ), (D-Leu <sup>8</sup> ), (D-Ala <sup>10</sup> )]	(Fister et al., 2007a)
Ant-3 GnRH-II Antagonist	[(AcD-2Nal <sup>1</sup> ), (D-4Cpa <sup>2</sup> ), (D-3Pal <sup>3</sup> ), (D-3Pal <sup>6</sup> ), (D-Leu <sup>8</sup> ), (D-Ala <sup>10</sup> )]	(Fister et al., 2007a)

## 2.5 PUFFER UND LÖSUNGEN

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

<i>blocking</i> -Lösung	TBST + 5 % (w/v) Magermilchpulver
Citrat-Puffer	0,01 M Citronensäure
DNA-Ladepuffer (10x)	50 % (v/v) Glycerin, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol
DTT-Assaypuffer	10 mM Tris/HCl, 0,2 % (w/v) NaN <sub>3</sub> , 0,2 % (w/v) BSA, 1mM DTT, pH 7,6
Ethidiumbromid-Bad	0,007 % (v/v) EtBr
Formaldehyd-Lösung	PBS + 4 % (v/v) Formalin
Laemmli-Probenpuffer (2x)	62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) Glycerol, 0,05 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau
Nicoletti-Lösung	0,1 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (w/v) Na-Citrat, 0,005 % (w/v) Propidiumiodid

PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,4
Phosphatase-Inhibitor Cocktail	50 mM C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P, 10 mM NaF, 10 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> , 2 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
SDS-Elektrophoresepuffer (10x)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
TBE	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8
TBS (10x)	1,5 M NaCl, 500 mM Tris, pH 7,5
TBST	TBS + 0,1 % (v/v) Tween 20
Transferpuffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol

## 2.6 KULTURMEDIEN UND MEDIENZUSÄTZE

### 2.6.1 KULTURMEDIEN FÜR BAKTERIEN

Medien und ihre Bestandteile für die Kultivierung von Bakterien wurden entweder 20 min bei 121°C autoklaviert oder steril filtriert. Erforderliche Antibiotika wurden anschließend steril hinzugefügt, nachdem das Medium auf ca. 55°C abgekühlt war.

LB-Medium	1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl Platten: + 1,5 % (w/v) Agar
LB-Selektions-Medium	1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, Ampicillin: 100 µl/ml Platten: + 1,5 % (w/v) Agar

### 2.6.2 KULTUR- UND EINFRIERMEDIEN FÜR EUKARYOTISCHE ZELLEN

Die für die Zellkultur eingesetzten Medien und deren Zusätze wurden von Biochrom, Invitrogen, PAA und Sigma-Aldrich bezogen, soweit dies nicht anders vermerkt ist.

DMEM w/o Phenolrot	10 % (v/v) CD-FCS, 1 % (v/v) P/S, 1 % (v/v) L-Gln, 1 % HEPES
Einfriermedium	MEM-Earl Kulturmedium + 10 % DMSO
MEM-Earl Kulturmedium w Phenolrot	10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) P/S, 50 IU Insulin
MEM-Earl w/o Phenolrot Medium 1	10 % (v/v) CD-FCS, 1 % (v/v) P/S, 2 % (v/v) L-Gln, 0,22 % (w/v) NaHCO <sub>3</sub>
MEM-Earl w/o Phenolrot Medium 2	1 % (v/v) P/S, 0,22 % (w/v) NaH CO <sub>3</sub>
MEM-Earl w/o Phenolrot Transfektionsmedium	1 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) P/S, 2 % (v/v) L-Gln, 0,22 % (w/v) NaHCO <sub>3</sub>

## 2.7 BIOLOGISCHES MATERIAL

### 2.7.1 MIKROORGANISMEN

Tab. 2.2: Verwendeter Bakterienstamm

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> TOP10	F' <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> , Chemisch kompetent	Invitrogen

### 2.7.2 ZELLINIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen.

Tab. 2.3: Verwendete Zelllinien: Endometrium-, Ovarial- und Mammakarzinom, Fibroblasten

Zelllinie	Herkunft	Histologie	Referenz
Hec-1A <sup>o</sup>	Primärtumor	Adenokarzinom, schwach differenziert	(Kuramoto et al., 1972)
Hec-1B	Subklon von Hec-1A	Adenokarzinom, schwach differenziert	(Kuramoto, 1972)

Ishikawa	Primärtumor	Adenokarzinom, gut differenziert	(Nishida et al., 1985)
EFO21	Aszitis	seröses Adenokarzinom, wenig differenziert	(Simon et al., 1983)
EFO27	Netzmetastase	seröses Adenokarzinom, mäßig differenziert	(Simon et al., 1983)
NiH:OVCAR-3	Aszitis	Adenokarzinom, schwach differenziert	(Hamilton et al., 1983)
SKOV-3	Aszitis	Adenokarzinom	(Fogh et al., 1977)
MCF7	Pleuraerguß	Adenokarzinom	(Soule et al., 1973)
MDA-MB-435	Pleuraerguß	Adenokarzinom	(Cailleau et al., 1978)
T47D	Pleuraerguß, Subklon von T47	Adenokarzinom	(Freake et al., 1981)
Alpha T3-1	Hypophyse	Murine gonadotrope Hypophysenzellen	(Windle et al., 1990)
L34.3/29	Subklon LTK Hypophyse	Murine Fibroblasten	Aeterna Zentaris
L3.5/78	Subklon LTK Hypophyse	Murine Fibroblasten	Aeterna Zentaris

### 2.7.3 MAUSSTAMM

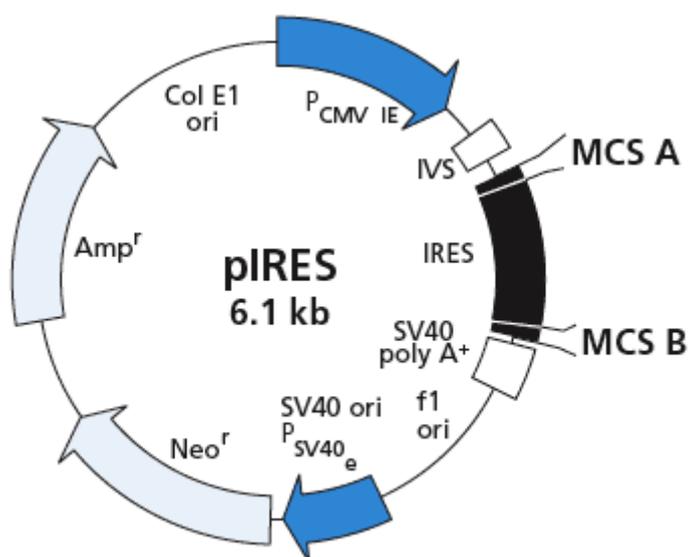
Tab. 2.4: Verwendeter Mausstamm

Stamm	Genotyp	Referenz
CD1 Nu/Nu	Crl:NU/NU- <i>Foxn1</i> <sup>nu</sup>	Charles River Laboratories

## 2.8 PLASMIDE

Tab. 2.5: Plasmide

Vektor	Beschreibung	Referenz
pIRES® (6,1 kB)	Expressionsvektor	BD Biosciences (Abb.1)
pIRES® - GnRH-I R antisense	Antisense-Sequenz zum GnRH-I Rezeptor <i>knock down</i>	(Gründker et al., 2004)



**Abb. 2.1: Vektorkarte pIRES – 6,1 kb (BD Biosciences):** Der Expressionsvektor für eukaryotische Zellen ermöglicht die Expression von zwei Proteinen, da zwei *multiple cloning sites* (MCS) verfügbar sind. Als Promotor dient der Cytomegalievirus (CMV)-Promotor. Die Selektion erfolgt über eine Ampicillin und Neomycin-Resistenz.

## 2.9 OLIGONUKLEOTIDE

Alle vorliegenden Oligonukleotide wurden von der Firma MWG synthetisiert.

EGF-R1: for 5' – TCC TCC CAG TGC CTG AAT AC – 3'

rev 5' – TAA TTT GGT GGC TGC CTT TC – 3'

IGF-Rβ: for 5' – CTT CTC GGC TTC AGT TTT GG – 3'

rev 5' – GAA GTG GAA CCC TCC CTC TC – 3'

cerb-B2-R: for 5' – GGC TGC TGG ACA TTG ACG AG – 3'

	rev	5' – GGG GCT GGG GCA GCC GCT C – 3'
GnRH-I R:	for	5' – GAC CTT GTC TGG AAA GAT CC – 3'
	rev	5' – CAG GCT GAT CAC CAC CAT CA – 3'
GnRH-II R:	for	5' – GCC CTG CTT ATC TTG CTG AC – 3'
	rev	5' – CTC CTG CCC TTC TTG ATG TC – 3'
L7:	for	5' – AGA TGT ACA GAA CTG AAA TTC – 3'
	rev	5' – ATT TAC CAA GAG ATC GAG CAA – 3'

## 2.10 ENZYME

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

## 2.11 ANTIKÖRPER

Alle bezogenen Antikörper wurden nach den Angaben der Hersteller eingesetzt.

Tab. 2.6: Primärantikörper

Antikörper	Herkunft/Beschreibung	Referenz
Anti-Actin	Kaninchen, IgG, 1:500	Sigma Aldrich
Anti-active Caspase-3	Kaninchen, polyklonal, 1:4000	BD Pharmingen
Anti-Akt	Kaninchen, polyklonal, 1:1000	Cell Signaling
Anti-c-Fos	Kaninchen, polyklonal, 1:200	Abcam
Anti-EGF-R	Kaninchen, polyklonal, 1:200	Santa Cruz
Anti-GnRH-I R	Maus, IgG, 1:1000	Acris
Anti-GnRH-II R	Maus, IgG, 1:1000	Abnova
Anti-IGF-Rβ	Kaninchen, polyklonal, 1:200	Santa Cruz

Anti-phospho Akt	Kaninchen, IgG, 1:1000	Cell Signaling
Anti-phospho p38 MAP inase	Kaninchen, polyklonal, 1:1000	Cell Signaling
Anti-phospho p44/42 MAP Kinase	Kaninchen, polyklonal, 1:1000	Cell Signaling
Anti-phospho SAPK/JNK	Kaninchen, polyklonal, 1:1000	Cell Signaling
Anti-p38	Kaninchen, polyklonal, 1:1000	Cell Signaling
Anti-p44/42	Kaninchen, polyklonal, 1:1000	Cell Signaling
Anti-SAPK/JNK	Kaninchen, IgG, 1:1000	Cell Signaling
GnRH-I Rezeptor Antiserum	Kaninchen, polyklonal, 1:10000	nicht publiziert
GnRH-II Rezeptor Antiserum	Kaninchen, polyklonal, 1:10000	(Eicke et al., 2005)

Tab. 2.7: HRP-gekoppelte Sekundärantikörper

Antikörper	Herkunft/Beschreibung	Referenz/Herkunft
Anti-Mouse IgG	Schaf, 1:10000	GE Healthcare
Anti-Rabbit IgG	Affe, 1:10000	GE Healthcare

## 2.12 INHIBITOREN

Pertussis Toxin (PTX)	Sigma Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich
RNasin® Plus RNase Inhibitor	Promega

## 2.13 KOMMERZIELLE REAKTIONSSYSTEME

DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System	Promega
ECL Immobilon™ Western	Millipore
Endofree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Histostain® Bulk Kit	Zymed® Laboratories

---

JC-1 Mitochondrial Membran Potential Detection Kit	Cell Technology Inc.
QIAshredder	Qiagen
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
RNase free Dnase Set	Qiagen

## **2.14 SOFTWARE**

Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems
CellQuest™ Software (Version 3.0)	Becton Dickinson
GraphPad Prism® (Version 4.03)	GraphPad Software Inc.
KC4™ Synergy HT	Bio-Tek
Kodak Digital Science 1D Image Analyse Software (Version 2.0.3)	Kodak
Microsoft® Office 2003	Microsoft Corporation

## **3 METHODEN**

### **3.1 ZELLKULTIVIERUNG**

#### **3.1.1 KULTIVIERUNG UND PASSAGIEREN ADHÄRENTER ZELLEN**

Alle verwendeten Zelllinien wurden in MEM-Earl Kulturmedium bei 37°C, in einer wasserdampfgesättigten, 5 % CO<sub>2</sub> enthaltenden Atmosphäre kultiviert. Das Kulturmedium enthielt 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) P/S und 50 IU Insulin. Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilwerkbank durchgeführt.

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen, je nach Wachstumseigenschaften der jeweiligen Zelllinie, passagiert. Hierfür wurden die Zellen beim Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 % in D-PBS) bei 37°C inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Reaktion mit MEM-Earl Kulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension bei 300xg für 4 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in MEM-Kulturmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde eine entsprechende Anzahl Zellen, je nach Versuchsprotokoll, auf Zellkulturgefäße verteilt oder in Kultur genommen.

#### **3.1.2 KRYOKONSERVIERUNG UND AUFTAUEN EUKARYOTISCHER ZELLEN**

Zur Langzeitkonservierung von Zellen wurde ein Zellpellet mit der entsprechenden Zellzahl in Einfriermedium aufgenommen und bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst rasch bei 37°C. Die Zellsuspension wurde mit Kulturmedium gewaschen, bei 300xg für 4 min zentrifugiert und das Pellet anschließend in MEM-Earl Kulturmedium zur Kultivierung resuspendiert.

#### **3.1.3 ZELLZÄHLUNG**

Die Zählung von Zellen erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer (0,1 mm Tiefe, 0,0025 cm<sup>2</sup> Fläche, Optik-Labor). Tote Zellen wurden mittels Trypanblau-Färbung sichtbar gemacht, indem Zellsuspension und Trypanblau-Lösung in

einem Verhältnis 1:2 gemischt wurden. Die Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die vitalen Zellen waren deutlich von den blau gefärbten, toten Zellen zu differenzieren.

### **3.1.4 ALAMAR-BLUE PROLIFERATIONS-ASSAY**

Das Proliferationsverhalten der Zellen wurde mittels AlamarBlue™ Assay (Serotec) bestimmt. AlamarBlue™ ist ein Farbstoff, dessen Umsetzung vom oxidierten Zustand in den reduzierten Zustand auf der Atmungsaktivität (Elektronentransport) der Mitochondrien basiert (Ahmed et al., 1994). AlamarBlue™ enthält den Redox-Indikator Resazurin, der in oxidierte Form blau ist und sich in seiner reduzierten Form (Resorufin) rot färbt. Dies kann als Farbänderung sowohl mit der UV-Spektrometrie als auch mit der Fluoreszenzspektrometrie gemessen werden. Ist durch eine verminderte Proliferation die Umsetzung gehemmt, fällt der Farbumschlag deutlich geringer aus und repräsentiert somit die verminderte Vitalität der Zellen.

AlamarBlue™ wird nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die spektralphotometrische Messung erfolgte bei  $\lambda = 570$  nm und als Referenz bei  $\lambda = 630$  nm im Multidetektion Microplate Reader (Bio-Tek).

### **3.1.5 PRÄPARATION VON TUMORZELLEN FÜR *IN VIVO* EXPERIMENTE**

Die *in vitro* gewachsenen Tumorzelllinien müssen für die Injektion in einem guten Zustand sein. Adhärente Zellen sollen zu 70-80 % konfluent vorliegen. Pro Maus wurden  $5 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^7$  Zellen benötigt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Dreifachbodenflaschen, um eine ausreichende Menge an Zellen zur Verfügung zu haben. Nachdem die Zellen trypsiniert und mit PBS gewaschen wurden, erfolgte das Zählen der Zellen mit der Neubauerzählkammer. Gleichzeitig wurde die Vitalität der Zellen mittels Trypanblau-Färbung untersucht. Die Zellzahl wurde entsprechend mit MEM-Earl Kulturmedium eingestellt (Tab. 3.1). Pro Spritze (1 ml, BD Plastipak™) wurden 150  $\mu$ l der Zellsuspension luftblasenfrei über eine Kanüle (100 Sterican®, Ø 0,45 x 12 mm, 26 G x 1/2", B. Braun) aufgezogen und auf Eis gekühlt bis die Injektion erfolgte. Es wurde pro Maus eine sterile Kanüle und Spritze verwendet.

Tab. 3.1: Zellzahl pro Tumor

Zelllinie	Zellzahl
NiH:OVCAR-3	$1 \cdot 10^7$ Zellen/100 $\mu$ l
Hec-1B	$5 \cdot 10^6$ Zellen/100 $\mu$ l
MCF7	$5 \cdot 10^6$ Zellen/100 $\mu$ l
MDA-MB-435	$5 \cdot 10^6$ Zellen/100 $\mu$ l

Bei MCF7 Mammakarzinomzellen wurde die Zellsuspension 1:2 mit Matrigel (Matrigel™ Basement Membrane Matrix, BD Bioscience) gemischt. Dadurch verbessert sich bei diesen Zellen die Anwachsrate *in vivo*.

### 3.1.6 TRANSIENTE TRANSFEKTION ADHÄRENTER ZELLEN

Die transiente Transfektion erfolgte nach einer Methode von Tang (Tang et al., 1996) und wurde mittels SuperFect® (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die kationischen Lipide bilden mit der negativ geladenen DNA einen Nukleinsäure-Liposomen-Komplex, der mit der Plasmamembran von eukaryotischen Zellen fusionieren kann.

Dafür wurden die adhären-wachsende Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und bei einer Konfluenz von 70 % transfiziert. Die Zellen wurden anschließend für 72 h in Transfektionsmedium kultiviert bevor die Stimulationsversuche durchgeführt wurden.

Für immunzytologische Färbungen von transfizierten, adhären Zellen wurden diese in Lab-Tek™ Chamber Slides™ Systemen (Nunc) ausgesät. Dabei handelt es sich um Glasobjektträger, auf die eine Plastikumrandung aufgebracht ist, in der die Zellen kultiviert werden können. Die Transfektion erfolgte wie beschrieben und die Zellen wurden anschließend immunzytologisch gefärbt.

### 3.1.7 STIMULATION MIT GNRH ANALOGA

Die Zellen wurden beim Erreichen einer Konfluenz von 70 % für mindestens 16 h in Medium 1 (Apoptosebestimmung) oder Medium 2 (Signaltransduktion) kultiviert, bevor sie mit den entsprechenden GnRH Analoga stimuliert wurden.

Bei der Apoptosebestimmung erfolgte die Stimulation, aufgrund der Stabilität der Substanzen, alle 24 h. Für die Untersuchung der Signaltransduktion erfolgte die Stimulation zeitabhängig (0, 15, 30, 45, 60 und 90 min). Als Negativkontrolle diente PBS, als Positivkontrolle Doxorubicin (Aeterna Zentaris).

Tab. 3.2: Molekulargewicht der GnRH Analoga

GnRH Analoga	Molekulargewicht [g/mol]
Triptorelin	1311,50
Cetrorelix	1431,06
[D-Lys <sup>6</sup> ]GnRH-II	1307,45
Ant-1	1456,08
Ant-2	1406,07
Ant-3	1426,06

### 3.1.8 ÖSTRADIOL-SCREEN ASSAY

Der Östradiol-Screen Assay (E-Screen Assay; *estradiol screen assay*) beruht auf der östrogenabhängigen Proliferation der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF7 (Soto et al., 1992). Der Versuchsablauf wurde von Körner *et al.* wesentlich vereinfacht und miniaturisiert (Korner et al., 1998). Zum Vergleich der Mausseren und deren östrogenen Aktivität wurden 500 Zellen MCF-7 je Well einer 96-Well-Platte in 100 µl DMEM-Medium w/o Phenolrot ausgesät. Die Serumzugabe (100 µl) erfolgte nach 24 h. Die Proliferation wurde nach sieben Tagen mittels Alamar-Blue Assay (3.1.4) bestimmt.

### 3.1.9 PRÄPARATION VON ZELLMEMBRANEN

Die Zellen wurden in Kulturflaschen ausgesät und beim Erreichen einer Konfluenz von 80 % geerntet und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Das Zellpellet wurde anschließend mit PBS (4°C) gewaschen und für 5 min bei 300xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2,5 ml DTT-Assaypuffer resuspendiert. Mit einem Glas-Glas-Potter (B. Braun) wurde die Suspension für 15 min auf Eis homogenisiert und daraufhin in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit DTT-Assaypuffer auf 5 ml aufgefüllt.

Nach einer Zentrifugation bei 600xg und 4°C für 15 min wurde das Pellet verworfen und der Überstand mit DTT-Assaypuffer versetzt. Die Suspension wurde nun bei 25000 rpm und 4°C für 1 h zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet dreimal mit PBS (4°C) gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das Pellet kann bei Bedarf in Lysispuffer aufgenommen und im Western Blot analysiert werden.

### 3.1.10 GNRH-I REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN

Dieser Bindungsassay beruht auf einer Verdrängungsreaktion des Liganden von markiertem und unmarkiertem Cetorelix (GnRH-I Antagonist) in ansteigenden Konzentrationen an den spezifischen Bindungsstellen.

Zur Untersuchung der Rezeptor-Bindung der GnRH-II Antagonisten wurde die Zelllinie L3.5/78 verwendet, die den GnRH-I Rezeptor stabil exprimiert. L3.5/78 ist ein Subklon der murinen Fibroblasten-Zelllinie LTK. Als weitere Zelllinie wurde die murine, GnRH-I Rezeptor positive Zelllinie  $\alpha$ T3-1 verwendet, welche eine hohe Expression an GnRH-I Rezeptoren aufweist. In Radio-Liganden-Bindungsassays zeigt der GnRH-I Antagonist Cetorelix eine starke Bindungsaffinität zum heterolog exprimierten GnRH-I Rezeptor von  $K_D=0,1$  nM. Die verwendete Zelllinie ist gut für die Analyse von GnRH-Agonisten und Antagonisten-Affinitäten an den GnRH-I Rezeptor geeignet.

Die Analyse erfolgte mit einem speziellen Radiorezeptorassay mit  $^{125}$ I-radioaktiv markiertem Cetorelix (200 pM), das als *tracer* genutzt wurde. Unterschiedliche Konzentrationen der unmarkierten GnRH-II Antagonisten wurden auf die Verdrängung des *tracers* hin untersucht. Dafür wurde eine Suspension aus intakten Zellen und *tracer* auf Silikon/Öl aufgebracht, für 60 min bei 37°C inkubiert und zentrifugiert. Nachdem die Reaktionsgefäße in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden, wurden die Pellets vom Überstand separiert, indem die Gefäße an der Silikon/Öl Schicht zerschnitten wurden. Anschließend wurden die Pellets im  $\gamma$ -Counter analysiert. Die Menge an unspezifischen Bindungen wurde mittels unmarkiertem Cetorelix (1  $\mu$ M) ermittelt. Die  $IC_{50}$  wurde mittels GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) berechnet.

### 3.1.11 CRE-REPORTER GEN ASSAY

Um die funktionellen Auswirkungen der GnRH-II Antagonisten am Rezeptor zu untersuchen, wurde ein *cAMP response element* (CRE)-Reporter Gen Assay durchgeführt. Dafür wurde die rekombinante LTK-basierende Zelllinie L34.3/29 verwendet. Diese exprimiert stabil den GnRH-I Rezeptor und ein Luciferase-Reporter-Gen, welches unter der Kontrolle eines *triple* CRE-Reporter Gens, gekoppelt an den CMV-Promotor, steht. Der GnRH-I Agonist Triptorelin induziert die Luciferase-Expression im nanomolaren Bereich, die durch ATP-Detektion gemessen werden kann. Die verwendete Zelllinie kann sowohl für die Detektion agonistischer als auch antagonistischer Aktivitäten von Substanzen, die an den GnRH-I Rezeptor binden, verwendet werden.

Die Zellen wurden 24 h vor Versuchsbeginn in 96-Well-Platten ausgesät. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit 1 nM Triptorelin und 1 nM Rolipram (Antagonistischer Modus) oder mit 1 nM Rolipram (Agonistischen Modus) in Gegenwart der GnRH-II Antagonisten. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die ATP-Bioluminescence im Flex Station 3 Microplate Reader von Molecular Devices bestimmt.

## 3.2 METHODEN ZUR IDENTIFIZIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG VON APOPTOSE

### 3.2.1 ZELLMORPHOLOGIE MITTELS PHASENKONTRASTMIKROSKOPIE

Zur Detektion der morphologischen Veränderungen der Zellen in der späten Apoptose wurde ein Phasenkontrastmikroskop verwendet. Damit sind Veränderungen wie *membrane blebbing* und die Bildung von *apoptotic bodies*, deutlich zu erkennen (Wyllie et al., 1980). Der Nachweis erfolgt rein qualitativ und lässt keine Rückschlüsse auf prozentuale Verhältnisse zu.

Die Zellen wurden mit dem Phasenkontrastmikroskop von Zeiss detektiert und mit der Kamera ColorView II (Olympus) fotografiert.

### 3.2.2 BESTIMMUNG DES MITOCHONDRIALEN MEMBRANPOTENTIALS

Charakteristisch für die frühe Apoptose des intrinsischen Weges ist der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, der durch Porenbildung in den Mitochondrienmembran verursacht wird. Der elektrochemische Gradient kann mit Hilfe des lipophilen, kationischen Fluoreszenzfarbstoffes JC-1 bestimmt werden (Smiley et al., 1991). JC-1 kann sowohl die Plasma- als auch die Mitochondrienmembran passieren. Im negativ geladenen Inneren der Mitochondrien gesunder Zellen reichert sich der Farbstoff an und bildet dort rot fluoreszierende Aggregate. In apoptotischen Zellen führt das verringerte Membranpotential dazu, dass JC-1 keine Aggregate bilden kann und als grün fluoreszierendes Monomer vorliegt.

Zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentialverlusts wurde der JC-1 Mitochondrial Membran Detection Kit der Firma Cell Technology Inc. verwendet und nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Messung erfolgte im Multidetector Microplate Reader von Bio-Tek.

### 3.2.3 QUANTIFIZIERUNG DER APOPTOSE MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse und Charakterisierung von Zellen aufgrund ihrer fluoreszierenden und lichtstreuenden Eigenschaften. Dazu werden die Zellen in Suspension in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl aneinandergereiht (hydrodynamische Fokussierung) und passieren so einzeln den Laserstrahl. Physikalische Zelleigenschaften wie Größe und Granularität bestimmen die charakteristische Streuung des Laserlichtes. Die Streuung entlang des Laserlichtstrahls in Vorwärtsrichtung gibt Auskunft über die Größe der Zelle. Dieser Parameter wird als *forward scatter* (FSC) bezeichnet. Des Weiteren erfolgt eine von der Granularität abhängige Streuung im rechten Winkel zum einfallenden Licht. Diese Seitwärtsstreuung wird als *side scatter* (SSC) bezeichnet und ist umso höher, je größer die Granularität der Zelle ist. Die gewonnenen Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften werden von speziellen Detektoren erfasst und verstärkt (sog. Photomultiplier, PMT).

Die Aufnahme und Analyse der verschiedenen Parameter der Zellen wird mittels CellQuest (Version 3.0, Becton Dickinson) ausgewertet. Die durchflusszytometrischen Messungen zur Bestimmung der Apoptose-Rate wurden an einem *fluorescence activated cell sorter* (FACScalibur, Becton Dickinson) mit Argon-Laser (Becton Dickinson) vorgenommen.

Die Analyse der Zellen erfolgte nach einer Methode von Nicoletti *et al.*, bei der die DNA der intakten Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) angefärbt wird, nachdem die Zellmembran mit Triton X-100 lysiert wurde (Nicoletti *et al.*, 1991). Als Grundlage dient der Nachweis von DNA-Strangbrüchen, zu denen es in der späten Apoptose kommt. Kleine, abgebaute DNA-Fragmente können die Zellkerne über deren Kernporen verlassen. Der DNA-Gehalt in den Zellkernen nimmt somit mit fortlaufender Apoptose ab und kann mit Propidiumiodid nachgewiesen werden.

Für die Messung werden  $1 \cdot 10^6$  Zellen benötigt, die in 500  $\mu$ l Nicoletti-Lösung resuspendiert wurden. Anschließend erfolgte die Inkubation o/n bei 4°C und die Messung im FACScalibur.

### **3.2.4 TUNEL ASSAY**

Die Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen gilt als charakteristisches Ereignis der späten Apoptose (Collins *et al.*, 1997; Wyllie, 1980). Dabei entstehen an den Strangbrüchen der DNA freie 3'-OH-Enden, durch die sich apoptotische Zellen von nicht-apoptotischen Zellen unterscheiden lassen (Didenko and Hornsby, 1996). Beim TUNEL Assay werden die freien 3'-OH-Enden mit Hilfe einer terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase mit Digoxigenin-Nukleotiden und Fluoreszein markiert (Schmitz *et al.*, 1991) und die apoptotischen Kerne mit einem Kernfarbstoff sichtbar gemacht (Gavrieli *et al.*, 1992). Um die Zellen im Gewebeverband sichtbar zu machen, können Gewebeschnitte mit anderen Markern gefärbt werden.

Das DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega) wurde an Tumorgewebe-Paraffinschnitten durchgeführt und nach Angaben des Herstellers verwendet. Zusätzlich erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin (3.6.5).

### **3.3 VERSUCHSTIERE**

#### **3.3.1 HALTUNGSBEDINGUNGEN VON LABORMÄUSEN**

Alle *in vivo* Experimente wurden gemäß der Richtlinien für tierexperimentelle Forschung unter dem Titel „In vivo Evaluierung von GnRH-II Antagonisten zur Behandlung humaner Karzinome des Endometriums, des Ovars sowie der Mamma“ (Antrags-Nummer 509.42502/01-04.05) in der Tierexperimentellen Einheit im Klinikum der Georg-August-Universität, angemeldet und genehmigt. Für die Versuche wurden ausschließlich sechs bis acht Wochen alte, weibliche, thymusdefiziente Nacktmäuse des Stammes CD1 Nu/Nu aus der Charles River-Zuchtanstalt mit einem Durchschnittsgewicht von 20 bis 25 Gramm verwendet. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen Typ II, die mit Filterhauben versehen waren, mit bis zu fünf Nacktmäusen in den Räumen der Tierexperimentellen Einheit gehalten. Naturähnliche Lebensbedingungen wurden durch Tag-Nacht-Zyklen von zwölf Stunden und klimatisierte Haltung gewährleistet. Die Tiere wurden mit autoklaviertem Wasser und Futter *ad libitum* versorgt. Wasser und Einstreu wurden zweimal wöchentlich gewechselt. Vor dem Beginn der Experimente wurden die Tiere nach der Lieferung für mindestens eine Woche an die neue Umgebung gewöhnt.

#### **3.3.2 TUMORMODELL**

Die Kriterien für ein erfolgreich etabliertes Tumormodel wurden in dem für diese Arbeit zugrunde liegenden Tierversuchsantrag folgendermaßen definiert: Die humanen Karzinomzelllinien gelten als erfolgreich etabliert, wenn innerhalb der ersten vier Wochen nach der Injektion ein Volumen von 100 mm<sup>3</sup> erreicht wurde und es sich innerhalb der darauf folgenden vier Wochen mindestens verdoppelt hat. Ein weiteres Kriterium für die erfolgreiche Etablierung der Xenotransplantatmodelle ist eine Angehrate von mindestens 80 %. Als Abbruchkriterium gilt ein Tumolvolumen von > 1000 mm<sup>3</sup> und sichtbare Nebenwirkungen bei den Nacktmäusen.

### 3.3.3 SUBKUTANE TUMORZELLINJEKTION

Die Applikation der Tumorzellen erfolgte *subcutan* (s.c.) in die rechte Flanke der Maus. Pro Maus wurden  $5 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^7$  Zellen injiziert. Dafür wurde die Einstichstelle desinfiziert (Softasept-Spray, B. Braun) und die Haut seitlich der Wirbelsäule durchstoßen. Die Nadel wurde ventral Richtung Schulterblatt vorgeschoben und die Zellsuspension dort abgesetzt.

### 3.3.4 KONTROLLE DES TUMORWACHSTUMS

Das Tumorwachstum wurde mit einer Schieblehre bestimmt. Dafür wurde der größte Längsdurchmesser (a) und im rechten Winkel dazu der größte Breitendurchmesser (b) bestimmt. Die Genauigkeit der Messung wurde erleichtert, da es sich um Nacktmäuse handelt und das fehlende Haarwachstum zu einer Genauigkeit von  $\pm 0,1$  mm führt. Als untere zuverlässige Messgrenze wurden 2 mm angegeben. Das Tumolvolumen (TV) berechnete sich nach folgender Formel (Noh et al., 2003):

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

Die Bestimmung des Tumolvolumens erfolgte vor Beginn und nach Ende der Therapie und mindestens einmal wöchentlich. Der Therapiebeginn wurde abhängig von der Xenotransplantatgröße (mindestens  $100 \text{ mm}^3$ ) festgelegt. Der erste Therapietag wurde in der Auswertung als Tag 0 bezeichnet. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte nach Messung des prätherapeutischen Tumolvolumens die Aufteilung in Therapiegruppen, wobei Mäuse mit vergleichbaren Ausgangstumolvolumina auf die Gruppen gleich verteilt wurden.

### 3.3.5 VERSUCHSKONZEPTION

Der Therapiebeginn erfolgte an Tag 0, nachdem die Tumolvolumina bestimmt wurden. Die GnRH Analoga (25 nmol in  $100 \mu\text{l}$  pro Maus) wurden *intraperitoneal* (i.p.) injiziert. Die Injektion wurde nach Hautdesinfektion mit einer feinen Kanüle (100 Sterican®,  $\varnothing 0,45 \times 12 \text{ mm}$ , 26 G x  $\frac{1}{2}$ ", B. Braun) vorgenommen und erfolgte in den rechten, unteren Quadranten des Abdomens.

Die Mäuse wurden in Gruppen zu je fünf Tieren eingeteilt (n = 5).

Versuch (1) NiH:OVCAR-3 (Ovarialkarzinom):

Behandlungsdauer: 10 Tage, täglich, i.p.

1. Gruppe: Kontrolle (unbehandelt)
2. Gruppe: GnRH-II Antagonist Ant-1
3. Gruppe: GnRH-II Antagonist Ant-2
4. Gruppe: GnRH-II Antagonist Ant-3

Versuch (2) Hec-1B (Endometriumkarzinom)

Behandlungsdauer: 21 Tage, alle zwei Tage, i.p.

1. Gruppe: Kontrolle 1 (unbehandelt)
2. Gruppe: Kontrolle 2 (GnRH-I Agonist Triptorelin)
3. Gruppe: GnRH-II Antagonist Ant-1
4. Gruppe: GnRH-II Antagonist Ant-2
5. Gruppe: GnRH-II Antagonist Ant-3

Versuch (3) MCF-7 (Mammakarzinom)

Behandlungsdauer: 21 Tage, alle zwei Tage, i.p.

1. Gruppe: Kontrolle 1 (unbehandelt)
2. Gruppe: Kontrolle 2 (GnRH-II Agonist [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II)
3. Gruppe: GnRH-II Antagonist Ant-1
4. Gruppe: GnRH-II Antagonist Ant-2
5. Gruppe: GnRH-II Antagonist Ant-3

Versuch (4) MDA-MB-435 (Mammakarzinom)

Behandlungsdauer: 14 Tage, alle zwei Tage, i.p.

1. Gruppe: Kontrolle 1 (unbehandelt)
2. Gruppe: Kontrolle 2 (GnRH-II Agonist [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II)
3. Gruppe: GnRH-II Antagonist Ant-1
4. Gruppe: GnRH-II Antagonist Ant-2
5. Gruppe: GnRH-II Antagonist Ant-3

### **3.3.6 SEKTION**

Nach Beendigung der Versuche oder beim Eintreten von Abbruchkriterien erfolgte die Tötung der Mäuse durch Inhalationsnarkose mit CO<sub>2</sub> und Genickbruch. Für die Blutentnahme aus dem Herzen wurden die Mäuse nur durch konstanten CO<sub>2</sub>-Einstrom in einen geschlossenen Käfig getötet, um einen Verlust an Blut vorzubeugen. Die Entnahme der Organe und Tumoren erfolgte direkt im Anschluss an die Tötung.

### **3.3.7 GEWINNUNG VON SERUM AUS MÄUSEBLUT**

Die Blutentnahme aus dem Herzen erfolgte nach Öffnen des Brustkorbs mit Hilfe einer Kanüle (100 Sterican®, Ø 0,80 x 25 mm, 21 G x 1", B. Braun), die nicht zur Hämolyse der Erythrozyten führt. Zur Gewinnung des arteriellen Blutes wurde die linke Herzkammer punktiert. Das gewonnene Blut wurde, nachdem es bei RT für 30 min geronnen war, bei 4°C für 10 min und 3000xg zentrifugiert. Das Serum wurde anschließend bei -20°C gelagert, bis es im Östradiol-Screen-Assay verwendet wurde (3.1.8).

### **3.3.8 GEWEBEGEWINNUNG UND AUFBEREITUNGSVERFAHREN**

Nach der Sektion wurden die Tumoren präpariert und von Haut und umliegenden Gewebe befreit. Die Tumoren werden mit einem Skalpell (TechnoCut, HMD Healthcare) in der Mitte geteilt, wobei eine Hälfte für Paraffinschnitte in Formaldehyd-Lösung fixiert wurde und die andere Hälfte in einem Kryogefäß in flüssigem Stickstoff für die RNA-Aufreinigung schockgefroren wurde und anschließend bei -80°C gelagert wurde.

Die Präparation der Ovarien und Uteri erfolgte zur Bestimmung des Ovarial- und Uterusgewichts, da dies einen Parameter für die Wirkung der GnRH Analoga über die Hypophyse darstellt. Die Ovarien und Uteri wurden vom umliegenden Fettgewebe befreit und auf einer Analysenwaage gewogen.

Das Präparierbesteck wurde von der Firma Schütt bezogen.

## **3.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN**

### **3.4.1 ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN**

#### **3.4.1.1 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA FÜR DIE TRANSFEKTION**

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Mikroorganismen wird eine modifizierte Methode nach Birnboim angewandt (Birnboim and Doly, 1979). Diese Methode dient der Gewinnung sehr reiner kovalent geschlossener Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung, zur präparativen Restriktion oder in eine PCR eingesetzt werden kann. Sie beruht auf der alkalischen Lyse der Zellen und der anschließenden Adsorption der DNA an eine Silicagel-Membran in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen (Vogelstein and Gillespie, 1979).

Für die Transfektion eukaryotischer Zellen wurde ausschließlich mit dem Endofree® Plasmid Maxi Kit gereinigte Plasmid-DNA verwendet, um die Transfektionseffizienz durch bakterielle Endotoxine nicht zu beeinträchtigen. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben.

#### **3.4.1.2 ISOLIERUNG VON RNA AUS TUMORGEWEBE**

Zur Isolation von RNA aus Tumorgewebe wurde der RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen verwendet und nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Prinzip der Isolation beruht auf der Bindung von negativ-geladenen Nukleinsäuren in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen an Glasfaseroberflächen von Silicagel-Säulchen (Vogelstein and Gillespie, 1979). Dabei sind die Bindungsbedingungen für RNA optimiert. Bei einer solchen Isolation wird auch DNA aufgereinigt, allerdings liegt die RNA im großen Überschuss vor. Die DNA kann anschließend über DNase I abgebaut werden. Dafür wird das RNase-Free DNase Set von Qiagen verwendet und nach Herstellerangaben eingesetzt.

Die Vorbereitung des Tumorgewebes erfolgte mit dem QIAshredder (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

### 3.4.1.3 ISOLIERUNG VON RNA AUS ADHÄRENTEN ZELLEN

Zur Isolation von RNA aus adhärennten Zellen wurde der RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) ausgesät und bei einer Konfluenz von 80 % mit RLT-Puffer überschwemmt. Die Suspension konnte anschließend bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert werden.

### 3.4.2 QUANTIFIZIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

UV-Licht führt zur Anregung zyklisch konjugierter  $\pi$ -Elektronen der Pyrimidin- und Purinbasen und bewirkt den Elektronenübergang in das nichtbesetzte  $\pi$ -Orbital. Der pH-Wert und die Polarität des umgebenden Lösungsmittels können sowohl die Wellenlängen der Absorptionsmaxima als auch die molaren Extinktionskoeffizienten beeinflussen (Wilfinger et al., 1997).

Die Bestimmung der Konzentration erfolgt bei  $\lambda = 260$  nm, da Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum besitzen. Proteine, die bei einer DNA/RNA-Präparation als Verunreinigung gelten, besitzen ihr Absorptionsmaximum bei  $A_{280}$ . Das Verhältnis der Extinktionen von  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  lässt somit auf die Reinheit der Nukleinsäurelösung schließen und sollte zwischen 1,8 und 2 liegen (Glasel, 1995). Für die Messungen wurde das BioPhotometer 6131 der Firma Eppendorf verwendet.

Tab. 3.3: Faktoren zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

---

Umrechnungsfaktoren:	dsDNA: $A_{260}$	$\cong 50\mu\text{g/ml}$
	ssDNA: $A_{260}$	$\cong 37\mu\text{g/ml}$
	Oligos: $A_{260}$	$\cong 30\mu\text{g/ml}$
	RNA: $A_{260}$	$\cong 40\mu\text{g/ml}$

---

### 3.4.3 REVERSE TRANSKRIPTION

Die Reverse-Transkriptase-PCR dient dazu spezifische RNA-Sequenzen zu amplifizieren. Zunächst muss die RNA in einen komplementären DNA-Strang

(cDNA) umgeschrieben werden. Dieser Vorgang wird als reverse Transkription (RT) (Veres et al., 1987) bezeichnet und wird von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen durchgeführt. Als Primer wird ein Random-Oligomer mit einer statistischen Basenzusammensetzung verwendet. Dieser Primer kann an den verschiedensten Stellen eines RNA-Moleküls hybridisieren und somit eine DNA-Synthese über die gesamte Länge der DNA einleiten. Anschließend wird die Probe in eine PCR eingesetzt, in der die gebildete cDNA als Template dient.

In die RT wurde 1 µg RNA eingesetzt und mit 8 µl Random-Hexamer (Invitrogen) für 3 min bei 72°C inkubiert. Anschließend wurde der Enzym-Mix (Tab. 3.4) hinzugegeben und der Ansatz wird für 60 min bei 37°C inkubiert und bei 95°C für 10 min denaturiert.

Anschließend konnten die Proben als Template in eine PCR eingesetzt werden.

Tab. 3.4: Enzym-Mix für Reverse Transkription

Material	Einsatz [µl]	Ausgangskonzentration
RT-Puffer	8	5 x
DTT	4	100 mM
dNTPs (Roche)	4	10 mM
Rnase-Inhibitor (Promega)	1	
SuperScript II (Invitrogen)	2	

#### 3.4.4 POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine effiziente Methode zur selektiven Amplifikation von DNA-Fragmenten (Mullis et al., 1986). Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase, ausgehend von DNA-Oligonukleotiden, einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize, der Template-DNA. Die synthetischen DNA-Oligonukleotide (Primer) hybridisieren an die Template-DNA. Vom 3'-Ende der Primer aus synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase den neuen DNA-Strang, indem neue Deoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTP) über den α-Phosphatrest mit der 3-OH-Gruppe des vorangegangenen dNTPs unter der Freisetzung von Pyrophosphat verknüpft werden. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Primers kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen diesen vervielfältigt werden.

Nach der Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Moleküle bei 95°C werden die Primer bei einer spezifischen Temperatur (ca. 60°C) angelagert (Annealing) und durch die hitzestabile DNA-Polymerase verlängert (Elongation). Die Elongation erfolgt bei 72°C, dem Temperatur-Optimum der *Taq* Polymerase (Saiki et al., 1988), die in der Regel für die PCR eingesetzt wird. Diese stammt aus dem Organismus *Thermus aquaticus* und trägt daher diesen Namen. Durch eine zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wird die Matrize exponentiell amplifiziert.

In der semiquantitativen PCR diene die Amplifikation von L7 als Kontrolle, da dieses ribosomale Protein in allen Geweben exprimiert wird. In Tab. 3.5 ist das Pipettierschema und in Tab. 3.6 das PCR-Programm für das jeweilige Gen zusammengefasst.

Tab. 3.5: Reaktionsansatz einer Standard-PCR

Material	Einsatz [ $\mu$ l]	Ausgangskonzentration
ddH <sub>2</sub> O	11,1	
dNTPs	1,2	1 mM
Puffer	1,5	10 x
DNA-Template	0,6	10-100 ng/ $\mu$ l
Sense-Primer	0,3	20 $\mu$ M
Antisense-Primer	0,3	20 $\mu$ M
<i>Taq</i> -Polymerase	0,075	5 U/ $\mu$ l
Gesamtvolumen	15	

Tab. 3.6: PCR-Programm: Temperatur und Zeit

Gen	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen
cerb-B2	30 sec, 94°C	30 sec, 58°C	60 sec, 72°C	28
EGF-R-1	30 sec, 94°C	30 sec, 56°C	60 sec, 72°C	27
GnRH-I R	30 sec, 94°C	30 sec, 61°C	45 sec, 72°C	35
GnRH-II R	30 sec, 94°C	30 sec, 60°C	60 sec, 72°C	28
IGF I-R $\beta$	30 sec, 94°C	60 sec, 56°C	60 sec, 72°C	30
L7	30 sec, 94°C	60 sec, 54°C	120 sec, 72°C	21

Die PCR-Produkte wurden über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, anschließend dokumentiert und analysiert.

### **3.4.5 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE**

Die Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von DNA in einer Matrix aus Agarose, bei der die Prozentigkeit die Maschenweite des Gels bestimmt (McDonell et al., 1977). Agarose ist ein Polysaccharid und wird aus roten Meeresalgen gewonnen. Die Agarose wird durch Aufkochen in Pufferlösung gelöst und geliert beim Abkühlen. Durch das Anlegen einer Gleichspannung an horizontale, pufferüberschichtete Gele können die negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden, da sie unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten besitzen. Die Nukleinsäure-Banden können durch interkalierende Farbstoffe, z.B. Ethidiumbromid (EtBr), nachgewiesen werden. Dies erlaubt eine Dokumentation der Nukleinsäuren, da sich EtBr zwischen den Basen einlagert und nach Anregung mit UV-Strahlung ( $\lambda=302$  nm) fluoresziert. Es erscheint der Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex als rot-orange leuchtende Bande.

Zur Herstellung der Gele wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und ohne Luftbläschen in die Gelkammern mit eingestecktem Kamm gegossen. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde es mit 1x TBE-Puffer in einer Elektrophoresekammer überschichtet und der Gelkamm gezogen. Die zu analysierenden Nukleinsäuren wurden mit 10x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Referenz diente ein DNA-Fragmentlängen-Standard (100 bp Ladder, Invitrogen).

In der Regel laufen die Gele bei 85 V für ca. 45 min. Aufgrund der Farbbande des DNA-Ladepuffers ist eine Abschätzung der Laufstrecke möglich. Die Gele wurden anschließend für 20 min im EtBr-Bad gefärbt, in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und die Ergebnisse mit dem Kodak digital science™ electrophoresis documentation and analysis system DC120 festgehalten und ausgewertet.

## **3.5 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN**

### **3.5.1 PRÄPARATION VON ZELLYSATEN**

Für die Herstellung von Zellysaten wurden die Zellpellets zweimal in PBS gewaschen, bei 300xg für 5 min zentrifugiert und anschließend in Lysispuffer (CellLytic™-M Buffer, Sigma), abhängig von der Pelletgröße, resuspendiert. Um den Abbau der Proteine und deren Phosphorylierungen zu verhindern, wurde ein Protease-Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich) und ein Phosphatase-Inhibitor-Cocktail zugesetzt. Die resuspendierten Pellets wurden anschließend für 15 min bei RT und 800 rpm geschüttelt und anschließend bei 4°C und 20000xg für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und in eine Proteinbestimmung eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

### **3.5.2 QUANTIFIZIERUNG VON PROTEINEN NACH BRADFORD**

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays durchgeführt (Bradford, 1976). Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau bildet mit den Seitenketten der Proteine Komplexe, deren Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 595$  nm liegt. Das Absorptionsverhalten nimmt linear mit der Konzentration der Proteine zu. Als Standard dient BSA (Stammlösung 1 mg/ml), das zur Ermittlung der Regressionsgeraden genutzt wird. Die Standardreihe wird wie in Tab. 3.7 angegeben angesetzt.

Der Farbstoff Coomassie (Bio-Rad) wurde 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und filtriert. Die Zellysate wurden 1:20 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und 50 µl dieser Proben und des Standards wurden mit 2,5 ml der verdünnten Coomassie-Lösung versetzt. Nach einer Inkubation der Proben für 10-50 min wurden 350 µl jedes Ansatzes in die Wells einer 96-Well-Platte gegeben und bei  $\lambda = 595$  nm im Multidetecation Microplate Reader (BIO-TEK) gemessen. Es wurden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt.

Tab. 3.7: Pipettierschema zur Erstellung der Regressionsgeraden mit BSA

BSA-Konzentration [ $\mu\text{g}$ ]	Einsatz BSA [ $\mu\text{l}$ ]	ddH <sub>2</sub> O [ $\mu\text{l}$ ]	Endvolumen [ $\mu\text{l}$ ]
0	0	1000	1000
50	50	950	1000
80	80	920	1000
100	100	900	1000
200	200	800	1000
300	300	700	1000
400	400	600	1000
500	500	500	1000
1000	1000	0	1000

### 3.5.3 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE

Die eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine der Größe nach auf. Dabei binden die Proteine im Überschuss zugesetztes SDS und erhalten eine negative Ladung. Da diese zu ihrem Molekulargewicht proportional ist, werden die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix der Molmasse nach aufgetrennt.

Bei der verwendeten Methode nach Laemmli werden die Proben zunächst in einem Sammelgel mit 5 % Polyacrylamid (Tab.3.8) konzentriert und anschließend im 10 %igen Trenngel (Tab.3.9) separiert (Laemmli, 1970). Für die SDS-PAGE wurde die Mini-PROTEAN III Electrophoresis Cell Apparatur von BioRad verwendet und nach den Angaben des Herstellers aufgebaut.

Tab. 3.8: 5 % Sammelgel

Material	Einsatz
ddH <sub>2</sub> O	3,1 ml
Prosieve 50 Gel Solution (Cambrex)	0,5 ml
1,0 mM Tris	1,3 ml
10 % SDS	50 $\mu\text{l}$
10 % APS	50 $\mu\text{l}$
TEMED	4 $\mu\text{l}$

Tab. 3.9: 10 % und 14% Trenngel (Ansatz für zwei Gele)

Material	10 % Trenngel	14 % Trenngel
ddH <sub>2</sub> O	5,3 ml	4,8 ml
Prosieve 50 Gel Solution (Cambrex)	2,0 ml	2,5 ml
1,0 mM Tris	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl
10 % APS	100 µl	100 µl
TEMED	4 µl	4 µl

Die Proben wurden mit zweifach konzentriertem Laemmli-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 3 min denaturiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis, wurde das Gel mit diesen und dem Molekularmassenmarker (Precision Plus Protein™ Standards, Biorad) beladen. Die Elektrophorese erfolgte für 30 min bei 80 V<sub>const</sub> und anschließend für 1 h bei 150 V<sub>const</sub> in SDS-Elektrophorese-Puffer.

Die aufgetrennten Proteine konnten nun im Western Blot auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und nachgewiesen werden.

### 3.5.4 WESTERN BLOT

Beim Western Blot-Verfahren werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus Gelen auf Nitrocellulosemembranen transferiert (*blotting*), um sie dann durch Reaktion mit spezifischen Antikörpern nachweisen zu können (Towbin et al., 1979).

Für den Western Blot wurde das Tank System der Firma Bio-Rad verwendet und nach den Angaben des Herstellers aufgebaut. Dazu wurde das SDS-Gel auf die Nitrocellulosemembran (Hybond-ECL™, Amersham Bioscience) luftblasenfrei aufgebracht und zwischen je zwei mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere (Whatman®, Schleicher & Schuell) gelegt. Dieses Sandwich wurde zwischen zwei Schaumstoffschichten so in die Blottingapparatur eingespannt, dass die Nitrocellulosemembran der Anode zugewandt war. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 100 V<sub>const</sub>. Anschließend diente der vorgefärbte Molekularmassenmarker zur Kontrolle der Transfereffizienz.

### 3.5.5 DETEKTION UND VISUALISIERUNG

Nach dem Transfer werden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur mit *blocking*-Lösung inkubiert. Anschließend werden die Nitrocellulosemembranen dreimal für 10 min mit TBST gewaschen, gefolgt von der Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C o/n. Nach wiederholtem Waschen unter den gleichen Bedingungen erfolgt die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1 h, RT).

Vor der Visualisierung wurden die Membranen dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Zur Detektion der gebundenen Sekundärantikörper wurde der ECL (Immobilon™ Western) der Firma Millipore eingesetzt. Dieses sehr sensitive Reagenz zeigt bei der katalytischen Umsetzung durch die Peroxidase eine Chemolumineszenz mit einem Maximum bei  $\lambda = 430$  nm, mit der Röntgenfilme belichtet werden können. Es wurden Röntgenfilme der Firma Kodak verwendet, die in nach der Exposition in einer Röntgenfilmkassette (X-Ray GmbH), im X-Ray Film Prozessor SRS-101A (Konica) in einer Dunkelkammer entwickelt wurden.

### 3.5.6 STRIPPEN VON NITROCELLULOSEMEMBRANEN

Um eine Nitrocellulosemembran erneut mit einem Primärantikörper hybridisieren zu können, muss diese Membran von bereits gebundenen Antikörpern befreit werden. Dieser Vorgang wird als *strippen* bezeichnet und wurde mit dem *Antibody Stripping Buffer* der Firma Uptima Interchim durchgeführt. Die Membranen wurden für 15 min bei RT und 1000 rpm mit diesem Puffer inkubiert, anschließend mit ddH<sub>2</sub>O gespült, erneut geblockt und mit dem neuen Primärantikörper behandelt. Das *strippen* der Membranen wurde maximal zweimal durchgeführt.

## **3.6 HISTOLOGISCHE METHODEN**

### **3.6.1 EINBETTUNG VON TUMOREN IN PARAFFIN**

Das frisch entnommene Gewebe wurde für mindestens 24 h in 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Die anschließende Dehydrierung des Gewebes erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %) für jeweils zweimal 2 h. Nach einer ebenfalls zweistündigen Inkubation in Xylol, erfolgte das Durchtränken des Gewebes mit ca. 70°C heißem Paraffin für 12 h. Anschließend wurde das Gewebe mit flüssigem Paraffin in vorgewärmte Formen gegeben, in der gewünschten Lage fixiert und bei RT ausgehärtet. Die Lagerung der Paraffinblöcke erfolgte bei RT.

### **3.6.2 ANFERTIGUNG VON PARAFFINSCHNITTEN**

Die Paraffinschnitte wurden direkt aus dem Paraffinblock mit einer Schnittdicke von 4 µm am Rotations-Mikrotom (Slee Mainz) hergestellt. Die Streckung der Schnitte erfolgte bei 37°C im Wasserbad, um diese faltenfrei auf einen silanisierten Objektträger (Thermo Electron) zu bringen. Das Trocknen der Schnitte erfolgte bei 42°C.

### **3.6.3 ENTPARAFFINIERUNG/REHYDRIERUNG VON PARAFFINSCHNITTEN**

Da Paraffinrückstände die Hintergrundfärbung erhöhen, müssen diese vollständig aus den Präparaten entfernt werden. Dafür wurden die Schnitte für etwa 30 min bei 60°C erwärmt. Das flüssige Paraffin konnte durch zweimaliges Waschen mit Xylol entfernt werden. Zur Rehydrierung mussten die Schnitte eine absteigende Ethanolreihe durchlaufen (100 %, 90 %, 80 %, 70 %). Die Inkubation erfolgte jeweils für etwa 5 min.

### **3.6.4 IMMUNFÄRBUNG DER GEWEBESCHNITTE**

Vor der Immunfärbung muss die endogene Peroxidase blockiert werden. Dafür wurden die Schnitte mit einer 3 %igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung in Methanol für 20 min inkubiert. Um anschließend die nukleären Antigene zu demaskieren, wurden die

Schnitte dreimal in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in Citratpuffer für 5 min in der Mikrowelle (600 W) aufgekocht.

Für die Immunfärbung wurde der Histostain® Bulk Kit der Firma Zymed nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper erfolgte bei 4°C o/n in einer feuchten Kammer. Als Chromogen wurde Diaminobenzidin (DAB, Dako) verwendet. Dafür wurde das Chromogen 1:5 mit seinem Substratpuffer verdünnt und auf die Schnitte gegeben und für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, in einer aufsteigenden Alkohol-Reihe (70 %, 80 %, 90 %, 100 %) für je 5 min entwässert und für weitere 5 min mit Xylol behandelt. Das Eindecken erfolgte mit Gurr DePex Mounting Medium (BDH Chemicals).

### **3.6.5 FÄRBUNG MIT HÄMATOXYLIN-EOSIN**

Mit der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung werden Zellkerne dunkelblau bis violett und das Zytoplasma rosa angefärbt. Durch die Behandlung mit Hämatoxylin wird der Schnitt gleichzeitig fixiert. Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden 5-15 min in einer 1:10 verdünnten Meyer's Hämatoxylinlösung bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 10 min vorsichtig mit Leitungswasser gespült, um durch Oxidation des gebundenen Hämalans eine endgültige Farbstoffentwicklung zu erreichen. Die Eosin-Färbung erfolgte für 5 min in einer 0,1 % Eosin-Lösung in 50 % Ethanol. Die anschließende Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkohol-Reihe (70 %, 80 %, 90 %, 100 %) für je 5 min und anschließender vollständiger Entwässerung für 5 min in Xylol. Die Schnitte wurden mit Gurr DePex Mounting Medium eingedeckt.

### **3.6.6 TISSUE ARRAY**

Für die Durchführung des Tissue Arrays wurde ein Objektträger mit humanem Material von der Firma SuperBioChips Laboratories bezogen, auf dem 59 verschiedenen Stanzen aus unterschiedlichen Organen und Geweben aufgebracht und fixiert sind. Auf diesem Objektträger wurde eine immunhistochemische Färbung mit dem GnRH-II Rezeptor Antiserum

durchgeführt, um die Verteilung des GnRH-II Rezeptors im menschlichen Körper zu analysieren.

### **3.7 DOKUMENTATION UND STATISTISCHE ANALYSEN**

Zur mikroskopischen Analyse der Schnitte stand ein Mikroskop, IX41 mit Kamera von Olympus zur Verfügung. Die Dokumentation und Analyse der Western Blots erfolgte mittels Kodak Digital Science 1D Image Analyse Software (Version 2.0.3).

Agarosegele wurden mit dem Kodak digital science™ electrophoresis documentation and analysis system DC120 fotografiert und mit der Kodak Digital Science 1D Image Analyse Software (Version 2.0.3) ausgewertet.

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der Ergebnisse diente die Software GraphPad Prism (Version 4.03). Als statistische Tests wurden der *one-way* ANOVA, sowie der Newman Keuls-Test angewendet. Die statistische Analyse wurde wie folgt angegeben: a,  $P < 0,05$  vs. Kontrolle; b,  $P < 0,01$  vs. Kontrolle; c,  $P < 0,001$  vs. Kontrolle; d,  $P < 0,0001$  vs. Kontrolle; n.s., nicht signifikant.

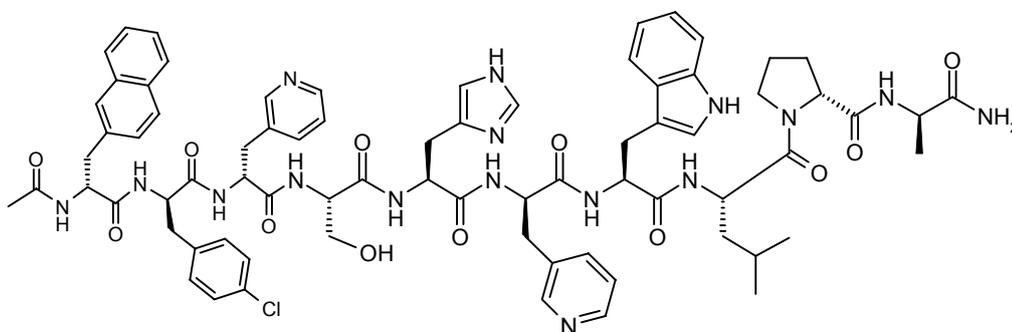
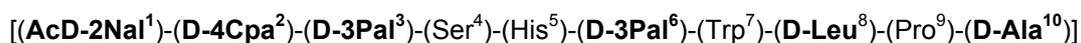
## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 DESIGN UND STRUKTUR DER GnRH-II ANTAGONISTEN

Synthetische GnRH Analoga weichen in mindestens einer Aminosäure vom nativen Dekapeptid ab. Dadurch erhöht sich die Halbwertszeit des Proteins signifikant und die Affinität zum Rezeptor ist um das 100-200fache höher als die des nativen Proteins.

Die für diese Arbeit entwickelten GnRH-II Antagonisten, Ant-1, Ant-2 und Ant-3, weisen die für GnRH Antagonisten typischen Aminosäuresubstitutionen auf. An den Positionen eins bis drei wurden nicht-natürliche D-Aminosäuren eingefügt und an Position zehn befindet sich ein D-Alanin, was für die Bindung an den Rezeptor erforderlich ist, ohne dass dieser aktiviert wird. An Position sechs wurde bei allen drei Substanzen ebenfalls eine D-Aminosäure eingefügt, was zu einer Stabilisierung des Dekapeptids führt und die Halbwertszeit des Proteins erhöht (Karten and Rivier, 1986). In Abbildung 4.1 ist exemplarisch der GnRH-II Antagonist Ant-3 dargestellt. Die strukturell ähnlichen Antagonisten unterscheiden sich untereinander durch die Positionen sechs und acht.

Die GnRH-II Antagonisten wurden in unserem Auftrag von der Firma Peptide Specialty Laboratories GmbH als TFA-Salz synthetisiert. Die Reinheit der Substanzen wurde zuvor mittels NMR analysiert. Die Peptide wurden aufgrund der nicht-natürlichen Aminosäuren 1:100 mit 1 N Essigsäure angelöst und in



**Abb. 4.1: Strukturformel des GnRH-II Antagonisten Ant-3.** Das Dekapeptid hat im Vergleich zum nativen GnRH-II Aminosäuresubstitutionen an den Positionen eins, zwei, drei, sechs, acht und zehn.

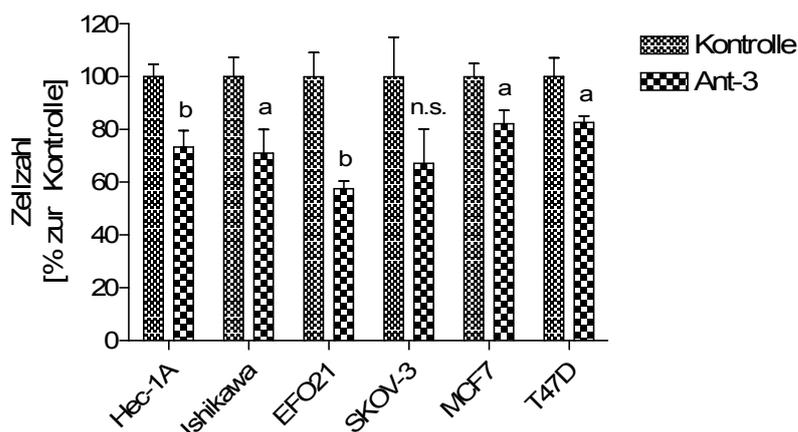
PBS entsprechend verdünnt. Die Stammlösungen wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 4.2 EFFEKTE VON GnRH-II ANTAGONISTEN AUF DIE PROLIFERATION UND INDUKTION VON APOPTOSE *IN VITRO*

### 4.2.1 ANTIPROLIFERATIVE EFFEKTE DER GnRH-II ANTAGONISTEN AUF GYNÄKOLOGISCHE KARZINOMZELLINIEN

Aufgrund der antiproliferativen Effekte von GnRH-I Agonisten und Antagonisten sowie der noch stärkeren antiproliferativen Effekte des GnRH-II Agonisten [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II auf gynäkologische Karzinomzelllinien (Gründker et al., 2004), sollte der Einfluss der GnRH-II Antagonisten auf Ovarial-, Endometrium- und Mammakarzinomzellen ebenfalls *in vitro* untersucht werden.

Dafür wurden die Zelllinien Hec-1A, Ishikawa, EFO21, SKOV-3, MCF7 und T47D für 96 h mit den jeweiligen GnRH-II Antagonisten ( $10^{-9}$  M) in Medium 1 inkubiert und anschließend die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Abbildung 4.2 stellt den Einfluss des GnRH-II Antagonisten Ant-3 auf die Zellzahl graphisch dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellzahl bei allen eingesetzten Zelllinien im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (100%)



**Abb. 4.2: Effekte von GnRH-II Antagonisten auf die Proliferation von gynäkologischen Karzinomzelllinien.** Die Inkubation mit dem GnRH-II Antagonisten Ant-3 ( $10^{-9}$  M) erfolgte für fünf Tage. In den Endometrium- und Mammakarzinomzelllinien und in der Ovariakarzinomzelllinie EFO21 wurde die Proliferation signifikant gehemmt. a,  $P < 0,05$  vs. Kontrolle; b,  $P < 0,01$  vs. Kontrolle; n.s., nicht signifikant.

bereits im nanomolaren Bereich reduziert ist (Hec-1A:  $73,39 \pm 6,71$  % ( $P < 0,01$ ); Ishikawa:  $71,04 \pm 8,95$  % ( $P < 0,05$ ); EFO21:  $57,53 \pm 2,89$  % ( $P < 0,01$ ); SKOV-3:  $77,40 \pm 13,74$  % (n.s.); MCF-7:  $82,17 \pm 5,10$  % ( $P < 0,05$ ); T47D:  $82,66 \pm 2,36$  % ( $P < 0,05$ )). Die Zellzahl nahm über einen Zeitraum von sieben Tagen noch weiter ab.

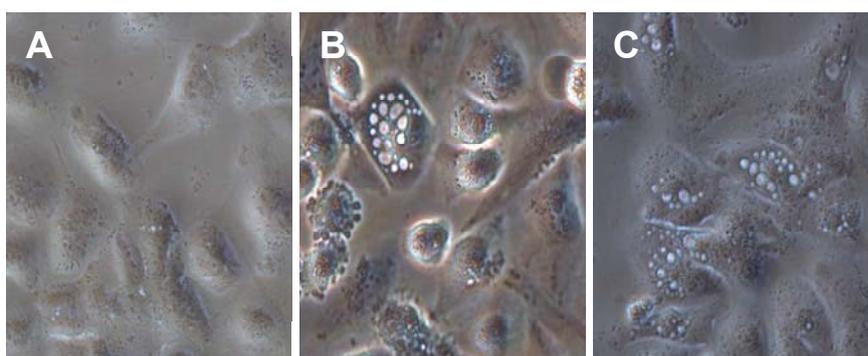
#### 4.2.2 INDUKTION VON APOPTOSE *IN VITRO*

Um zu überprüfen, auf welchen Mechanismen die Zellzahl-reduzierenden Effekte der GnRH-II Antagonisten beruhen, wurden die Zellen hinsichtlich der Induktion von Apoptose untersucht.

##### 4.2.2.1 MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DER ZELLEN

Apoptotische Zellen weisen im Verlauf des Prozesses mikroskopisch detektierbar, optische Veränderungen, wie Ausstülpungen der Membran (*membrane blebbing*) und die Bildung von *apoptotic bodies*, auf (Allen et al., 1997; Mills et al., 1998). Diese apoptotischen Ereignisse können mittels Phasenkontrastmikroskopie analysiert werden.

Nach der Inkubation der Endometriumkarzinomzelllinie Hec-1A und der Ovarialkarzinomzelllinie EFO21 für 72 h mit oder ohne Ant-3 ( $10^{-5}$  M) wurde die Morphologie der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop ausgewertet (Abb.



**Abb. 4.3: Zellmorphologie nach Induktion von Apoptose in der Ovarialkarzinomzelllinie EFO21.** Die Inkubation erfolgte 72 h mit PBS (A), Doxorubicin (B) oder Ant-3 (C). Anschließend erfolgte die Auswertung mittels Phasenkontrastmikroskopie. Die mit dem Chemotherapeutikum (B) und Antagonisten (C) behandelten Zellen zeigen deutlich morphologische Eigenschaften des programmierten Zelltods. Die mit PBS behandelte Kontrolle zeigt keine Induktion von Apoptose. (20x)

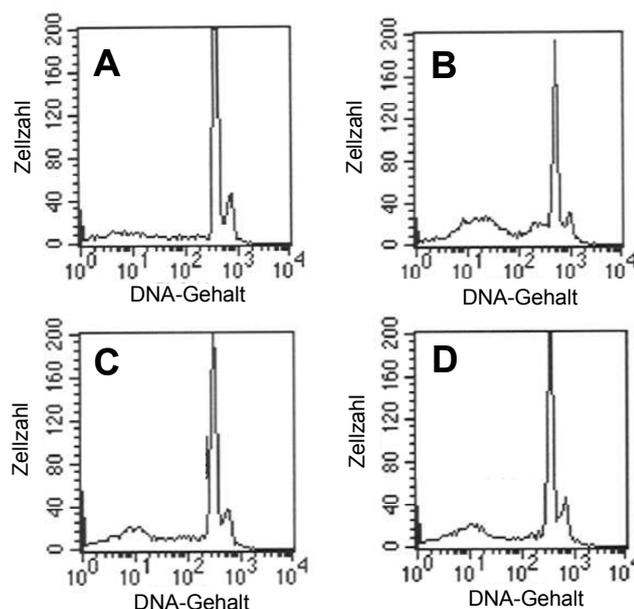
4.3). Als Positivkontrolle diente das Zytostatikum Doxorubicin ( $10^{-7}$  M). Ohne Behandlung (Kontrolle) sind keine morphologischen Veränderungen der Zellmembran zu beobachten (A), während bei der Behandlung mit Doxorubicin deutliche Anzeichen von Apoptose zu erkennen sind (B). Die Inkubation mit Ant-3 (C) resultiert ebenfalls in morphologischen Veränderungen der Zellen, die jedoch nicht so stark ausgeprägt sind wie durch die Behandlung mit Doxorubicin. Es sind deutlich Membranausstülpungen, sowie die Kompartimentierung der Zellorganellen und das Verpacken in Vesikel zu erkennen, während in der unbehandelten Negativkontrolle intakte Zellen zu detektieren sind. Die gleichen Ergebnisse resultieren auch für die Zelllinie Hec-1A. Dieser Nachweis erfolgte rein qualitativ, nicht quantitativ.

#### 4.2.2.2 QUANTIFIZIERUNG MITTELS DNA-DEGRADATION

Ein charakteristischer Parameter im Endstadium der Apoptose ist der Abbau der DNA durch Endonukleasen in ca. 180 bp große Fragmente (*DNA-laddering*) (Wyllie, 1980). Der DNA-Gehalt im Nukleus sinkt mit fortschreitender Apoptose und kann mittels Durchflusszytometrie quantifiziert werden. Der Zellzyklus wird in einem Histogramm der Propidiumiodid-Fluoreszenz dargestellt und teilt sich in prä- $G_0/G_1$ -,  $G_0/G_1$ -, S- und  $G_2/M$ -Phase auf. Der Anteil apoptotischer Zellen ist im prä- $G_0/G_1$ -Peak dargestellt und kann prozentual bestimmt werden.

Die Ovarialkarzinomzellen SKOV-3, die Endometriumkarzinomzellen Ishikawa und die Mammakarzinomzellen T47D wurden nach 72 h Inkubation mit den GnRH-II Antagonisten Ant-1, Ant-2 und Ant-3 ( $10^{-5}$  M) in Medium 1 mit Nicoletti-Lösung o/n behandelt und der Zellzyklus per FACS-Analyse untersucht. Das in der Nicoletti-Lösung enthaltene Triton-X 100 löst die Plasmamembran auf, während die Nukleusmembran erhalten bleibt. Das sich außerdem in der Lösung befindliche Propidiumiodid (PI) kann dann durch die Kernporen in den Zellkern eindringen und zwischen die Basen der DNA interkalieren.

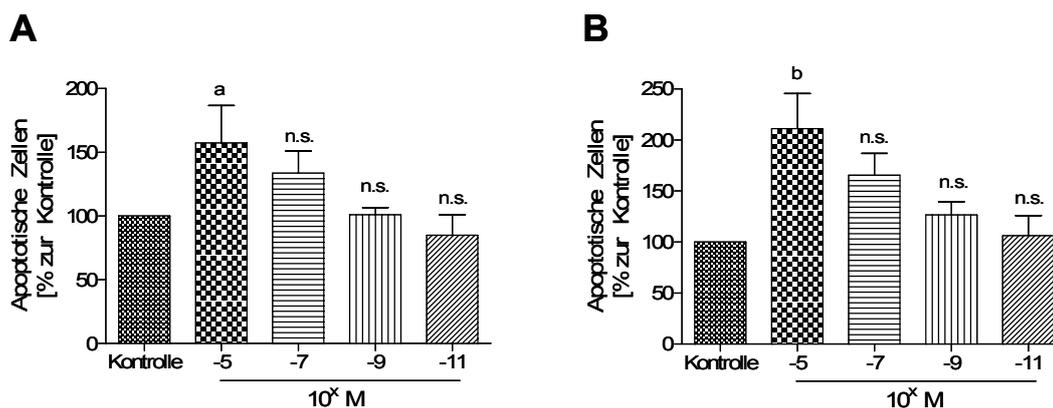
Es konnte in allen verwendeten Zelllinien eine deutliche Zunahme des prä- $G_0/G_1$ -Peaks und somit der apoptotischen Zellen im Vergleich zur Kontrolle (PBS) verzeichnet werden. In Abbildung 4.4 ist die Apoptose-Induktion in der



**Abb. 4.4: DNA-Degradation durch Induktion von Apoptose in der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3.** Die Inkubation erfolgte 72 h mit PBS (A), Ant-1 (B), Ant-2 (C) oder Ant-3 (D). Anschließend erfolgte die Analyse mittels Durchflußzytometrie im FACS. Apoptotische Zellen spiegeln sich im prä-G1-Peak wieder. Ohne Behandlung mit GnRH-II Antagonisten zeigte sich nur eine geringe Spontanapoptose (A: 19,1 %), während nach Behandlung mit GnRH-II Antagonisten die Apoptose stark erhöht ist (B: 49,7 %; C: 33,5 %, D: 40,5 %).

Zelllinie SKOV-3 exemplarisch dargestellt. Im Vergleich zu Kontrolle (PBS), bei der nur eine geringe Spontanapoptoserate vorhanden ist (19,1 %), ist die Apoptoserate in den mit Antagonisten behandelten Zellen stark erhöht (SKOV-3: Ant-1: 49,7 %; Ant-2: 33,5 %; Ant-3: 40,5 %).

Die Apoptoseinduktion wurde anschließend dosisabhängig quantifiziert. Nachdem die Endometriumzelllinie Ishikawa, die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 und die Mammakarzinomzelllinie T47D jeweils für 72 h mit den entsprechenden GnRH-II Antagonisten in Medium 1 inkubiert wurden ( $10^{-5}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-11}$  M), erfolgte die Behandlung der Zellen o/n mit Nicoletti-Lösung. Der DNA-Gehalt wurde ebenfalls mittels FACS-Analyse quantifiziert. Abbildung 4.5 stellt die Induktion der Apoptose in den Zelllinien SKOV-3 (A) und Ishikawa (B) graphisch dar. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Mammakarzinomzelllinie T47D erzielt. Es wird deutlich, dass Apoptose dosisabhängig und schon im nanomolaren Bereich induziert werden kann, was die Reduktion der Zellzahl begründet. (SKOV-3  $10^{-5}$  M:  $157,3 \pm 29,57$  % ( $P < 0,05$ ),  $10^{-7}$  M:  $133,5 \pm 17,31$  % (n.s.),  $10^{-9}$  M:  $101,0 \pm 5,56$  % (n.s.),  $10^{-11}$  M:



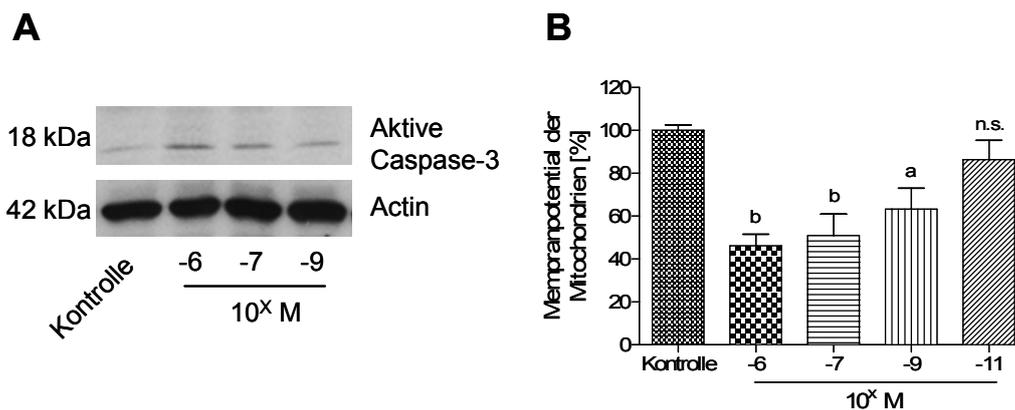
**Abb. 4.5: GnRH-II Antagonisten-induzierte Apoptose in der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 (A) und der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa (B).** Die Inkubation erfolgte dosisabhängig für 72 h und der Apoptosenachweis erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Induktion von Apoptose konnte dosisabhängig nachgewiesen werden. a,  $P < 0,05$  vs. Kontrolle; b,  $P < 0,01$  zur Kontrolle; n.s., nicht signifikant.

84,99 ± 16,00 % (n.s.); Ishikawa 10<sup>-5</sup> M: 211,2 ± 34,31 % ( $P < 0,01$ ), 10<sup>-7</sup> M: 165,6 ± 21,51 % (n.s.), 10<sup>-9</sup> M: 126,5 ± 13,07 % (n.s.), 10<sup>-11</sup> M: 106,2 ± 19,83 % (n.s.); T47D 10<sup>-7</sup> M: 126,1 ± 7,81 % ( $P < 0,05$ ), 10<sup>-9</sup> M: 114,3 ± 0,93 % (n.s.), 10<sup>-11</sup> M: 89,77 ± 15,22 % (n.s.).

#### 4.2.2.3 AKTIVIERUNG DER CASPASE-3

Bei der Apoptose wird die Effektor-Caspase (*cysteine-containing aspartate-specific proteinase*) Caspase-3 sowohl über den intrinsischen (mitochondriale Signalkaskade) als auch über den extrinsischen (Todesrezeptor Signalkaskade) Weg induziert. Die Aktivierung erfolgt über die Initiator-Caspasen des jeweiligen Signalwegs (Kumar, 2007).

Um die Daten der DNA-Quantifizierung zu verifizieren und um nekrotische Ereignisse auszuschließen wurde die Aktivität der Caspase-3 mittels Western Blot analysiert. Unter Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch für die aktive Caspase-3 ist, wurden die Zelllinien Hec-1A, NiH:OVCAR-3 und T47D nach 72 h Stimulation mit dem GnRH-II Antagonisten Ant-3 auf ihre Antigenität gegenüber aktiver Caspase-3 getestet. Es konnte eine dosisabhängige



**Abb. 4.6: Induktion von Apoptose in der Ovarialkarzinomzelllinie NiH:OVCAR-3.** Die Inkubation erfolgte jeweils für 72 h mit PBS (Kontrolle) und dosisabhängig mit dem GnRH-II Antagonisten Ant-3. A, Die Detektion der aktiven Caspase-3 erfolgte im Western Blot und konnte dosisabhängig nachgewiesen werden. B, die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials erfolgte mittels JC-1 Mitochondrial Membran Potential Detection Kit im Multidetektion Reader. Der Verlust des Potentials erfolgte dosisabhängig. a,  $P < 0,05$  vs. Kontrolle; b,  $P < 0,01$  vs. Kontrolle; n.s., nicht signifikant.

Aktivierung der Caspase-3 (18 kDa) und somit die Induktion von Apoptose bestätigt werden (Abb 4.6 A) (NiH:OVCAR-3:  $10^{-6}$  M:  $369,54 \pm 19,87$  % ( $P < 0,001$ ),  $10^{-7}$  M:  $264,17 \pm 15,16$  % ( $P < 0,001$ ),  $10^{-9}$  M:  $192,55 \pm 8,05$  % ( $P < 0,001$ ). In allen verwendeten Zelllinien konnte die Caspase-3 durch Behandlung mit GnRH-II Antagonisten induziert werden. Die Versuche wurden in drei unabhängigen Experimenten in drei verschiedenen Passagen wiederholt.

#### 4.2.2.4 BEEINFLUSSUNG DES MITOCHONDRIALEN MEMBRANPOTENTIALS

Der intrinsische Signalweg der Apoptoseinduktion wird in Vertebraten vorrangig durch den schnellen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) verursacht, was zu einer Freisetzung von Cytochrome C und anderen proapoptotischen Proteinen führt (Goldstein et al., 2000). Der intrinsische Signalweg (syn. Typ II Apoptose) wird durch oxidativen und zellulärer Stress, chemische Stoffe, Umweltgifte oder Strahlung induziert und soll daher als Fokus für die Ursachen der durch GnRH-II Antagonisten induzierten Apoptose gesehen werden.

Daher wurde der Verlust des Membranpotentials unter Verwendung des JC-1 Mitochondrial Membran Detection Kits in der Ovarialkarzinomzelllinie NiH:OVCAR-3 analysiert. Die Inkubation der Zellen mit den GnRH-II

Antagonisten erfolgte dosisabhängig ( $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-11}$  M) für 24 h. Abbildung 4.6 B zeigt, dass der Verlust des Membranpotentials durch die Stimulation induziert werden konnte (NiH:OVCAR-3:  $10^{-6}$  M:  $46,16 \pm 5,37$  % ( $P < 0,01$ );  $10^{-7}$  M:  $50,98 \pm 10,01$  % ( $P < 0,01$ );  $10^{-9}$  M:  $63,27 \pm 9,79$  % ( $P < 0,05$ );  $10^{-11}$  M:  $86,40 \pm 8,98$  % (n.s.)). Die Effekte werden ebenfalls dosisabhängig induziert und decken sich mit denen der DNA-Quantifizierung.

Die Vermittlung der Apoptose durch GnRH-II Antagonisten findet demzufolge über die Induktion des intrinsischen Signalwegs der Mitochondrien statt, was zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führt.

## **4.3 EFFEKTE VON GNRH-II ANTAGONISTEN *IN VIVO***

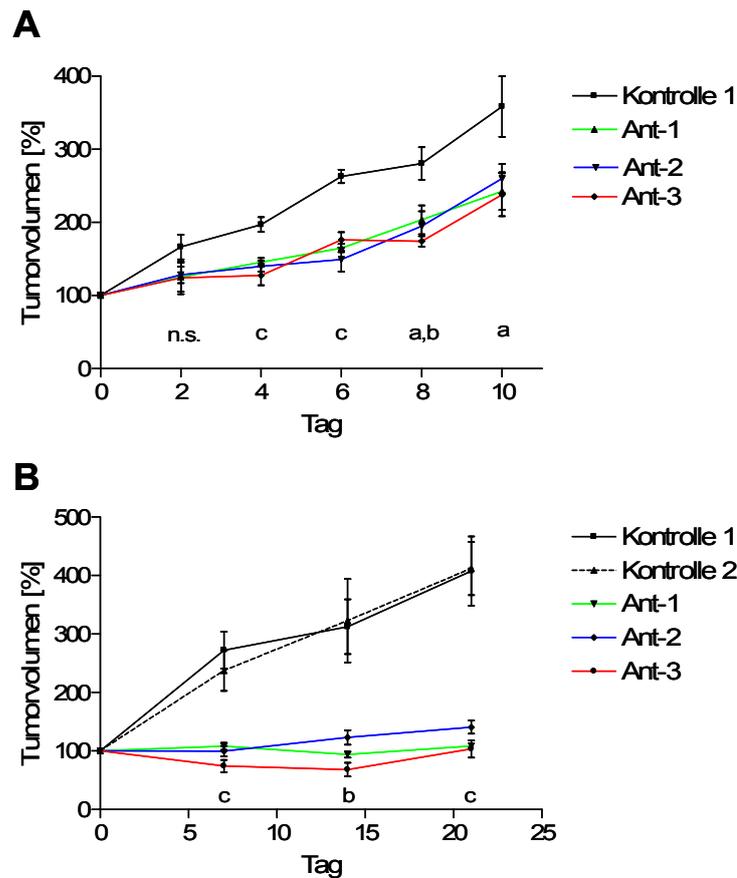
### **4.3.1 EFFEKTE AUF DAS TUMORWACHSTUM IM NACKTMAUSMODELL**

Um den *in vivo*-Nachweis der antitumoralen Wirkung der GnRH-II Antagonisten zu erbringen, wurden weibliche Nacktmäuse, xenotransplantiert mit Tumoren verschiedener gynäkologischer Karzinomzelllinien, mit GnRH-II Antagonisten therapiert.

#### **4.3.1.1 OVARIALKARZINOM**

Die *in vivo* Wirkung der GnRH-II Antagonisten auf Ovarialkarzinome wurde mit der Zelllinie NiH:OVCAR-3 analysiert (Versuch 1). Nach dem Anwachsen der Tumoren (ca.  $100 \text{ mm}^3$ ) auf dem Rücken, wurden die Nacktmäuse für zehn Tage täglich ohne (Kontrolle) oder mit 25 nmol des jeweiligen GnRH-II Antagonisten behandelt. Das Tumorstadium wurde alle zwei Tage mit einer Schieblehre verfolgt und der Verlauf dokumentiert. Nach der Sektion der Tiere wurden die Tumoren präpariert, ein Teil in flüssigem Stickstoff schock gefroren und ein weiterer Teil in Paraffin eingebettet. Außerdem wurden die Uteri der Nacktmäuse präpariert (4.3.3.1).

Die Zunahme des Tumorstadiums in den behandelten Gruppen war nach Beendigung des Versuchs im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert (Abb. 4.7 A). Ab Tag vier der Therapie ist das Tumorstadium bei den



**Abb. 4.7: Verlauf des Tumorstadiums in xenotransplantierten Nacktmäusen.** Die Mäuse wurden ohne (Kontrolle 1) oder mit 25 nmol Triptorelin (Kontrolle 2) und 25 nmol der GnRH-II Antagonisten (Ant-1, Ant-2, Ant-3) behandelt. A, Tumorstadiumsverlauf von NiH:OVCAR-3. Die Behandlung erfolgte täglich i.p. und die Tiere waren in Gruppen von fünf Mäusen eingeteilt. B, Tumorstadiumsverlauf von Hec-1B. Die Behandlung erfolgte alle zwei Tage i.p. und die Tiere waren in Gruppen von fünf Mäusen eingeteilt. a,  $P < 0,05$  vs. Kontrolle 1; b,  $P < 0,01$  vs. Kontrolle 1; c,  $P < 0,001$  vs. Kontrolle 1; n.s., nicht signifikant.

Mäusen, die mit GnRH-II Antagonisten behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrolle hoch signifikant inhibiert (Kontrolle:  $203,4 \pm 10,23$  %; Ant-1:  $145,5 \pm 5,86$  % ( $P < 0,001$ ); Ant-2:  $139,9 \pm 7,17$  % ( $P < 0,001$ ); Ant-3:  $119,3 \pm 13,05$  % ( $P < 0,001$ )). Am zehnten Tag der Therapie ist das Tumorstadium der behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrolle aufgrund der hohen Abweichungen in der Kontrollgruppe nicht mehr signifikant gehemmt. (Kontrolle:  $358,5 \pm 41,42$  %; Ant-1:  $242,7 \pm 25,73$  %; Ant-2:  $259,9 \pm 19,96$  %; Ant-3:  $238,0 \pm 29,33$  %). Durch die Behandlung mit GnRH-II Antagonisten kann in diesem Tumormodell mit NiH:OVCAR-3 Ovarialkarzinomzellen über einen Zeitraum von

zehn Tagen das Wachstum der Tumoren inhibiert werden und die Größe der Tumoren nimmt im Gegensatz zur Kontrolle nicht so schnell zu. Die Wirkung der GnRH-II Antagonisten ist untereinander vergleichbar, da die Tumoren annähernd gleichmäßig wachsen. Bei den Nacktmäusen wurden während der endokrinen Therapie keine sichtbaren Nebenwirkungen beobachtet.

#### 4.3.1.2 ENDOMETRIUMKARZINOM

Die Subzelllinie Hec-1B zeichnet sich im Vergleich zur Endometriumkarzinomzelllinie Hec-1A durch sehr gute Anwachsrate *in vivo* aus und wurde daher für dieses Tumormodell verwendet (Versuch 2).

Nach dem Anwachsen der Tumoren auf dem Rücken der Nacktmäuse wurde mit der Therapie ohne (Kontrolle) oder mit 25 nmol der GnRH-II Antagonisten begonnen. Als zusätzliche Kontrolle wurde der GnRH-I Agonist Triptorelin (25 nmol) eingesetzt (Kontrolle 2), um eine antitumorale Wirkung über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse auszuschließen. Die Tiere wurden alle zwei Tage mit den GnRH Analoga behandelt und das Tumorstadium wurde wöchentlich verfolgt und dokumentiert. Nach drei Wochen erfolgte die Sektion der Nacktmäuse und die Tumoren wurden präpariert. Zusätzlich wurde das Herz zur Gewinnung des arteriellen Blutes punktiert, aus dem anschließend das Serum gewonnen wurde.

Nach sieben Tagen Therapie ist das Tumorstadium im Vergleich zu den Kontrollen bereits hoch signifikant inhibiert (Kontrolle 1:  $272,4 \pm 31,31$  %; Kontrolle 2:  $237,1 \pm 34,49$  % (n.s.); Ant-1:  $108,0 \pm 5,99$  % ( $P < 0,001$ ); Ant-2:  $99,63 \pm 9,09$  % ( $P < 0,001$ ); Ant-3:  $74,31 \pm 10,32$  % ( $P < 0,001$ )). Allerdings wäre auch hier aufgrund des Tumorstadiums der mit GnRH-II Antagonisten behandelten Nacktmäuse im Vergleich zur Kontrolle, bereits nach vier Tagen eine Signifikanz zu verzeichnen gewesen. Die Messung erfolgt in diesem Tierversuch jedoch einmal pro Woche. Die Zunahme des Tumorstadiums in den mit GnRH-II Antagonisten behandelten Mäusen war nach Beendigung des Versuchs im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls hoch signifikant reduziert (Abb.4.7 B) (Kontrolle 1:  $407,6 \pm 59,43$  %; Kontrolle 2:  $411,7 \pm 45,38$  % (n.s.); Ant-1:  $108,7 \pm 4,45$  % ( $P < 0,001$ ); Ant-2:  $140,5 \pm 11,18$  % ( $P < 0,001$ ); Ant-3:

103,3 ± 14,81 % (P<0,001)). Das Tumolvolumen ist nach einer dreiwöchigen Therapie mit GnRH-II Antagonisten annähernd so groß wie zu Beginn der Therapie. Die Größe der Tumoren hat sich über den Verlauf kaum verändert und das Wachstum ist stagniert, während das Tumolvolumen der Kontrollgruppen um das vierfache zugenommen hat. Die Wirkung der GnRH-II Antagonisten untereinander ist vergleichbar, da es bei allen Tumoren zu einer etwa gleich starken Inhibition des Wachstums kam.

Um auszuschließen, dass die antitumorale Wirkung der GnRH-II Antagonisten über die GnRH Rezeptoren der Hypophyse vermittelt werden, was in einer Blockade der Östrogensynthese resultiert, wurde eine weitere Kontrollgruppe mit Triptorelin behandelt (Kontrolle 2). Bei den hormonabhängigen Tumoren konnte keine Inhibition des Wachstums durch Triptorelin im Vergleich zur unbehandelten Gruppe verzeichnet werden. Das Tumolvolumen entsprach ungefähr dem der Kontrollgruppe eins.

Während der Therapie wurden bei keinem der behandelten Tiere Nebenwirkungen beobachtet.

#### **4.3.1.3 MAMMAKARZINOM**

Die antitumorale Wirkung der GnRH-II Antagonisten auf Mammakarzinome wurde mit den Zelllinien MCF-7 (Versuch 3) und MDA-MB-435 (Versuch 4) untersucht. MCF7 zeichnet sich durch schlechtere Anwachsrate *in vivo* aus und muss in Kombination mit Matrigel gespritzt werden. MDA-MB-435 ist im Gegensatz dazu eine sehr aggressiv und schnell wachsende Zelllinie, die mit der eher langsam wachsende MCF7 verglichen werden soll.

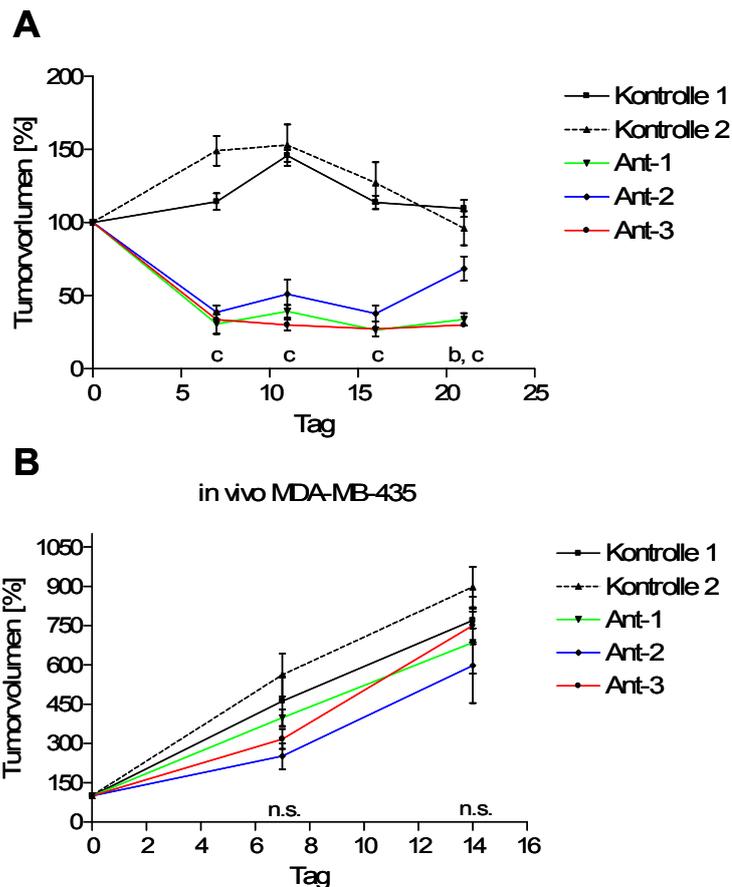
Nachdem die Tumoren angewachsen waren, wurden die Tiere alle zwei Tage ohne (Kontrolle 1) oder mit GnRH-II Antagonisten (25 nmol) behandelt. Als zusätzliche Kontrolle wurde diesmal ein GnRH-II Agonist [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II verwendet (25 nmol, Kontrolle 2), um eine antitumorale Wirkung der GnRH-II Antagonisten durch Blockade der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse auszuschließen. Das Tumolvolumen wurde wöchentlich ermittelt und dokumentiert. Der Versuch mit den MCF-7 Xenotransplantaten wurde nach drei Wochen beendet, während der Versuch mit den MDA-MB-435

Xenotransplantaten bereits nach zwei Wochen beendet wurde. Nach der Sektion der Nacktmäuse wurden die Tumoren präpariert.

In Versuch (3) war das Tumorwachstum der mit GnRH-II Antagonisten behandelten Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren bereits nach sieben Tagen hoch signifikant gehemmt (Kontrolle 1:  $114,3 \pm 5,68$  %; Kontrolle 2:  $149,1 \pm 10,14$  % ( $P < 0,01$ ); Ant-1:  $30,57 \pm 6,64$  % ( $P < 0,001$ ); Ant-2:  $38,63 \pm 4,64$  % ( $P < 0,001$ ); Ant-3:  $33,52 \pm 9,81$  % ( $P < 0,001$ )). Die Tumoren der mit GnRH-II Antagonisten behandelten Tiere sind bedeutend kleiner geworden und das Volumen war ungefähr auf eine Drittel der Ausgangsgröße reduziert. Der GnRH-II Agonist [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II hatte keinerlei Effekte auf das Volumen der Tumoren und ist mit der unbehandelten Kontrollgruppe vergleichbar.

Nach Abschluss der dreiwöchigen Therapie war das Tumolvolumen im Vergleich zu den Kontrollen immer noch signifikant reduziert (Abb. 4.8 A) (Kontrolle 1:  $109,6 \pm 5,76$  %; Kontrolle 2:  $96,10 \pm 11,7$  % (n.s.); Ant-1:  $33,77 \pm 4,38$  % ( $P < 0,001$ ); Ant-2:  $68,43 \pm 8,35$  % ( $P < 0,01$ ); Ant-3:  $29,93 \pm 1,60$  % ( $P < 0,001$ )). Allerdings sind auch die Kontrolltumoren der unbehandelten (Kontrolle 1) und mit [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II behandelten Tiere (Kontrolle 2) nach einem anfänglichen Wachstumsschub nach ungefähr elf Tagen kleiner geworden und scheinen weiterhin stetig an Volumen zu verlieren. Daraufhin wurde der Versuch beendet.

In Versuch (4) war das Tumolvolumen nach sieben Tagen nur in der mit GnRH-II Antagonist Ant-2 behandelten Gruppe im Vergleich zu Kontrolle 2 signifikant gehemmt. Alle anderen Tumoren zeigten zwar ein reduziertes Tumorwachstum im Vergleich zu den Kontrollen, allerdings waren diese Werte nicht signifikant (Abb. 4.8 B) (Kontrolle 1:  $461,6 \pm 95,06$  %; Kontrolle 2:  $561,7 \pm 82,26$  % (n.s.); Ant-1:  $398,2 \pm 32,06$  (n.s.); Ant-2:  $251,3 \pm 48,81$  % ( $P < 0,05$  vs. Kontrolle 2); Ant-3:  $317,1 \pm 37,91$  % (n.s.)). Diese Inhibition hob sich jedoch wieder auf. Nach 14 Tagen konnte keine signifikante Hemmung mehr nachgewiesen werden (Kontrolle 1:  $769,5 \pm 90,61$  %; Kontrolle 2:  $896,8 \pm 76,77$  % (n.s.); Ant-1:  $685,1 \pm 118,4$  % (n.s.); Ant-2:  $596,8 \pm 142,9$  % (n.s.); Ant-3:  $750,0 \pm 64,24$  % (n.s.)). Das aggressive Wachstum der Zellen und die Volumenzunahme der Tumoren führten zu Ausschlusskriterien und der Versuch



**Abb. 4.8: Verlauf des Tumorvolumens in xenotransplantierten Nacktmäusen.** Die Mäuse wurden ohne (Kontrolle 1) oder mit 25 nmol [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II (Kontrolle 2) und 25 nmol der GnRH-II Antagonisten (Ant-1, Ant-2, Ant-3) behandelt. Die Behandlung erfolgte alle zwei Tage und die Tiere waren in Gruppen von fünf Mäusen eingeteilt. A, Tumorvolumenverlauf von MCF7. B, Tumorvolumenverlauf von MDA-MB-435. a,  $P < 0,05$  vs. Kontrolle 1; b,  $P < 0,01$  vs. Kontrolle 1; c,  $P < 0,001$  vs. Kontrolle 1; n.s., nicht signifikant.

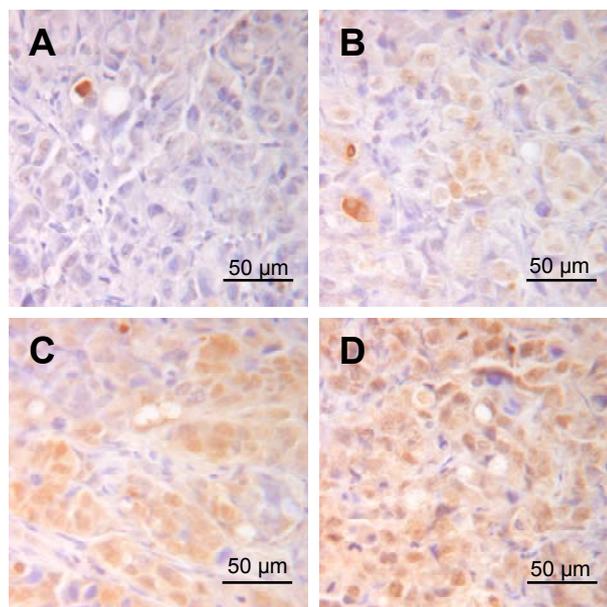
wurde beendet, da die GnRH-II Antagonisten auch keine Effekte auf die Zelllinie MDA-MB-435 zeigten.

Mit dem GnRH-II Agonisten [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II konnte in beiden Versuchen keine antitumorale Wirkung nachgewiesen werden. Das Tumorvolumen dieser Kontrollgruppe war annähernd so groß wie das der unbehandelten Kontrolltiere und das Wachstum der Tumoren war in beiden Versuchen sogar leicht erhöht, jedoch nicht signifikant. Nebenwirkungen während der endokrinen Therapie wurden in beiden Versuchen nicht beobachtet.

### 4.3.2 INDUKTION VON APOPTOSE *IN VIVO*

Um zu zeigen, dass GnRH-II Antagonisten auch *in vivo* in den Xenotransplantaten der Nacktmäuse Apoptose induzieren, wurde ein TUNEL Assay an Paraffinschnitten der präparierten Tumoren durchgeführt. Beim TUNEL Assay werden die freien 3'-OH-Enden der DNA mit dem Enzym Terminal-Deoxynucleotidyl-Transferase markiert. Diese können dann mittels Immunoperoxidase-Färbung detektiert und somit apoptotische Kerne sichtbar gemacht werden (Schmitz et al., 1991).

In Tumoren von Nacktmäusen, die mit GnRH-II Antagonisten behandelt wurden, ist die Anzahl der apoptotischen Zellkerne im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren erhöht. In Abbildung 4.9. ist der TUNEL-Assay exemplarisch für die Apoptoseinduktion *in vivo* in der Ovariakarzinomzelllinie NiH:OVCAR-3 dargestellt. Die stärkste Braun-Färbung wurde in Tumoren verzeichnet, die mit dem GnRH-II Antagonisten Ant-3 behandelt wurden. Aus Versuch (4), MDA-MB-435, gewonnene Paraffinschnitte und deren TUNEL-Assay ergab keine spezifische Braunfärbung der apoptotischen Nuklei, was mit dem Versuchsablauf korreliert.



**Abb. 4.9: TUNEL-Assay zum Nachweis apoptotischer Zellen in Tumoren von NiH:OVCAR-3, gewachsen *in vivo*.** Die Kontrollgruppe (A) zeigt nur wenige apoptotische Zellkerne im Vergleich zu Paraffinschnitten von mit GnRH-II Antagonisten behandelten Tieren (B: Ant-1; C: Ant-2; D: Ant-3). Skala 50 µm.

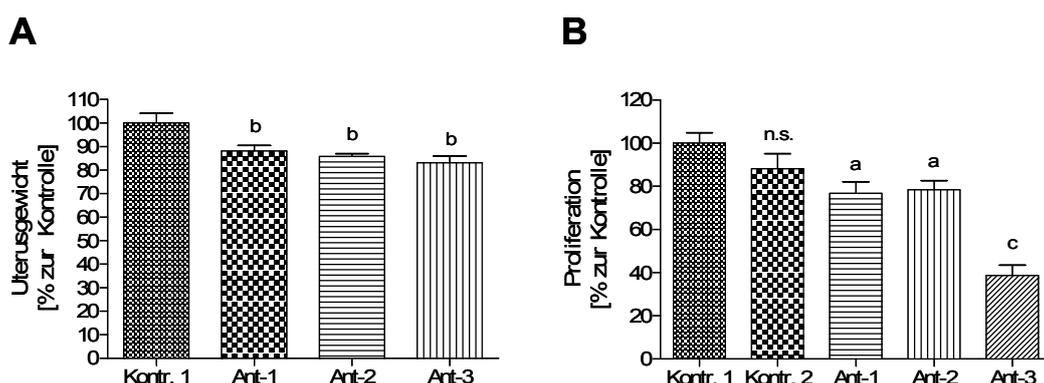
Es konnte gezeigt werden, dass GnRH-II Antagonisten Apoptose auch in xenotransplantierten, gynäkologischen Karzinomen von Nacktmäusen induzieren. Eine Ausnahme stellt die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435 dar, in deren Xenotransplantaten keine Apoptose nachweisbar war.

### 4.3.3 WIRKUNG DER GNRH-II ANTAGONISTEN ÜBER DIE HYPOPHYSE

#### 4.3.3.1 UTERUS-OVARIALGEWICHT DER NACKTMÄUSE

Das Uterus-Ovarialgewicht gilt als Parameter für die Wirkung über die Hypothalamus-Hypophyse-Ovarien-Achse, da verminderte Östrogenspiegel zu einer Verkleinerung dieser Organe führen (Lan and Katzenellenbogen, 1976). Zur Kontrolle, ob die i.p. verabreichten GnRH-II Antagonisten in den Nacktmäusen auch über die Rezeptoren der Hypophyse wirksam sind, wurden der Uterus und die Ovarien der Nacktmäuse aus Versuch (1) entnommen und deren Gewicht mit der Analysenwaage bestimmt.

Es zeigte sich, dass das Uterus-Ovarialgewicht in den mit GnRH-II Antagonisten behandelten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (Kontrolle 1) signifikant reduziert war (Abb. 4.10 A). Die Effekte der applizierten Hormone auf das Uterus-Ovarialgewicht waren auch makroskopisch zu



**Abb. 4.10: Indirekte Wirkung der GnRH-II Antagonisten über die Hypophyse.** A, Bestimmung des Uterus-Ovarialgewichts von xenotransplantierten Nacktmäusen (Hec-1B). Das Gewicht der Uteri von mit GnRH-II Antagonisten behandelten Nacktmäusen ist im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. B, E-Screen Assay zur Bestimmung der östrogenen Aktivität der murinen Seren. Untersucht wurde das Proliferationsverhalten von MCF7 Mammakarzinomzellen. a,  $P < 0,05$  vs. Kontrolle 1; b,  $P < 0,01$  vs. Kontrolle 1; c,  $P < 0,001$  vs. Kontrolle 1; n.s., nicht signifikant.

erkennen, da die Uteri im Vergleich zur Kontrolle etwas schmaler ausgebildet waren. Die GnRH-II Antagonisten konnten eine Reduktion des Uterus-Ovarialgewichts im Vergleich zu den Kontrolltieruteri um bis zu 20 % hervorrufen. (Ant-1:  $88,08 \pm 2,34$  % ( $P < 0,01$ ), Ant-2:  $85,79 \pm 1,12$  % ( $P < 0,01$ ), Ant-3  $82,97 \pm 2,98$  % ( $P < 0,01$ ). Es konnte folglich zusätzlich zur direkten antitumoralen Wirkung, eine Wirkung über die membranständigen GnRH Rezeptoren der Hypophyse nachgewiesen werden.

#### **4.3.3.2 MAUS-SERUMABHÄNGIGE PROLIFERATION *IN VITRO***

Das aus Versuch (2) gewonnene Serum der Nacktmäuse wurde in einen *in vitro* Östradiol-Screen Assay (E-Screen Assay) als Wachstumsfaktor im Kulturmedium anstelle von FCS eingesetzt, bei dem humane MCF-7 Mammakarzinomzellen serumabhängig proliferieren (Soto et al., 1992). Das im Serum enthaltene Östrogen stellt wiederum einen Marker für die Wirkung der GnRH-II Antagonisten über die Rezeptoren der Hypophyse dar, da die Applikation von GnRH-II die Bildung von Östrogen hemmt. Ein vermindertes Wachstum *in vitro* lässt somit auf einen reduzierten Östrogenspiegel im Serum schließen.

Nach Inkubation der MCF7 Zellen mit Kulturmedium, das das Serum der Nacktmäuse enthält, konnte gezeigt werden, dass die Seren der mit GnRH-II Antagonisten behandelten Nacktmäuse die Proliferation der Mammakarzinomzellen signifikant hemmen (Abb. 4.10 B). Das Mausserum der Tiere, die mit dem GnRH-II Antagonisten Ant-3 behandelt wurden, hat die stärkste antiproliferative Wirkung ( $38,66 \pm 4,75$  % ( $P < 0,01$ )), im Gegensatz zu den Seren, der mit den Antagonisten Ant-1 und Ant-2 behandelten Tiere (Ant-1:  $76,71 \pm 5,46$  % ( $P < 0,05$ ); Ant-2:  $78,40 \pm 4,22$  % ( $P < 0,05$ )). Triptorelin (Kontrolle 2) konnte das Wachstum der Mammakarzinomzellen nicht signifikant inhibieren ( $88,15 \pm 6,97$  % (n.s.)).

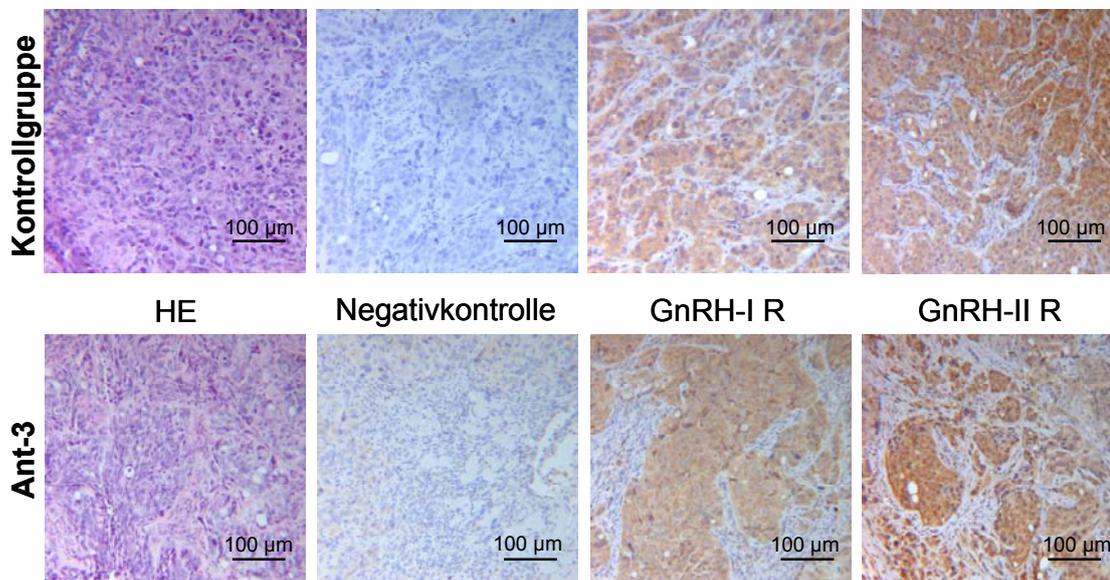
Auch hier wirken GnRH-II Antagonisten, zusätzlich zur direkten antitumoralen Wirkung, über die GnRH Rezeptoren der Hypophyse und hemmen die Synthese von LH und FSH, was zu einer Reduktion der Östrogenproduktion durch negative Rückkopplung führt. Das Absenken des Östrogenspiegels im

Serum ist sogar noch stärker ausgeprägt, als durch die Therapie mit dem GnRH-I Agonisten Triptorelin. Die Seren Triptorelin-behandelter Nacktmäuse konnten das Wachstum geringfügig hemmen, allerdings waren die Daten nicht signifikant.

#### 4.3.4 WACHSTUMSFAKTOR-REZEPTOREXPRESSSION IN DEN TUMOREN NACH BEHANDLUNG MIT GNRH-II ANTAGONISTEN

Nach Beendigung der Tierversuche wurden alle Tumoren präpariert, wobei eine Tumorthälfte jeweils in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde, während die andere Hälfte in Paraffin eingebettet wurde. Von den in Paraffin eingebetteten Tumoren wurden Serienschnitte (4  $\mu\text{m}$ ) angefertigt und diese wurden auf verschiedene Wachstumsfaktor-Rezeptoren immunhistologisch untersucht.

Da es bei einer kontinuierlichen Applikation von GnRH-I Analoga in der Hypophyse zur Desensibilisierung und Downregulation der GnRH Rezeptoren



**Abb. 4.11: Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten gewonnen aus Tumoren von Hec-1B, gewachsen *in vivo*.** Die Expression der GnRH Rezeptoren ist in Tumoren von mit GnRH-II Antagonisten behandelten Mäusen unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Skala 100  $\mu\text{m}$ .

Tab. 4.1: Statistische Analyse der Wachstumsfaktorexpression auf mRNA-Ebene in Tumoren von NiH:OVCA3, n.s.

Gen	Ant-1	Ant-2	Ant-3
GnRH-I R	92,54 ± 15,06 %	96,43 ± 15,56 %	118,3 ± 27,54 %
GnRH-II R	97,21 ± 8,05 %	94,64 ± 7,19 %	103,8 ± 11,76 %
EGF-1 R	108,9 ± 15,83 %	122,6 ± 18,74 %	130,2 ± 26,44 %
IGF-1β R	104,2 ± 14,61 %	118,6 ± 14,40 %	160,3 ± 20,68 %
cerb-B2	120,5 ± 9,68 %	90,69 ± 11,93 %	128,0 ± 19,07 %

Tab. 4.2: Statistische Analyse der Wachstumsfaktorexpression auf mRNA-Ebene in Tumoren von Hec-1B, n.s.

Gen	Kontrolle 2	Ant-1	Ant-2	Ant-3
GnRH-I R	111,2 ± 17,30 %	124,8 ± 30,62 %	93,98 ± 22,64 %	131,5 ± 15,90 %
GnRH-II R	102,9 ± 5,25 %	93,15 ± 12,07 %	112,6 ± 6,26 %	98,73 ± 7,04 %
EGF-1 R	89,60 ± 9,27 %	94,72 ± 8,81 %	111,3 ± 13,69 %	108,9 ± 10,78 %
IGF-1β R	133,1 ± 22,42 %	57,74 ± 4,65 %	115,7 ± 15,87 %	158,5 ± 23,46 %
cerb-B2	93,94 ± 11,18 %	104,3 ± 12,68 %	105,1 ± 9,73 %	124,9 ± 7,06 %

kommt, sollte die Expression der relevanten Wachstumsfaktor-Rezeptoren im Tumor nach Beendigung der Therapie untersucht werden.

Die Expressionsdichte wurde für folgende Rezeptoren bestimmt: EGF-1 Rezeptor, GnRH-I Rezeptor, GnRH-II Rezeptor, cerb-B2 und IGF-1β-Rezeptor. Außerdem wurde die mRNA aus den schockgefrorenen Tumorkhälften präpariert und mittels RT-PCR auf dieselben Rezeptoren hin untersucht. Als *housekeeping*-Gen wurde das ribosomale Protein L7 verwendet. Die PCR wurde für jedes Gen und jeden Tumor zehnmal durchgeführt.

Die Dichte der Rezeptoren wurde auf RNA und Protein-Ebene in allen Tumoren untersucht. Es konnte jedoch für keinen der Rezeptoren, nach der Behandlung der xenotransplantierten Nacktmäuse mit GnRH-II Antagonisten, ein Unterschied in der Expressionsdichte im Vergleich zu den Kontrolltumoren gefunden werden. Abbildung 4.11 stellt die Expression der GnRH Rezeptoren in auf GnRH-I und GnRH-II Rezeptor immunhistologisch gefärbten Paraffinschnitten exemplarisch dar. Die Braunfärbung in den gefärbten Paraffinschnitten war überall vergleichbar intensiv. Es konnten für keinen der

Wachstumsfaktor-Rezeptoren Änderungen in der Expressionsdichte detektiert werden. Die Auswertung erfolgte rein qualitativ, nicht quantitativ. Zur semiquantitativen Analyse wurden die Ergebnisse der RT-PCR herangezogen. Allerdings konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede in der Rezeptorexpression in Versuch (1) (Tab. 4.1) sowie in Versuch (2) (Tab. 4.2) im Vergleich zur Kontrolle der unbehandelten Tiere (100 %) ermittelt werden.

## 4.4 INTERAKTION MIT DER SIGNALTRANSDUKTION GYNÄKOLOGISCHER KARZINOMZELLINIEN

### 4.4.1 GNRH-II REZEPTORVERTEILUNG IM MENSCHEN

Für eine Rezeptor-vermittelte, endokrine Antitumorthérapie sind die Expression des Rezeptors und dessen Verteilung im menschlichen Körper von großer

Tab. 4.3: GnRH-II Rezeptor Expression im menschlichen Körper

Nicht reproduktive Organe		Organe des Reproduktionstrakts	
Blase	+	Endometrium	+++
Brust	++	Hoden	+
Darm	+	Myometrium	+++
Gallenblase	-	Ovar	+++
Gehirn	++	Plazenta	+++
Haut	-	Prostata	++
Leber	+	Zervix	+
Lunge	+		
Lymphknoten	-		
Magen	+		
Niere	+	Tumoren	
Ösophagus	+	Endometrium	++++
Pankreas	+	Malignes Melanom	++++
Schilddrüse	+	Mammakarzinom	+++
Skelettmuskel	+	Ovarialkarzinom	++++
Speicheldrüse	++	Prostatakarzinom	+++

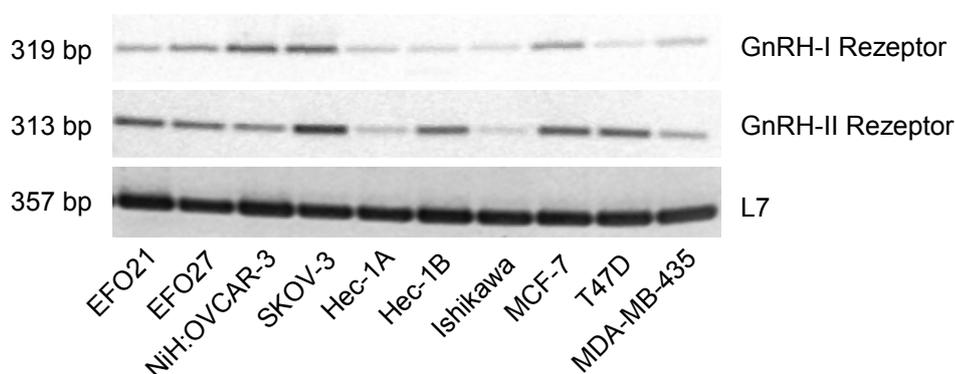
Bedeutung. Daher wurde ein Tissue-Array durchgeführt und Stenzen aus menschlichen Geweben, aufgebracht auf einem Objektträger, mit einem GnRH-II Rezeptor Antiserum immunhistologisch gefärbt und analysiert. Eine Analyse auf RNA-Ebene wurde bereits von Neill *et al.* durchgeführt (Neill, 2002a) und soll nun auf Protein-Ebene verifiziert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass der GnRH-II Rezeptor in nicht-reproduktiven Organen schwach bis sehr schwach exprimiert ist. In Gallenblase, Haut und Lymphknoten konnte er gar nicht detektiert werden. In reproduktiven Organen und Tumoren dieser konnte eine starke bis sehr starke Expression nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Die Auswertung erfolgte rein qualitativ. Die Farbintensität würde in fünf Stufen eingeteilt. (Einteilung: (-) keine, (+) schwache, (++) mittlere, (+++) starke, (++++) sehr starke Expression). Als Positivkontrolle diente Ovar des Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) (++++).

#### 4.4.2 GNRH REZEPTOR EXPRESSION IN GYNÄKOLOGISCHEN KARZINOMZELLINIEN

Für einen Überblick über die GnRH Rezeptor-Verteilung in den in dieser Arbeit verwendeten gynäkologischen Karzinomzelllinien wurde die Expression der Rezeptoren mittels RT-PCR (Abb. 4.12) und Western Blot analysiert.

In den Ovarialkarzinomzelllinien EFO21, EFO27, NiH:OVCAR-3 und SKOV-3



**Abb. 4.12: GnRH-I und -II Rezeptor-Expression in gynäkologischen Karzinomzelllinien.**

Die stärkste Expression beider Rezeptoren ist in der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 zu detektieren. In der Endometriumzelllinie Hec-1B ist nur der GnRH-II Rezeptor stark exprimiert. Bei den Mammakarzinomzelllinien sind beide Rezeptoren am stärksten in MCF-7 exprimiert. Als Kontrolle diente das ribosomale Protein L7.

sind beide Rezeptoren exprimiert. Allerdings ist in EFO21 der GnRH-I R im Vergleich zum GnRH-II R schwächer exprimiert. In EFO27 und SKOV-3 ist das Verhältnis eher ausgeglichen während in NiH:OVCA-3 die GnRH-I R-Expression dominiert.

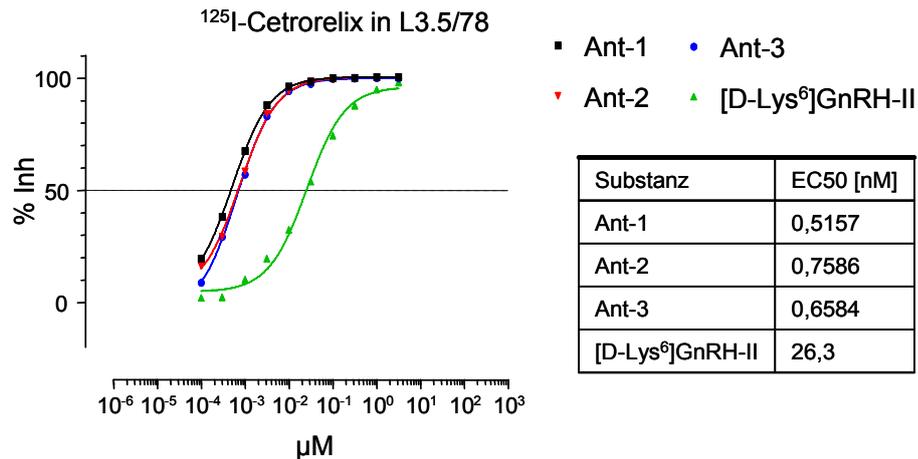
In den Endometriumzelllinien Hec-1A, Hec-1B und Ishikawa ist der GnRH-I R sehr schwach exprimiert. Während in Hec-1B der GnRH-II Rezeptor stark exprimiert wird, konnte dieser in Hec-1A und Ishikawa nur schwach nachgewiesen werden. In den Mammakarzinomzelllinien MCF-7, T47D und MDA-MB-435 werden ebenfalls beide Rezeptoren exprimiert. In MCF7 werden der GnRH-I R und der GnRH-II R ungefähr gleich stark exprimiert, während in T47D der GnRH-II R im Vergleich zum GnRH-I R dominant exprimiert wird. In MDA-MB-435 sind beide Rezeptoren, ähnlich zu Hec-1A und Ishikawa, nur schwach exprimiert.

Die Proteinexpression der GnRH-Rezeptoren wurde mittels Western Blot analysiert. Auch hier konnten in allen verwendeten Zelllinien Rezeptoren für GnRH-I und -II detektiert werden. Für die Analyse im Western Blot wurde ein polyklonales GnRH-I R Antiserum und ein kommerziell verfügbarer GnRH-II R Antikörper verwendet.

#### **4.4.3 REZEPTOR-BINDUNGS-ASSAY**

Zur Bestimmung der Affinität der GnRH-II Antagonisten zum GnRH-I Rezeptor wurde ein Rezeptor-Bindungs-Assay durchgeführt, das auf einer Verdrängungsreaktion von markiertem und unmarkiertem Cetrorelix beruht. Als *tracer* wurden  $^{125}\text{I}$ -Cetrorelix verwendet. Als Kontrolle diente der GnRH-II Agonist [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II. Es wurden murine GnRH-I Rezeptor positive Zelllinien verwendet, da aufgrund des noch endgültig ausstehenden GnRH-II Rezeptor Nachweises, kein etabliertes GnRH-II Rezeptor Zellkulturmodell existiert.

Die Liganden Ant-1, Ant-2 und Ant-3 zeigen in der Zelllinie  $\alpha\text{T3-1}$   $\text{EC}_{50}$ -Werte von ca. 1-2 nM (Ant-1:  $1,52 \pm 0,49$  nM; Ant-2:  $1,85 \pm 0,05$  nM; Ant-3:  $2,05 \pm 0,15$  nM), während der Agonist nur eine Affinität bei  $996,5 \pm 116,6$  nM aufweist. Die Größenordnung der  $\text{EC}_{50}$ -Werte der Antagonisten entspricht ungefähr der von Cetrorelix mit ca. 1 nM. Die GnRH-II Antagonisten besitzen somit eine sehr



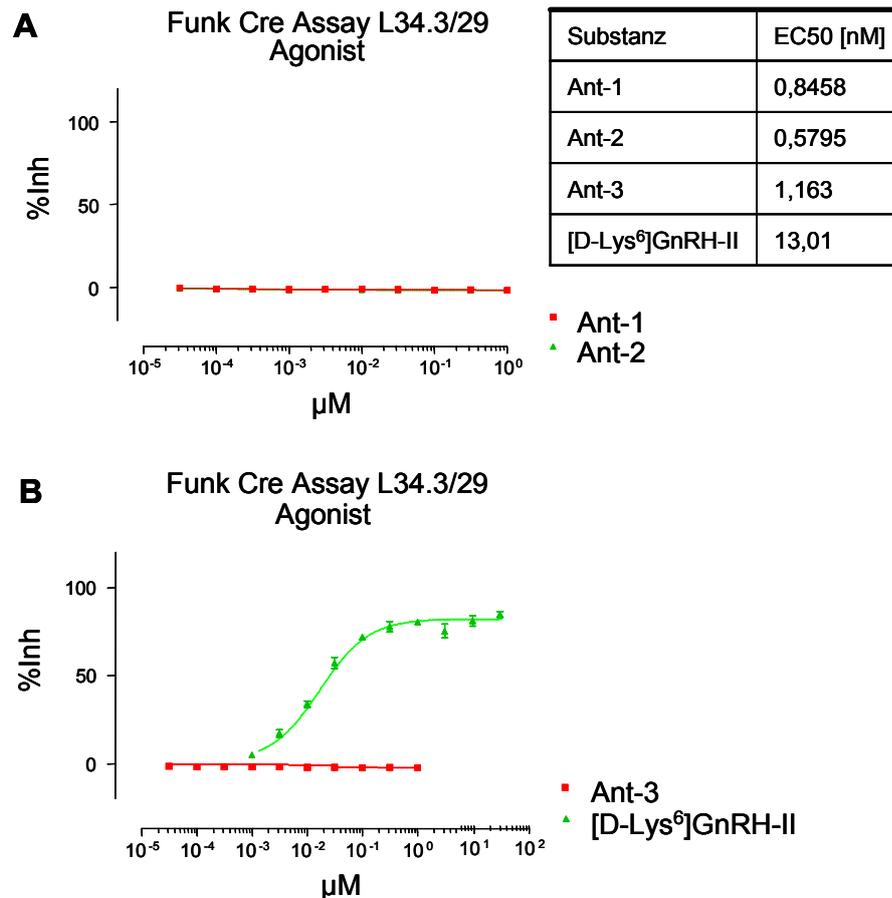
**Abb. 4.13: Rezeptor-Bindungs-Assay zur Analyse der GnRH-II Antagonisten.** Als Kontrolle wurde der GnRH-II Agonist [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II eingesetzt. Alle vier Substanzen zeigen im nanomolaren Bereich eine signifikante Aktivität am GnRH-I Rezeptor. Als Vergleich erreicht natives GnRH-II eine EC<sub>50</sub> von ca. 76 nM.

hohe Affinität zum murinen GnRH-I Rezeptor im Vergleich zum GnRH-II Agonisten [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II. Aufgrund von Erfahrungswerten können die Daten zum murinen GnRH-I Rezeptor sehr gut mit den Bindungsaktivitäten am humanen GnRH-I Rezeptor korreliert werden.

In Abbildung 4.13 sind die Bindungsdaten der murinen Fibroblasten Zelllinie L3.5/78 dargestellt. Alle Substanzen zeigen eine Aktivität am GnRH-I Rezeptor, während die des Agonisten deutlich geringer ist ([D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II: 26,3 nM), als die der GnRH-II Antagonisten (Ant-1: 0,5157 nM; Ant-2: 0,7586 nM; Ant-3: 0,6584 nM). Zum Vergleich ergab natives GnRH-II Bindungsaffinitäten von  $75,5 \pm 26,5$  nM. Die Affinität der GnRH-II Antagonisten zum murinen GnRH-I Rezeptor ist auch in dieser Zelllinie deutlich höher als die des Agonisten und des nativen GnRH-II.

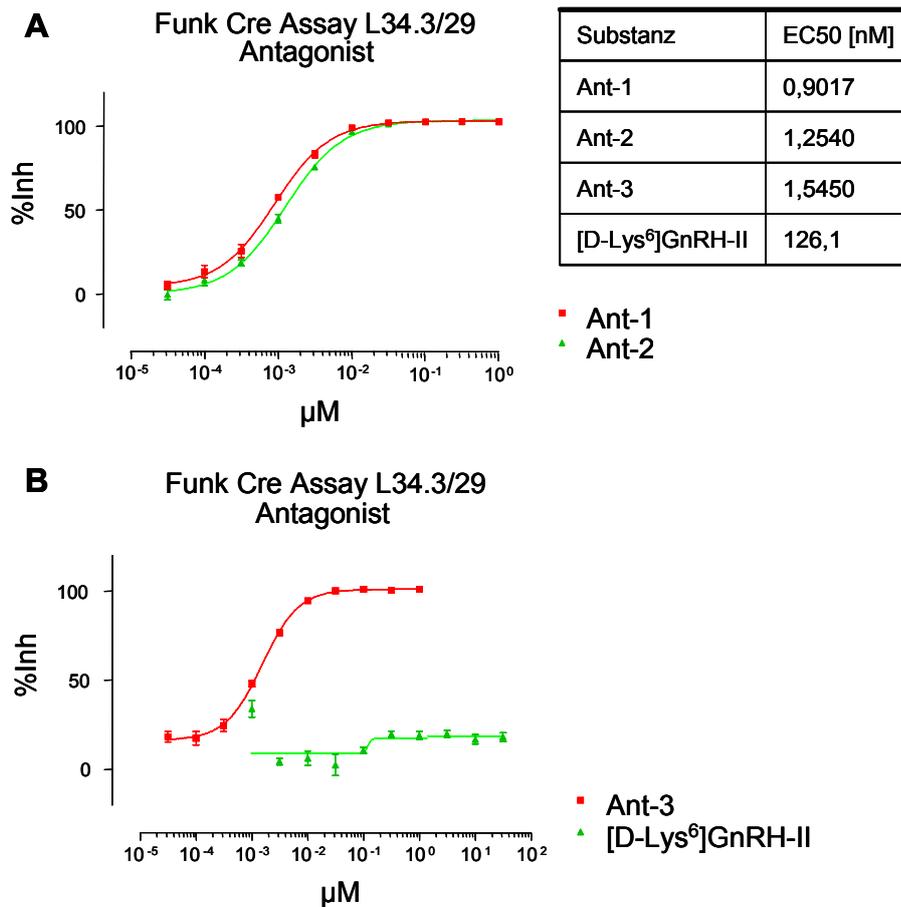
#### 4.4.4 FUNKTIONALITÄTS-ASSAY

Um die Bindungsdaten zu verifizieren, wurde ein Funktionalitäts-Assay durchgeführt, bei dem die agonistische und antagonistische Aktivität der GnRH-II Antagonisten über ein CRE-Reporter-Gen-Assay analysiert wurde. Als Kontrolle diente ebenfalls der GnRH-II Agonist [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II. Für die drei GnRH-II Antagonisten wurde keine CRE-Aktivierung im agonistischen Modus detektiert, während [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von ca. 13 nM wie



**Abb. 4.14: Funktionalitäts-Assay zur agonistischen Wirkung der GnRH-II Antagonisten.**  
 Eine agonistische Wirkung konnte nur für [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II (Kontrolle) mit einer EC<sub>50</sub> von 13nM erhalten werden. Die anderen Substanzen zeigen keine agonistischen Aktivität in Verbindung mit der CRE-Aktivierung durch den GnRH-I Rezeptor.

erwartet eine agonistische Aktivität aufweist (Abb. 4.14). Im Hinblick auf die antagonistische Aktivität am GnRH-I Rezeptor verzeichnet [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II keine CRE-Aktivierung. Antagonistische Aktivität mit EC<sub>50</sub>-Werten von ca. 1 nM wurde für die GnRH-II Antagonisten detektiert (Ant-1: 0,9017 nM; Ant-2: 1,2540 nM; Ant-3: 1,5450 nM) (Abb. 4.15). Es konnte bestätigt werden, dass es sich bei den verwendeten Substanzen um Antagonisten handelt und sie eine hohe Affinität zum murinen und somit zum humanen, hypophysären GnRH-I Rezeptor besitzen.

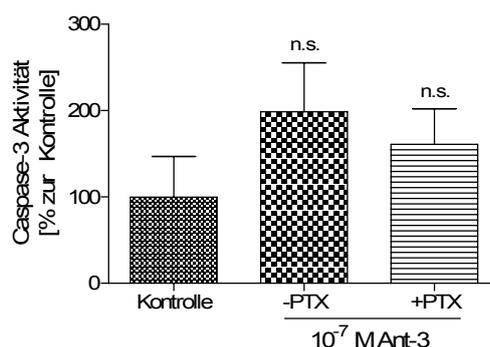


**Abb. 4.15: Funktionalitäts-Assay zur antagonistischen Wirkung der GnRH-II Antagonisten.** Eine antagonistische Wirkung konnte bei allen drei GnRH-II Antagonisten bestätigt werden. Diese lag im Bereich von ungefähr 1 nM. Für den GnRH-II Agonisten [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II konnte keine antagonistische Wirkung ermittelt werden.

#### 4.4.5 EINFLUSS VON PERTUSSIS TOXIN AUF DIE INDUKTION VON APOPTOSE

Die Signaltransduktion über die GnRH Rezeptoren wird in gynäkologischen Karzinomen über das G-Protein  $\alpha_i$  vermittelt (Gründker et al., 2001b). Das G-Protein  $\alpha_i$  ist Pertussis Toxin (PTX)-sensitiv. Eine Blockade des G-Proteins sollte somit zu einer Inhibition der Signalweiterleitung durch GnRH-Analoga führen.

Zur Analyse wurden Ovarialkarzinomzellen NiH:OVCAR-3 mit oder ohne PTX (20 ng/ml) vorbehandelt und anschließend für 48 h mit Ant-3 ( $10^{-7}$  M) stimuliert. Der Effekt auf die PTX-induzierte Inhibition der Apoptose wurde mittels Western Blot analysiert. Als Antigen diente aktive Caspase-3 (Abb. 4.16).



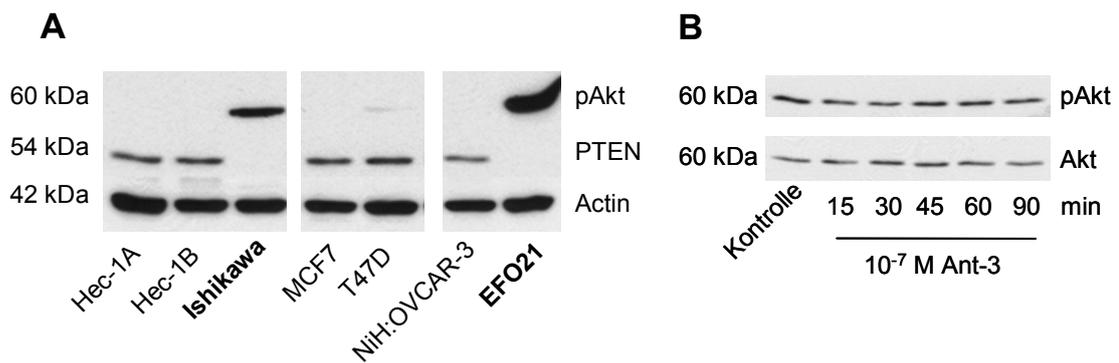
**Abb. 4.16: Induktion von Apoptose in NiH:OVCAR-3.** Die Inkubation erfolgte jeweils für 72 h mit PBS (Kontrolle) oder Ant-3 ( $10^{-7}$  M) mit oder ohne PTX (20ng/ml). Die Aktivität der Caspase-3 konnte durch Koinkubation von Ant-3 mit PTX nicht signifikant reduziert werden. n.s., nicht signifikant.

Durch die Stimulation mit Ant-3 konnte Apoptose im Vergleich zur Kontrolle induziert werden (Ant-3:  $198,7 \pm 56,66$  % (n.s.)). Die Aktivität der Caspase-3 konnte durch Koinkubation mit PTX nicht signifikant inhibiert werden, allerdings liegt eine Reduktion der Aktivität vor (Ant-3 + PTX:  $160,9 \pm 41,31$  % (n.s.)). Eine Restaktivität des G-Proteins ist somit vorhanden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Mamma- und Endometriumkarzinomzelllinien gefunden. Die Versuche wurden in drei unabhängigen Experimenten in drei verschiedenen Passagen wiederholt.

#### 4.4.6 INTERAKTION MIT DER IGF-REZEPTOR SIGNALKASKADE

Aufgrund der Interaktion von GnRH mit der Wachstumsfaktorrezeptor-Signalkaskade des *insulin-like growth factor* (IGF)-Rezeptors (Hershkovitz et al., 1993) und des Einflusses auf die Protein Kinase B (PKB)/Akt (Kraus et al., 2004) wurde der Effekt der GnRH-II Antagonisten auf diesen Signalweg mittels Western Blot analysiert.

Dafür wurde zuvor die basale Aktivität von PKB/Akt und die des Tumorsuppressorgens *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) bestimmt (Abb. 4.17 A). Die Protein Kinase B/Akt ist häufig verstärkt aktiviert, wenn Mutationen in PTEN vorliegen. In der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa und der Ovarialkarzinomzelllinie EFO21 konnte eine erhöhte Expression von phosphoryliertem PKB/Akt festgestellt werden. Im Gegensatz zu den anderen Zelllinien lag PTEN hier mutiert und nicht als funktionsfähiges Protein vor, da es



**Abb. 4.17: Interaktion der GnRH-II Antagonisten mit der IGF-Rezeptor Signalkaskade.** (A) Aufgrund einer PTEN-Mutation ist in Ishikawa und EFO21 die Aktivität von PKB/Akt stark erhöht, was in einer Phosphorylierung des Proteins resultiert. (B) Die GnRH-II Antagonisten ( $10^{-7}$  M) haben keinen zeitabhängigen Effekt auf die Aktivität von PKB/Akt in Ishikawa Zellen.

nicht im Western Blot nachgewiesen werden konnte.

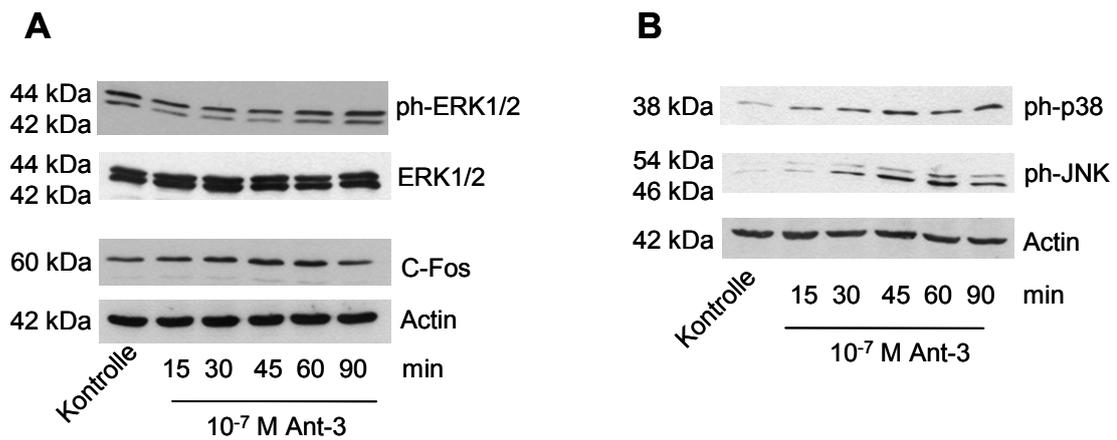
In EFO21 und Ishikawa wurde daraufhin der Einfluss der GnRH-II Antagonisten ( $10^{-7}$  M) zeitabhängig (0, 15, 30, 45, 60 und 90 min) untersucht. Es konnten für keinen der Antagonisten inhibierende oder aktivierende Effekte in diesen Zelllinien nachgewiesen werden. Die Expression von Akt und seiner aktivierten, phosphorylierten Form pAkt ist über einen Zeitraum von 90 min unverändert. In Abbildung 4.17 B ist der Einfluss von Ant-3 auf die Zelllinie Ishikawa im Western Blot exemplarisch dargestellt. Dieselben Effekte wurden auch für die Zelllinie EFO21 nachgewiesen. Die Versuche wurden in drei unabhängigen Experimenten in drei verschiedenen Passagen wiederholt.

#### 4.4.7 INTERAKTION MIT DER MAPK-SIGNALKASKADE

GnRH-I und -II Agonisten sind in der Lage, die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors zu inhibieren, was mit einer Hemmung der MAPK-Aktivität und somit antiproliferativen Effekten einhergeht (Gründker et al., 2001b). Aufgrund der ebenfalls Zellzahl-verringernenden Wirkung der GnRH-II Antagonisten und der daraus resultierenden Apoptoseinduktion, wird die Interaktion mit der MAPK-Signalkaskade analysiert.

##### 4.4.7.1 EFFEKT AUF DIE AKTIVITÄT DER ERK1/2

Der Einfluss der GnRH-II Antagonisten auf die Aktivierung der MAPK ERK1/2, wurde mittels Western Blot Analyse untersucht. Dafür wurden die Ovarial-



**Abb. 4.18: Interaktion der GnRH-II Antagonisten mit der MAPK Signalkaskade.** (A) Auf die Aktivierung bzw. Inhibition von ERK1/2 und den *downstream* Transkriptionsfaktor c-Fos haben die GnRH-II Antagonisten keinen zeitabhängigen Einfluss. Die Effekte sind exemplarisch in der Ovarialkarzinomzelllinien EFO27 dargestellt. (B) Die Stress-aktivierten MAPK p38 und JNK werden jedoch zeitabhängig durch die GnRH-II Antagonisten aktiviert. Exemplarisch ist der Einfluss auf die Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa dargestellt.

karzinomzellen EFO27, die Endometriumkarzinomzellen Ishikawa und die Mammakarzinomzellen T47D zeitabhängig (0, 15, 30, 45, 60 und 90 min) mit den GnRH-II Antagonisten ( $10^{-7}$  M) behandelt.

Abbildung 4.18 A stellt den Einfluss des GnRH-II Antagonisten Ant-3 auf die MAPK ERK1/2 von EFO27 exemplarisch dar. Zusätzlich wurde der *downstream* Transkriptionsfaktor *c-fos* untersucht.

Für beide Faktoren, die MAPK ERK1/2 und den Transkriptionsfaktor *c-fos*, konnten keine Aktivierungen oder Inhibition detektiert werden. Die Expression der Proteine ist über einen Zeitraum von 90 min gleich bleibend intensiv. Diese Ergebnisse wurden auch für die anderen verwendeten Zelllinien und Antagonisten erbracht. Die Versuche wurden in drei unabhängigen Experimenten in drei verschiedenen Passagen wiederholt.

#### 4.4.7.2 EFFEKT AUF DIE AKTIVITÄT VON P38 UND JNK

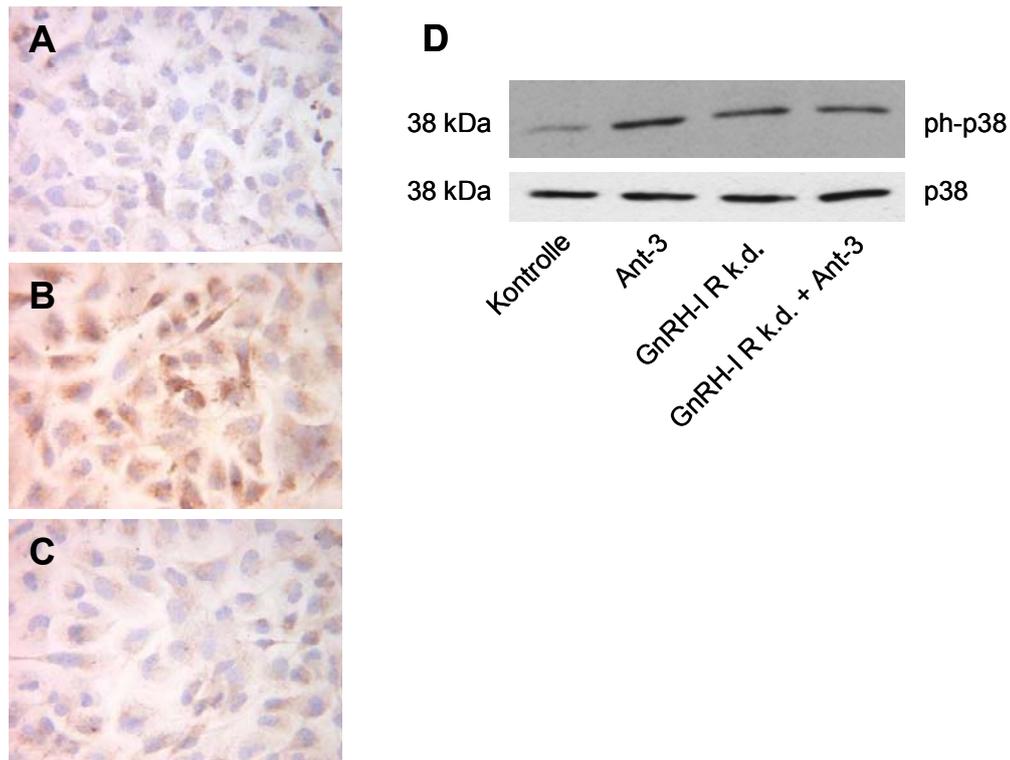
Der Einfluss der GnRH-II Antagonisten auf die Aktivierung der Stress-aktivierten MAPK p38 und JNK, wurde ebenfalls mittels Western Blot Analyse untersucht. Dafür wurden die Ovarialkarzinomzellen EFO27, die Endometrium-

karzinomzellen Ishikawa und die Mammakarzinomzellen T47D zeitabhängig (0, 15, 30, 45, 60 und 90 min) mit den GnRH-II Antagonisten ( $10^{-7}$  M) behandelt. In allen verwendeten Zelllinien konnte gezeigt werden, dass p38 und JNK zeitabhängig aktiviert werden, was in einer Phosphorylierung der Proteine resultiert. Phospho-p38 erreicht nach 45 min die höchste Aktivität, während dies bei phospho-JNK nach 60 min geschieht. In Abbildung 4.18 B ist die zeitabhängige Aktivierung von p38 in der Zelllinie Ishikawa exemplarisch für den GnRH-II Antagonisten Ant-3 dargestellt. Die Phosphorylierung von JNK ist für EFO27 dargestellt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in der Mammakarzinomzelllinie T47D erhalten. Die Versuche wurden in drei unabhängigen Experimenten in drei verschiedenen Passagen wiederholt.

#### **4.4.7.3 EINFLUSS AUF DIE MAPK-AKTIVITÄT NACH GNRH-I REZEPTOR KNOCK**

##### ***DOWN***

Es ist bekannt, dass der GnRH-I Antagonist Cetrorelix antagonistisch am GnRH-I Rezeptor wirkt, aber auch agonistisch am putativen GnRH-II Rezeptor (Gründker et al., 2004). Über welchen Rezeptor die Aktivierung von p38 und JNK erfolgt, soll nach GnRH-I Rezeptor *knock down* analysiert werden. Dafür wurde mittels *antisense*-Technik die Expression des GnRH-I Rezeptors blockiert. Dafür wurden die Ovarialkarzinomzelllinie EFO27, die Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa und die Mammakarzinomzelllinie T47D mit dem pIRES®-GnRH-I R antisense-Vektor transient transfiziert und nach 24 h zur Internalisierung der noch an der Zelloberfläche vorhandenen Rezeptoren mit Triptorelin ( $10^{-7}$  M) behandelt. Nach weiteren 48 h wurde die GnRH-I Rezeptor Expression zur Kontrolle mittels Western Blot von Membranfraktionen der transfizierten Zelllinien bestimmt und als weitere Kontrolle wurden Zellen mit dem polyklonalen GnRH-II Rezeptor Antiserum immunzytologisch analysiert. Die GnRH-I Rezeptor Expression ist in der Ovarialkarzinomzelllinie EFO21 mit und ohne *knock down* in Abbildung 4.19 exemplarisch dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des Rezeptors nach Transfektion (C) im Vergleich zur Positivkontrolle (B) deutlich reduziert ist und mit der unbehandelten Negativkontrolle (A) korreliert.



**Abb. 4.19: Interaktion mit der MAPK Signalkaskade nach GnRH-I Rezeptor knock down.** Immunzytologische Färbung nach GnRH-I Rezeptor knock down in der Ovariakarzinomzelllinie EFO21 mit dem polyklonalen GnRH-I Rezeptor Antiserum (20x). Die Expression des GnRH-I Rezeptors ist im Vergleich zur Postivkontrolle (B) nach *knock down* (C) deutlich reduziert und korreliert mit der Negativkontrolle (A). Nach *knock down* des GnRH-I Rezeptors wird p38 nur schwach aktiviert, während ohne *knock down* (k.d.) eine starke Aktivierung von p38 vorliegt (D).

Die Zellen wurden 72 h nach der Transfektion für 45 min mit den GnRH-II Antagonisten ( $10^{-7}$  M) behandelt und die Aktivität von p38 und JNK anschließend mittels Western Blot analysiert. Als Kontrollen dienten nicht transfizierte Zellen sowie lediglich mit GnRH-II Antagonisten behandelte Zellen. Die Phosphorylierung von p38 nimmt bei Behandlung mit GnRH-II Antagonisten wie erwartet zu. Durch den *knock down* der GnRH-I Rezeptor Expression findet eine sehr geringe Aktivierung der p38 Phosphorylierung statt. Durch eine Behandlung mit GnRH-II Antagonisten mit vorausgegangenem GnRH-I Rezeptor *knock down* wird jedoch die Aktivierung von p38 verhindert. Die Signaltransduktion über die stress-aktivierte MAPK p38 wird somit über den GnRH-I Rezeptor vermittelt. Da die Aktivität der Kinase jedoch nicht völlig

---

aufgehoben werden kann, ist zu vermuten, dass die Signalweiterleitung teilweise auch über den putativen GnRH-II Rezeptor vermittelt wird.

## **5 DISKUSSION**

### **5.1 INDUKTION VON APOPTOSE IN GYNÄKOLOGISCHEN KARZINOMEN**

#### **5.1.1 REDUKTION DER ZELLZAHL DURCH APOPTOSE**

Gonadotropin-Releasing Hormon I (GnRH-I), GnRH-II und ihre Rezeptoren werden als Teil eines negativen, autokrinen Regulationssystems der Zellproliferation in gynäkologischen Karzinomen exprimiert. Basierend auf der Tumorzell-spezifischen Signaltransduktion inhibieren GnRH-I und GnRH-II Agonisten die mitogene Signaltransduktion der Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Dies resultiert in einer Inhibition der Proliferation von gynäkologischen Karzinomzellen (Gründker et al., 2002a; Gründker et al., 2000b). Die Induktion von Apoptose als Ursache der antiproliferativen Effekte konnte durch Gründker *et al.* nicht bestätigt werden. Allerdings wurde berichtet, dass auch GnRH-I Agonisten zu apoptotischen Ereignissen in Prostata-Karzinomen führen können (Castellon et al., 2006; Kraus et al., 2004), wobei diese Daten umstritten sind, da vermutet wird, dass die Bildung apoptotischer Proteine als Folge der antiproliferativen Effekte gesehen werden kann (Angelucci et al., 2004). Die Induktion von Apoptose durch GnRH-I Antagonisten (Cetrorelix, Degarelix) konnte in Endometrium- und Ovariakarzinomzellen gezeigt werden (Imai et al., 2006; Kleinman et al., 1994). In uterinen Leiomyomen und humanen Granulosa-Zellen konnte Apoptose sowohl durch GnRH-I Agonisten als auch durch Antagonisten induziert werden (Chen et al., 2005; Giampietro et al., 2006; Vitale et al., 2006). Gegen apoptotische Effekte durch GnRH Agonisten in gynäkologischen Karzinomzellen spricht ebenfalls der Nachweis, dass Triptorelin die Induktion des antiapoptotischen Faktors NFκB anregen kann (Gründker et al., 2000a).

In der vorliegenden Arbeit wurden strukturell ähnliche GnRH-II Antagonisten (Ant-1, Ant-2, Ant-3) entwickelt und deren Effekte auf die Zellzahl von gynäkologischen Karzinomzelllinien *in vitro* analysiert. Durch die verwendeten GnRH-II Antagonisten konnte in den verwendeten Zelllinien eine Reduktion der

Zellzahl im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen hervorgerufen werden. Ob es sich dabei um antiproliferative Effekte oder die Reduktion der Zellzahl durch die Induktion von Apoptose handelte, war an dieser Stelle zu klären.

### 5.1.2 MECHANISMEN DER APOPTOSEINDUKTION

Mittels Durchflusszytometrie wurde die DNA-Degradation in den mit GnRH-II Antagonisten behandelten Zelllinien quantifiziert. Es konnten dosisabhängige Effekte auf die Induktion der Apoptose nachgewiesen werden. Zudem wurde die Aktivität der Caspase-3 mittels Western Blot Analyse bestimmt, um die Daten der DNA-Quantifizierung zu verifizieren. Auch hier konnten dosisabhängige Effekte, vermittelt durch die Behandlung mit GnRH-II Antagonisten, erzielt werden. Zusätzlich weisen mit GnRH-II Antagonisten behandelte Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen deutliche morphologische Veränderungen, wie *membrane blebbing*, auf.

Parborell *et al.* konnten durch die Behandlung mit dem GnRH-I Agonisten Leuprorelinacetat ebenfalls die Aktivierung von Caspase-3 bestätigen, was letztendlich in einer Aktivierung von PARP, einem Caspase-Substrat, resultiert (Parborell *et al.*, 2007). Im Prostatakarzinom wurde die DNA-Fragmentierung als Folge der Apoptose durch die Inkubation mit Leuprorelinacetat und Cetrorelix nachgewiesen (Castellon *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Induktion der Apoptose über den intrinsischen Apoptosesignalweg über die Mitochondrien nachgewiesen werden. Der Verlust des Membranpotentials erfolgte dosisabhängig durch die Behandlung mit GnRH-II Antagonisten. Parrek *et al.* konnten die Freisetzung von Cytochrome C aus den Mitochondrien durch die Behandlung mit Cetrorelix in männlichen Keimzellen nachweisen und ebenfalls die Induktion des mitochondrialen Signalwegs zeigen (Pareek *et al.*, 2007). Außerdem konnte nach Behandlung mit GnRH-I Antagonisten eine Aktivierung von verschiedenen proapoptotischen Faktoren auf mRNA-Ebene wie Fas und FasL, die für den extrinsischen Signalweg über die Todesrezeptoren verantwortlich sind, gezeigt werden (Pareek *et al.*, 2007). In uterinen Leiomyomen wurde bei Patientinnen, die Leuprorelinacetat erhielten, eine reduzierte Aktivität des antiapoptotischen

Faktors *Fas-like interleukin-1 converting enzyme (FLICE)-inhibitory protein (FLIP)* nachgewiesen (Bifulco et al., 2004). In Epithelzellen des Endometriums konnte ebenfalls die Expression der proapoptotischen Proteine FasL und Bax nach Behandlung mit dem GnRH-I Agonisten Leuprorelinacetat und dem GnRH-I Antagonisten Antide unter Beweis gestellt werden (Bilotas et al., 2006). Maiti *et al.* haben im Prostatakarzinom ebenfalls die Induktion von Apoptose mit GnRH-II Antagonisten nachweisen können, die dem Cetrorelix strukturell ähnlich sind (Maiti et al., 2005). Diese GnRH-II Antagonisten wurden bisher jedoch nicht in gynäkologischen Karzinomen getestet. Es wird spekuliert, dass Apoptose in Prostatakarzinomzellen durch die Zerstörung der Zell-internen  $[Ca^{2+}]_i$ -Depots induziert wird, da bekannt ist, dass eine Entleerung der internen  $[Ca^{2+}]_i$ -Depots zu Apoptose führen kann (Preston et al., 1997; Wertz and Dixit, 2000).

Die Induktion von Apoptose scheint bei der Behandlung mit GnRH Analoga, speziell mit GnRH Antagonisten, eine entscheidende Position einzunehmen, wobei die Induktion in gynäkologischen Karzinomen umstritten ist. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Apoptose über den mitochondrialen Signalweg eingeleitet wird. Allerdings sollte das Zusammenspiel von anti- und proapoptotischen Faktoren genauer untersucht werden, da es eventuell auch zu einer Kooperation der beiden Signalwege (extrinsisch, intrinsisch) kommen kann. Die Induktion von Apoptose konnte gehäuft durch die Behandlung mit GnRH Antagonisten nachgewiesen werden, während starke antiproliferative Effekte durch die Inkubation mit GnRH Agonisten auftreten.

## **5.2 GNRH-II ANTAGONISTEN-INDUZIERTER SIGNALWEGE**

### **5.2.1 INTERAKTION MIT DER PKB/AKT-SIGNALTRANSDUKTION**

Die Protein Kinase B (PKB/Akt) spielt eine entscheidende Rolle, bei der Balance zwischen Überleben und Tod (Apoptose) einer Zelle (Franke et al., 1997). Es konnte bereits gezeigt werden, dass PKB/Akt die Apoptose durch die

Phosphorylierung des proapoptotischen Proteins Bad der Bcl-2 Familie an Ser<sup>136</sup> inhibieren kann (Datta et al., 1997).

Eine Therapie uteriner Leiomyome mit dem GnRH-I Agonisten Leuprorelin führt zu einer Reduktion des Volumens der Myome (Mizutani et al., 1998). Auf molekularer Ebene konnte dabei gezeigt werden, dass eine Reduktion von pAkt hervorgerufen wird, die mit einer Inhibition der Phosphorylierung von Bad einhergeht. Es wird vermutet, dass diese Effekte zu einer Induktion von Apoptose führen, da ebenfalls die antiapoptotischen Proteine FLIP und PED/PEA15 inhibiert werden (Bifulco et al., 2004).

In Prostatakarzinomzellen DU-145 und LnCaP konnte ebenfalls eine PKB/Akt-abhängige Induktion von Apoptose gezeigt werden, die durch eine Inhibition von PKB/Akt durch den GnRH-I Agonisten Triptorelin induziert wird (Kraus et al., 2004). In beiden Zelllinien, DU145 und LnCaP, liegt PKB/Akt jedoch basal bereits verstärkt aktiviert vor (Tanaka et al., 2003). Die Reduktion der Aktivität von PKB/Akt scheint allerdings mit einer Interaktion der mitogenen Signaltransduktion verbunden zu sein, da die Stress-aktivierte MAPK JNK durch die Inkubation mit Triptorelin in diesen Zellen aktiviert wird. PKB/Akt ist in der Lage, die JNK-Signaltransduktion durch verschiedene Mechanismen zu regulieren (Figueroa et al., 2003).

In den in dieser Arbeit eingesetzten gynäkologischen Karzinomzelllinien konnte in zwei der verwendeten Zelllinien eine Überaktivität von PKB/Akt aufgrund von PTEN-Mutationen, nachgewiesen werden. In diesen beiden Zelllinien, EFO21 und Ishikawa, konnte die Aktivität von PKB/Akt durch die Behandlung mit GnRH-II Antagonisten zeitabhängig jedoch nicht reduziert werden. Apoptose konnte auch in den anderen verwendeten Zelllinie induziert werden, in den PKB/Akt basal nicht erhöht aktiviert vorliegt.

Die beschriebenen Effekte von GnRH Analoga auf die Aktivität der Protein Kinase B in den verschiedenen Zelltypen wurden jeweils durch GnRH-I Agonisten (Leuprorelin, Triptorelin) vermittelt. In hypophysären  $\alpha$ T3-1 Zellen konnte für GnRH-I Antagonisten gezeigt werden, dass die IGF-induzierte Aktivierung von PKB und deren Inhibition durch GnRH-I Agonisten sogar wiederhergestellt werden konnte (Rose et al., 2004).

PKB/Akt spielt bei der Induktion von Apoptose in gynäkologischen Karzinomzellen durch GnRH-II Antagonisten keine bzw. nur eine untergeordnete Rolle. GnRH Analoga interagieren zwar mit der PI3K-PKB/Akt-Signaltransduktion gynäkologischer Karzinomzellen, allerdings scheint dies nur auf Agonisten und nicht auf Antagonisten zuzutreffen. Der Fokus in der Signaltransduktion scheint also auf den Mechanismen zur Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen zu liegen.

### 5.2.2 INTERAKTION MIT MAPK-SIGNALWEGEN

GnRH Analoga aktivieren in  $\alpha$ T3-1 Hypophysenzellen die mitogene Signaltransduktion über ERK1/2, JNK und p38, was in einer Induktion der Gonadotropin-Synthese resultiert (Bonfil et al., 2004; Harris et al., 2002; Levi et al., 1998; Roberson et al., 1999). In gynäkologischen Karzinomen und dem Prostatakarzinom konnte ebenfalls eine Interaktion mit den MAPKs nachgewiesen werden (Eicke et al., 2006; Gründker et al., 2001a; Kraus et al., 2004). Sehr widersprüchlich ist dabei die Aktivierung der einzelnen MAPK durch verschiedene GnRH Analoga.

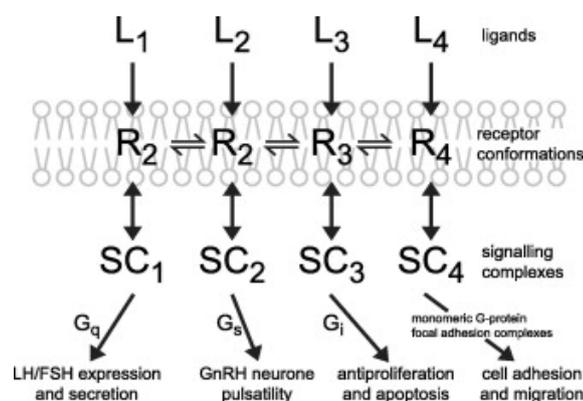
Von Gründker *et al.* konnte eine Inhibition der EGF-induzierten Aktivierung der MAPK ERK1/2 durch den GnRH-I Agonisten Triptorelin und den GnRH-I Antagonisten Cetrorelix, sowie durch den GnRH-II Agonisten [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II, in gynäkologischen Karzinomzellen nachgewiesen werden, die eine antiproliferative Wirkung nach sich zieht (Eicke et al., 2006; Gründker et al., 2000b). Durch andere Gruppen konnte jedoch eine erhöhte Aktivität von ERK1/2 durch die Stimulation mit GnRH-I und II Agonisten erreicht werden (Kim et al., 2006b; Kim et al., 2005; Kimura et al., 1999). Allerdings wurde gezeigt, dass der GnRH-I Antagonist Antide die Aktivierung von ERK1/2 durch GnRH-I und -II Agonisten in Ovarialkarzinomzellen wieder aufheben kann (Kim et al., 2006b).

In der vorliegenden Arbeit konnte kein zeitabhängiger Einfluss der GnRH-II Antagonisten auf die Aktivierung von ERK1/2 detektiert werden. Die Involvierung der ERK1/2-Kaskade in apoptotische Signalwege ist auch ein sehr

seltener Prozess, da die Aktivierung dieser MAPK für gewöhnlich zur Proliferation führt (Chang et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte hingegen die zeitabhängige Aktivierung der *stress activated protein kinases* (SAPK) p38/SAPK2 und JNK/SAPK1 durch GnRH-II Antagonisten in gynäkologischen Karzinomzellen nachgewiesen werden. Durch GnRH-II Agonisten konnte von Kim *et al.* bereits eine GnRH-vermittelte Aktivierung von p38 in Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen werden (Kim et al., 2004). Im Prostatakarzinom konnte durch GnRH-I Agonisten ebenfalls eine Aktivierung von JNK induziert werden, die für die Induktion von Apoptose verantwortlich ist (Kraus et al., 2004). Die Aktivierung der mitogenen Signaltransduktion wurde bisher fast ausschließlich für GnRH Agonisten nachgewiesen. In dieser Arbeit hingegen wurde erstmals der Nachweis erbracht, dass auch GnRH-II Antagonisten mit diesen Signalwegen interagieren.

Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Blockade PTX-sensitiver G-Proteine, die einen Einfluss auf die Induktion der Apoptose durch GnRH-II Antagonisten haben, konnte in dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Die Aktivierung der Caspase-3 konnte durch eine Koinkubation von Ant-3 und PTX nur minimal, jedoch nicht signifikant, inhibiert werden. Allerdings wurde von Gründker *et al.* bereits der Nachweis erbracht, dass sowohl der GnRH-I als



**Abb. 5.1: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Konformationszustände einzelner Rezeptoren durch Ligandenbindung.** Die verschiedenen Liganden-Rezeptor-Komplexe sind an unterschiedliche Signalwege gekoppelt, die zu unterschiedlichen Effekten, wie Gonadotropin-Synthese, Apoptose oder Zell-Ahäsion und Migration, in Zellen führen.

auch der GnRH-II Rezeptor in gynäkologischen Karzinomen G-Protein  $\alpha_i$ -abhängig sind (Gründker et al., 2001b). Imai *et al.* konnten ebenfalls eine G-Protein  $\alpha_i$ -abhängige Apoptose-Induktion durch Cetrorelix bestätigen (Imai et al., 2006). Wahrscheinlich liegt aufgrund der unterschiedlichen Konformationszustände des Rezeptor-Liganden-Komplexes eine Aktivierung verschiedener G-Proteine vor.

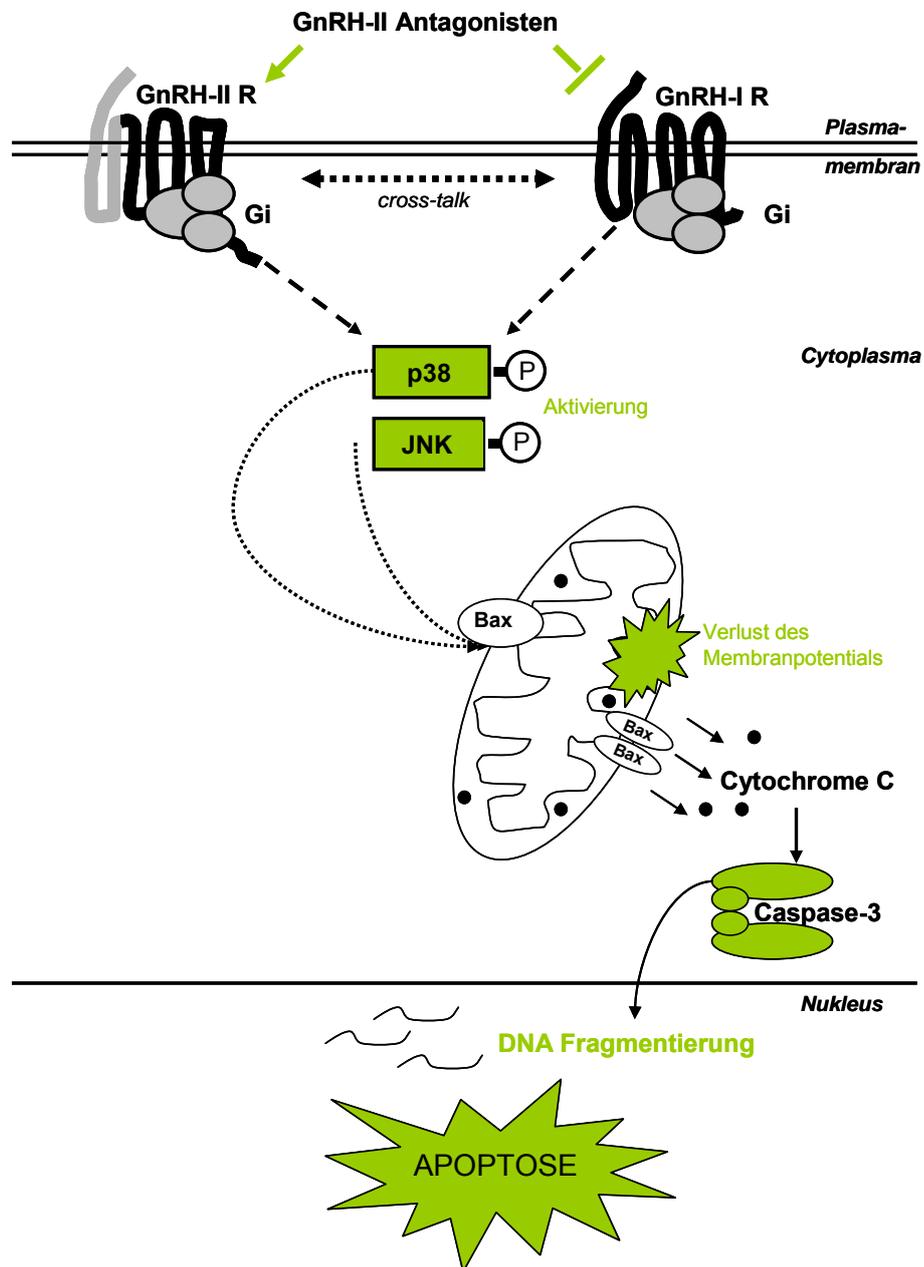
Die Vielzahl der GnRH Liganden (Agonisten und Antagonisten) führt zu unterschiedlichen Konformationen des Ligand-Rezeptor-Komplexes, der zu diversen Interaktionen mit verschiedenen Signalwegen der Zelle führt. Millar *et al.* haben dafür ein Modell des „*ligand-induced selective-signalling*“ (LISS) entwickelt, dass die Interaktion von GnRH und seiner Analoga mit den verschiedenen G-Proteinen und der daraus resultierenden Signaltransduktion erklärt (Abb. 5.1) (Lu et al., 2005; Millar et al., 2007). Daraus könnten die verschiedenen biologischen Funktionen des Neuropeptids, wie Endocytose in der Hypophyse und Apoptose in Karzinomzellen dargelegt werden. Die Aktivierung von verschiedenen G-Proteinen ist ein Grund für die Vielfalt der hervorgerufenen Mechanismen, die durch die MAPKs induziert werden und somit Zellkontext-abhängig ist (Dobkin-Bekman et al., 2006).

### 5.2.3 MAPK UND APOPTOSE

In der vorliegenden Arbeit konnte die Aktivierung der Stress-aktivierte MAPKs p38 und JNK gezeigt werden, während die mitogene MAPK ERK1/2 unverändert in ihrer Aktivität in gynäkologischen Karzinomzellen nach der Behandlung mit GnRH-II Antagonisten vorliegt. Dass ERK1/2 mit der Induktion von Apoptose assoziiert ist, konnte bisher nur sehr selten nachgewiesen werden, da ERK1/2 als *downstream* Faktor der Wachstumsfaktor Signalkaskade eher mit Proliferation assoziiert ist.

In dieser Arbeit konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen MAPK-Signalwegen und Apoptose bestätigt werden, der über p38 und JNK vermittelt ist. Die Induktion von Apoptose durch GnRH-II Antagonisten beruht wahrscheinlich auf dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials. Durch eine Verschiebung des Gleichgewichts von

antiapoptotischen Signalen zu proapoptotischen Signalen (Bad, Bax) wird die Mitochondrienmembran permeabilisiert und Cytochrom C freigesetzt. Dieses bildet mit ATP, der Initiator-Caspase-9 und dem *apoptotic protease activating*



**Abb. 5.2: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit ermittelten Signalwege zur Induktion von Apoptose durch GnRH-II Antagonisten.** Die GnRH-II Antagonisten aktivieren über die GnRH Rezeptoren die Stress-aktivierten MAPK p38 und JNK, die zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führen. Dies resultiert in einer Aktivierung der Effektor-Caspase-3 und in einer Fragmentierung der DNA als spät-apoptotisches Ereignis. Direkte Nachweise sind In grün dargestellt.

*factor 1* (Apaf-1) das Apoptosom (Salvesen and Renatus, 2002), welches zur Aktivierung der Effektor-Caspase-3 führt, die wiederum die Effektor-Caspase-7 aktiviert. Antiapoptotische Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xL sind der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und hemmen dort die Cytochrom C-Freisetzung. Die proapoptotischen Proteine wie Bad und Bax befinden sich im Cytosol und werden nach Induktion des Todes-Signals zu den Mitochondrien rekrutiert, wo sie z.B. durch die Bildung von Kanälen in der Membran die Cytochrom C –Freisetzung induzieren (Gogvadze et al., 2006).

Es ist bekannt, dass eine Aktivierung von p38 mit der Induktion von Apoptose assoziiert ist und das p38 die Translokation des proapoptotischen Faktors Bax zur Mitochondrienmembran durch dessen Phosphorylierung bewirken kann. Dies konnte in humanen Hepatozyten und Keratinozyten gezeigt werden (Kim et al., 2006a; Van Laethem et al., 2004). Für JNK konnte dieser Zusammenhang in Hepatozyten ebenfalls nach Staurosporin-induzierter Apoptose bestätigt werden (Kim et al., 2006a; Lee et al., 2005). In Neuronen konnte ebenfalls eine JNK-abhängige Induktion von Apoptose über die Phosphorylierung von Bax nachgewiesen werden (Harris and Johnson, 2001). Ob dieser Zusammenhang auch bei der GnRH-II Antagonisten-induzierten Apoptose besteht, ist noch zu klären, wäre aber denkbar (Abb. 5.2.).

#### **5.2.4 GNRH REZEPTOR VERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTION**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die GnRH-II Antagonisten auch am hypophysären GnRH-I Rezeptor wirken. In Rezeptor-Bindungs-Assays wurde am murinen GnRH-I Rezeptor eine antagonistische Aktivität der verwendeten Substanzen bestätigt. Die hohe Affinität ist vergleichbar mit der des GnRH-I Antagonisten Cetrorelix. Der GnRH-II Agonist [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II hingegen hat eine geringere Affinität zum GnRH-I Rezeptor als die verwendeten Antagonisten. Es ist zu vermuten, dass der Agonist eine höhere Affinität zum GnRH-II Rezeptor besitzt. Eine Aktivität am GnRH-I Rezeptor konnte bereits bestätigt werden (Kim et al., 2006b). Ein etabliertes humanes GnRH-II Rezeptor Modell ist aufgrund des bisher nicht vollständig nachgewiesenen GnRH-II Rezeptors nicht verfügbar. Für weitere Bindungs-

Studien könnte man eventuell mit Affen GnRH-II Rezeptor-cDNA transfizierte Zellen verwenden. Allerdings unterscheidet sich der humane putative GnRH-II Rezeptor vom Affen GnRH-II Rezeptor, da vermutet wird, dass der humane Rezeptor nur ein 5-TMR ist, im Gegensatz zum 7-TMR des Affen (Eicke et al., 2005; Neill, 2002b).

Zwischen dem vermuteten GnRH-II Rezeptor und dem GnRH-I Rezeptor besteht ein *cross-talk*. Der GnRH-I Antagonist Cetrorelix bindet an beide Rezeptoren und wirkt antagonistisch am GnRH-I Rezeptor und als Agonist am GnRH-II Rezeptor (Gründker et al., 2004). Dies konnte an GnRH-I Rezeptor negativen gynäkologischen Karzinomzelllinien nachgewiesen werden, in denen Cetrorelix und der GnRH-II Agonist [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II antiproliferativ wirken, während der GnRH-I Agonist Triptorelin keine antiproliferativen Effekte mehr induzieren konnte. Ähnliche Bindungsverhältnisse könnten durch die GnRH-II Antagonisten hervorgerufen werden, die als Antagonisten am murinen hypophysären GnRH-I Rezeptor wirken. In dieser Arbeit durchgeführte GnRH-I Rezeptor *knock down* Experimente konnten eine Restaktivität in der mitogenen Signaltransduktion zeigen. Die Aktivität von p38 konnte durch den Rezeptor *knock down* nicht vollständig blockiert werden. Die Signalwege scheinen also über beide Rezeptoren vermittelt zu werden, sowohl durch den GnRH-I Rezeptor als auch durch den GnRH-II Rezeptor. Da die Bindungs-Assays an Hypophysenzellen und Fibroblasten durchgeführt wurden, kann man einen vollständigen Antagonismus in Karzinomzellen nicht bestätigen, da die Aktivierung der Signaltransduktion Zellkontext-abhängig ist (Dobkin-Bekman et al., 2006). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die GnRH-II Antagonisten-induzierte Apoptose über den GnRH-I Rezeptor vermittelt wird.

Castellon *et al.* konnte im Prostatakarzinom zeigen, dass Rezeptor positive Tumoren nicht zwischen Agonisten und Antagonisten in der Signaltransduktion zu unterscheiden scheinen (Castellon et al., 2006). Dies könnte ebenfalls auf die Präsenz zwei verschiedener GnRH Rezeptoren hindeuten, an denen GnRH Analoga sowohl als Agonisten als auch als Antagonisten wirken.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass GnRH-II Antagonisten über beide GnRH Rezeptoren aktiv sind. Durch eine spezifische

Bindung an die Rezeptoren können außerdem verschiedene Konformationszustände des Liganden-Rezeptor-Komplexes eingegangen werden, die zu unterschiedlichen Signaltransduktionen führen, die nicht durch einen vollständigen Antagonismus bestimmt sind.

## **5.3 EFFEKTE DER GNRH-II ANTAGONISTEN *IN VIVO***

### **5.3.1 INHIBITION DES TUMORWACHSTUM**

Durch die Behandlung xenotransplantierter Tumore weiblicher Nacktmäuse mit den für diese Arbeit entwickelten GnRH-II Antagonisten konnte im Ovarialkarzinom eine Wachstumsinhibition der Tumoren im Vergleich zu den unbehandelten Tieren erreicht werden. Eine noch deutlichere Inhibition des Wachstums konnte durch die Behandlung der Endometriumkarzinomzelllinie Hec-1B mit GnRH-II Antagonisten erzielt werden. Die xenotransplantierten Tumore sind durch die Therapie in ihrer Größe unverändert geblieben. In den verschiedenen Mammakarzinomzellen ist das Ansprechen auf die Behandlung sehr unterschiedlich verlaufen. Die xenotransplantierte Mammakarzinomzelllinien MCF-7 verhält sich *in vivo* durch schlechte Anwachsrate ungünstiger als die aggressive Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435. Die Zellen wachsen nur sehr langsam an und die Tumoren wurden im Verlauf der Therapie nach einem Wachstumsschub in den Kontrolltumoren wieder kleiner. Die Zellen scheinen sich nicht für ein geeignetes Tumormodell des Mammakarzinoms zu eignen, obwohl sie in Kombination mit Martigel gespritzt wurden. Allerdings schlägt hier die Therapie mit den GnRH-II Antagonisten besonders stark an und die Tumorgöße konnte um ca. 60 % reduziert werden. Die Tumorgöße bleibt auch bis zum Ende des Versuchs in allen mit GnRH-II Antagonisten behandelten Tumoren annähernd gleich groß. Jedoch ist nach zwei Wochen eine Zunahme des Tumolvolumens in der Gruppe mit Ant-2 behandelten Tieren zu beobachten. Die Wirkung des Antagonisten Ant-2 scheint nachzulassen. Eine Analyse des weiteren Verlaufs wäre interessant.

Die Wachstumsraten der Zelllinie MDA-MB-435 sind immens hoch und durch das aggressive Verhalten der Zellen kommt es *in vivo* auch gehäuft zu Metastasen in der Brust und in den Knochen. Umstritten ist die Herkunft der Zelllinie, da es Hinweise gibt, dass es sich um eine Melanomzelllinie handeln könnte und nicht um eine Mammakarzinomzelllinie (Ellison et al., 2002; Sellappan et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von GnRH-I und -II Rezeptoren in MDA-MB-435 gezeigt werden und macht somit eine Therapie mit GnRH Analoga sinnvoll, auch wenn es sich nicht um eine Mammakarzinomzelllinie handeln sollte. Die Expression von GnRH-II Rezeptoren im malignen Melanom konnte mittels Tissue Array ebenfalls bestätigt werden.

Eine Therapie ist aufgrund der hohen Wachstumsraten *in vivo* und dem aggressiven Verhalten der Zelllinie wenig nützlich und eine endokrine Therapie scheint hier wenig erfolgsversprechend zu sein. Die GnRH-II Antagonisten zeigen keine wachstumshemmenden Effekte auf diese Tumoren.

Bei der Therapie langsam wachsender Tumoren (Hec-1B und MCF-7) schlägt die endokrine Behandlung mit GnRH-II Antagonisten sehr gut an und das Wachstum der Tumoren kann blockiert oder die Größe der Tumoren sogar verkleinert werden. Dies spiegelt die Situation der endokrinen Therapie beim Menschen mit Endometrium- und Mammakarzinom sehr gut wieder. Beides sind gut auf Hormone ansprechende Tumoren, im Gegensatz zum Ovarialkarzinom, bei dem nur geringe Ansprechraten hervorgerufen werden können. Auch in dieser Arbeit konnten im Endometrium- und Mammakarzinom die besten Effekte erzielt werden.

Für GnRH Analoga konnten ähnliche Effekte *in vivo* bisher nur für GnRH-I Antagonisten nachgewiesen werden. Starke inhibierende Eigenschaften durch Cetrorelix im Ovarialkarzinom wurden von Yano *et al.* und Manetta *et al.* berichtet (Manetta et al., 1995; Yano et al., 1994). Im Prostatakarzinom konnte dies ebenfalls bestätigt werden (Jungwirth et al., 1997; Lamharzi et al., 1998). In männlichen Ratten konnten für Degarelix ebenfalls wachstumshemmende Effekte ermittelt werden (Princivalle et al., 2007). Für GnRH-I Agonisten sind bisher nur in Kombination mit anderen therapeutischen Maßnahmen Tumor-

verkleinernde Eigenschaften bekannt (Emons et al., 1996b; Jager et al., 1995; Martinetti et al., 2000; Medl et al., 1993).

Die als Kontrolle eingesetzten GnRH Agonisten Triptorelin und [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II schließen eine Inhibition des Wachstums über die Blockade der Hypophysen-Gonaden-Achse aus.

Die in dieser Arbeit verwendeten GnRH-II Antagonisten eignen sich einerseits aufgrund ihrer starken wachstumshemmenden Eigenschaften und andererseits aufgrund der nicht beobachteten Nebenwirkungen für die Therapie GnRH Rezeptor-positiver gynäkologischer Tumoren. Akute, längerfristig auftretende Nebenwirkungen aufgrund einer chronischen Therapie müssen in weiteren Tierversuchen abgeklärt werden.

### 5.3.2 INDUKTION VON APOPTOSE *IN VIVO*

Die starken wachstumshemmenden Effekte auf die xenotransplantierten Tumoren wurden post-therapeutisch analysiert, um zu bestätigen, dass es sich hier ebenfalls um apoptotische Ereignisse handelt. Dabei konnte in dieser Arbeit im TUNEL Assay erstmals gezeigt werden, dass Apoptose durch GnRH Analoga auch *in vivo* induziert wird. Dies wurde an Paraffinschnitten der Tumoren untersucht. Da GnRH-I Agonisten *in vitro* zwar starke wachstumshemmende Eigenschaften aufweisen, allerdings *in vivo* keine direkten Effekte auf die Tumoren besitzen, sondern die Wirkung hier über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse reguliert wird, ist davon auszugehen, dass durch GnRH-I Agonisten keine Apoptose induziert wird. Die Induktion von Apoptose im Tumor durch die Therapie mit GnRH-I Antagonisten konnte bisher auch nicht nachgewiesen werden. Lediglich in Testikeln des Goldfisches konnte die Induktion von Apoptose mittels Quantifizierung der DNA-Fragmentierung bestimmt werden (Andreu-Vieyra and Habibi, 2001).

### 5.3.3 GNRH REZEPTOR-DOWNREGULATION

Die Gonadotropin-Releasing Hormon Rezeptoren gehören zur Familie der *rhodopsin-like GPCRs* und aktivieren nach Konformationsänderung durch Ligandenbindung in der Hypophyse die heterotrimeren G-Proteine  $\alpha_{q/11}$  (Hsieh

and Martin, 1992; Shah and Milligan, 1994). Im Gegensatz dazu wird in gynäkologischen Tumoren und im Prostatakarzinom das heterotrimere G-Protein  $\alpha_i$  aktiviert (Gründker et al., 2001b; Limonta et al., 1999). Von Kimura *et al.* konnte auch eine Aktivierung der G-Protein-Untereinheiten  $\beta/\gamma$  durch GnRH-I Agonisten in der Ovarialkarzinomzelllinie Caov-3 gezeigt werden (Kimura et al., 1999).

Der GnRH-I Rezeptor ist unter den GPCRs einzigartig, da ihm im Gegensatz zu anderen GPCRs, und auch zum GnRH-II Rezeptor, der carboxyterminale, zytoplasmatische Schwanz fehlt (Abb.1.2) (Willars et al., 1999). Dieser spielt bei der Regulierung der Rezeptoraktivität eine entscheidende Rolle (Ferguson, 2001). Die Agonisten-induzierte Internalisierung des GnRH-I Rezeptors verläuft somit bedeutend langsamer als die des GnRH-II Rezeptors (Pawson et al., 1998) und ist  $\beta$ -Arrestin unabhängig (Vrecl et al., 1998), allerdings Dynamin-abhängig (Heding et al., 2000). Ebenso verläuft die Internalisierung des GnRH-II Rezeptors, wobei von Ronacher *et al.* gezeigt werden konnte, dass die Gegenwart von  $\beta$ -Arrestin in COS-Zellen die Internalisierungsgeschwindigkeit des GnRH-II Rezeptors noch erhöht werden kann (Ronacher et al., 2004).

Eine kontinuierliche Exposition der hypophysären GnRH Rezeptoren mit GnRH-I Agonisten führt zu einer Desensibilisierung der Zellen gegenüber nativem GnRH und seinen Agonisten. In der Hypophyse kommt es durch die Therapie sowohl mit GnRH Agonisten als auch mit GnRH Antagonisten zur Downregulation der Rezeptorexpression (Kovacs et al., 2001). Dieser Mechanismus ist allerdings nur wenig verstanden.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Hormonrezeptorstatus und folglich die Downregulation der GnRH-Rezeptoren nach Beendigung der Xenotransplantatversuche im Tumor analysiert werden, da es sich um eine direkte Rezeptor-vermittelte Tumorthherapie handelt. Nach Analyse der mRNA-Expression der Rezeptoren für GnRH-I, GnRH-II, EGF und IGF und des Her2/neu erfolgte zusätzlich die Untersuchung der Proteinexpression mittels immunhistologischer Färbungen. Für keinen der analysierten Rezeptoren konnte eine Downregulation festgestellt werden. Eine kontinuierliche Rezeptor-vermittelte Therapie mit GnRH-II Antagonisten kann somit chronisch

durchgeführt werden, ohne dass die Dichte der Rezeptoren im Tumor abnimmt. Eine Desensibilisierung scheint aufgrund des guten Ansprechens *in vivo*, z.B. im Endometriumkarzinom mit Hec-1B Zellen, bei einem Therapieverlauf von drei Wochen nicht aufzutreten. Eine maximale Behandlungsdauer und wie sich die GnRH Rezeptorexpression daraufhin auswirkt, sollte in weiteren Tierexperimenten untersucht werden.

Nach der Behandlung diverser Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien mit dem GnRH-I Agonisten Triptorelin und dem GnRH-I Antagonisten Cetrorelix konnte nur eine geringe Verminderung der GnRH Rezeptorexpression in diesen Zellen nachgewiesen werden (Völker et al., 2002). Castellon *et al.* konnte in Prostatakarzinomzellen durch die Stimulation mit GnRH-I Analoga ebenfalls keine Downregulation der Rezeptoren nachweisen (Castellon et al., 2006). Der Mechanismus der Downregulation und Desensibilisierung in Tumorzellen scheint sich prinzipiell von dem der Hypophyse zu unterscheiden. Die Ursachen dafür sind noch unklar.

#### **5.3.4 WIRKUNG ÜBER DIE HYPOPHYSE**

Das Uterus-Ovarialgewicht gilt als Parameter für die Wirkung von GnRH Analoga über die Hypophyse, da aufgrund der Blockade der GnRH Rezeptoren die Östrogensynthese in den Ovarien zum Erliegen kommt. Daraus resultiert eine Volumen- und Gewichtsabnahme dieser Organe (Lan and Katzenellenbogen, 1976).

Die Wirkung der GnRH-II Antagonisten über die GnRH Rezeptoren der Hypophyse wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Bestimmung des Ovarial-Uterus-Gewichts der Nacktmäuse und durch die Mausserum-abhängige Proliferation von MCF-7 Mammakarzinomzellen analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass das Gewicht von Ovarien und Uterus der Nacktmäuse, die mit GnRH-II Antagonisten behandelt wurden, im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant reduziert war. Die GnRH-II Antagonisten wirken folglich auch über die hypophysären Rezeptoren.

Die Wirkung von GnRH-I Antagonisten über die Hypophyse wurde in männlichen Mäusen von Pareek *et al.* untersucht. Dabei wirkte sich die

Behandlung auf das Gewicht der Testikel bei mit Cetrorelix behandelten männlichen Mäusen aus. Auch hier konnte eine signifikante Reduktion des Volumens und Gewichts erreicht werden (Pareek et al., 2007). Für männliche Ratten konnten ähnliche Effekte beschrieben werden (Pinski et al., 1996).

Die Analyse der Serum-abhängigen Proliferation von humanen Mammakarzinomzellen MCF-7 wurden mittels E-Screen Assay durchgeführt (Korner et al., 1998). Die letzte subkutane Injektion der Nacktmäuse mit GnRH-II Antagonisten erfolgte zwei Tage vor der Sektion der Tiere und der Gewinnung des Serums. Der E-Screen Assay ergab eine signifikante Hemmung des Wachstums der Zellen, die mit dem Serum von mit GnRH-II Antagonisten behandelten Tieren koinkubiert wurden. Das Östrogen im Serum wirkt als Wachstumsfaktor, der bei Entzug zu einer verminderten Proliferation führt. Die Seren der mit Ant-3 behandelten Tiere wirkten am wenigsten proliferativ.

Es ist auszuschließen, dass die antiproliferative Wirkung durch im Serum verbliebene GnRH-II Antagonisten induziert wird, was auf einer erhöhten Halbwertszeit der Dekapeptide im Vergleich zum nativen Protein beruhen würde. Für den strukturell ähnlichen GnRH-I Antagonisten Cetrorelix wurden Serum-Halbwertszeiten von 9,2 h bis 54,5 h ermittelt (Nagaraja et al., 2003). Für einen weiteren GnRH-I Antagonisten, Degarelix, konnte eine Halbwertszeit von 40 h nachgewiesen werden (Jadhav et al., 2006). Degarelix unterscheidet sich von den in dieser Arbeit verwendeten Substanzen jedoch durch den Einbau von zwei weiteren nicht-natürlichen Aminosäuren, die die Halbwertszeit und Stabilität des Antagonisten noch zusätzlich erhöhen. Der Effekt der antiproliferativen Wirkung im E-Screen Assay beruht folglich auf dem reduzierten Östrogenspiegel im Serum.

Durch Triptorelin konnte keine signifikante Hemmung des Wachstums der Mammakarzinomzellen erzielt werden, was mit einer geringeren Reduzierung des Serum-Östrogenspiegels verbunden ist, im Vergleich zu den Seren der mit GnRH-II Antagonisten behandelten Tiere. Die Wirkung der GnRH Agonisten setzt aufgrund des initialen *flare up* Effekts jedoch erst nach ungefähr zehn bis 14 Tagen ein. Mit einer vergleichbaren Reduktion des Östrogenspiegels ist

jedoch nicht zu rechnen. Bei xenotransplantierten Ratten mit Prostatakarzinom, die mit dem GnRH-I Antagonisten Degarelix behandelt wurden, konnten Testosteronlevel gemessen werden, die mit der chirurgischen Kastration vergleichbar sind (Princivalle et al., 2007). Triptorelin konnte vergleichbar keine so starke Reduktion des Testosteron-Serumspiegels induzieren. Ähnliche Effekte sind auch durch die Behandlung mit GnRH-II Antagonisten zu erwarten. Die antiöstrogene Wirkung der GnRH-II Antagonisten scheint somit bedeutend größer zu sein, als die der GnRH-I Agonisten. Die verwendeten GnRH-II Antagonisten wirken somit nicht nur direkt an den Rezeptoren des Tumors sondern auch über die Hypophyse und sind für die Reduktion des LH und FSH-Spiegels verantwortlich, was in einem reduzierten Serum-Östrogenspiegel resultiert. Die genaue Bestimmung der Gonadotropine LH und FSH und des Steroidhormons Östrogen im Serum muss in weiteren Experimenten bestimmt werden, um explizite Aussagen über die Auswirkung auf diese Hormone treffen zu können.

### **5.3.5 THERAPEUTISCHER EINSATZ VON GNRH-II ANTAGONISTEN**

Die aus dieser Arbeit hervorgegangen Ergebnisse der *in vivo* Versuche zeigen, dass sich GnRH-II Antagonisten hervorragend für eine endokrine Therapie gynäkologischer Karzinome eignen würden. Die besten Effekte wurden hier in langsam wachsenden Tumoren erzielt, was in physiologischer Hinsicht dem Menschen am nächsten kommt. Die Therapie beruht auf einer direkten Rezeptor-vermittelten Induktion von Apoptose im Tumor.

Die humane GnRH-II Rezeptor Verteilung im Körper ist für eine Therapie allerdings eher ungünstig, da in dieser Arbeit auf Proteinebene an Gewebeschnitten gezeigt werden konnte, dass der GnRH-II Rezeptor ubiquitär unterschiedlich stark exprimiert vorkommt. Dies konnte auf RNA-Ebene von Neill ebenfalls nachgewiesen werden (Neill, 2002b). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die GnRH-II Antagonisten mit hoher Affinität an den GnRH-I Rezeptor binden und eine Signalkaskade induzieren. Sollte der GnRH-II Rezeptor nicht als funktionelles Protein vorliegen, wäre die Rezeptorverteilung für eine Therapie sehr vorteilhaft, da der GnRH-I Rezeptor nicht ubiquitär

vorkommt, sondern nur in der Hypophyse und Organen des Reproduktionstrakts und Tumoren dieser. In weiteren *in vivo* Versuchen könnte post-therapeutisch eine Untersuchung der inneren Mausorgane vorgenommen werden, um die Wirkung der GnRH-II Antagonisten auf diese zu analysieren. Falls GnRH-II Rezeptoren auch in diesen Organen exprimiert werden, muss die Möglichkeit der Apoptose-Induktion hier ausgeschlossen werden. Allerdings ging es den Tieren im gesamten Verlauf der durchgeführten *in vivo* Experimente gut und es konnten keine sichtbaren Nebenwirkungen beobachtet werden.

## 5.4 FAZIT UND AUSBLICK

Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse zeigen, dass GnRH-II Antagonisten bereits in nanomolaren Konzentrationen Apoptose in gynäkologischen Karzinomzellen und Mammakarzinomzellen induzieren. GnRH-II Antagonisten interagieren wie andere GnRH Analoga mit der MAPK Signalkaskade. Allerdings aktivieren sie dabei die Stress-aktivierten MAPKs p38/SAPK2 und JNK/SAPK1. Ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung dieser MAPK und Apoptose konnte bereits gezeigt werden. Die Apoptose wird hier durch den intrinsischen Signalweg über die Mitochondrien vermittelt, resultiert in einer Aktivierung der Caspase-3 und der letztendlichen DNA-Fragmentierung im Nukleus. Die morphologischen Anzeichen der Apoptose konnten im Phasenkontrastmikroskop deutlich verfolgt werden. Durch diese Arbeit konnte ebenfalls eine Interaktion der GnRH-II Antagonisten mit dem GnRH-I Rezeptor gezeigt werden. Die Signaltransduktion scheint allerdings durch beide GnRH Rezeptoren vermittelt zu werden. *In vivo* konnten ebenfalls starke wachstumsinhibierende Effekte, z.B. im Endometriumkarzinom, nachgewiesen werden. Erstmals konnte die Induktion von Apoptose in gynäkologischen Karzinomen auch *in vivo* bestätigt werden.

Für eine endokrine Therapie sind GnRH-II Antagonisten wahrscheinlich sehr gut geeignet, da sie nicht nur über die Rezeptoren der Hypophyse wirken, sondern auch direkt Rezeptor-vermittelt im Tumor. Therapeutisch gesehen sind GnRH-II Antagonisten auch in Bereichen einsetzbar, in denen bereits GnRH-I

Analoga Verwendung finden. Durch den Vorteil eines vermiedenen *flare up* Effekts und der sofort einsetzenden Wirkung sind sie z.B. auch in Bereichen der Reproduktion und frühzeitigen Pubertät einsetzbar, da sie über die Rezeptoren der Hypophyse wirken. Dies konnte *in vivo* bestätigt werden.

In der Therapie steroidhormonabhängiger Tumoren werden GnRH-I Analoga bereits eingesetzt um die Steroidhormonsynthese durch Inhibition der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse zu blockieren. Ein völlig neuer Ansatzpunkt könnte in der direkten Rezeptor-vermittelten Therapie liegen, bei der die Rezeptoren der Karzinome von entscheidender Bedeutung sind. Es ist bekannt, dass Endometrium- und Ovarialkarzinome zu 80 % und Mammakarzinome zu 50 % Rezeptoren für GnRH-I exprimieren. Da es im Tumor durch die Behandlung mit GnRH-II Antagonisten nicht zu einer Desensibilisierung und Downregulation der Rezeptordichte kommt, kann eine chronische Therapie durchaus ihren Einsatz finden.

In dieser Arbeit konnte somit erstmals der direkte Einsatz von GnRH-II Antagonisten in der endokrinen Therapie *in vivo* gezeigt und die grundlegenden Signalmechanismen, die zur Induktion von Apoptose führen, aufgeklärt werden.

## 6 LITERATURANGABEN

- Ahmed, S.A., Gogal, R.M., Jr. and Walsh, J.E. (1994) A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods*, **170**, 211-224.
- Akhmedkhanov, A., Zeleniuch-Jacquotte, A. and 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.
- Allen, R.T., Hunter, W.J., 3rd and Agrawal, D.K. (1997) Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods*, **37**, 215-228.
- Amoss, M., Burgus, R., Blackwell, R., Vale, W., Fellows, R. and Guillemin, R. (1971) Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem Biophys Res Commun*, **44**, 205-210.
- Andreu-Vieyra, C.V. and Habibi, H.R. (2001) Effects of salmon GnRH and chicken GnRH-II on testicular apoptosis in goldfish (*Carassius auratus*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **129**, 483-487.
- Angelucci, C., Iacopino, F., Lama, G., Capucci, S., Zelano, G., Boca, M., Pistilli, A. and Sica, G. (2004) Apoptosis-related gene expression affected by a GnRH analogue without induction of programmed cell death in LNCaP cells. *Anticancer Res*, **24**, 2729-2738.
- Apter, D., Reinila, M. and Vihko, R. (1989) Some endocrine characteristics of early menarche, a risk factor for breast cancer, are preserved into adulthood. *Int J Cancer*, **44**, 783-787.
- Bajusz, S., Csernus, V.J., Janaky, T., Bokser, L., Fekete, M. and Schally, A.V. (1988) New antagonists of LHRH. II. Inhibition and potentiation of LHRH by closely related analogues. *Int J Pept Protein Res*, **32**, 425-435.
- Beatson, G. (1896) Suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *The Lancet*, **2**, 104-107.

- Bernstein, L., Deapen, D., Cerhan, J.R., Schwartz, S.M., Liff, J., McGann-Maloney, E., Perlman, J.A. and Ford, L. (1999) Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 1654-1662.
- Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, **361**, 315-325.
- Bertram, G., Innes, S., Minella, O., Richardson, J. and Stansfield, I. (2001) Endless possibilities: translation termination and stop codon recognition. *Microbiology*, **147**, 255-269.
- Bifulco, G., Miele, C., Pellicano, M., Trencia, A., Ferraioli, M., Paturzo, F., Tommaselli, G.A., Beguinot, F. and Nappi, C. (2004) Molecular mechanisms involved in GnRH analogue-related apoptosis for uterine leiomyomas. *Mol Hum Reprod*, **10**, 43-48.
- Bilotas, M., Baranao, R.I., Buquet, R., Sueldo, C., Tesone, M. and Meresman, G. (2006) Effect of GnRH analogues on apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, Fas and FasL proteins in endometrial epithelial cell cultures from patients with endometriosis and controls. *Hum Reprod*.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bloom, H.J. and Richardson, W.W. (1957) Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*, **11**, 359-377.
- Bonfil, D., Chuderland, D., Kraus, S., Shahbazian, D., Friedberg, I., Seger, R. and Naor, Z. (2004) Extracellular signal-regulated kinase, Jun N-terminal kinase, p38, and c-Src are involved in gonadotropin-releasing hormone-stimulated activity of the glycoprotein hormone follicle-stimulating hormone beta-subunit promoter. *Endocrinology*, **145**, 2228-2244.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Bristow, R.E. (1999) Endometrial cancer. *Curr Opin Oncol*, **11**, 388-393.

- Brueggemeier, R.W., Hackett, J.C. and Diaz-Cruz, E.S. (2005) Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocr Rev*, **26**, 331-345.
- Bruning, P.F. (1992) Droloxifene, a new anti-oestrogen in postmenopausal advanced breast cancer: preliminary results of a double-blind dose-finding phase II trial. *Eur J Cancer*, **28A**, 1404-1407.
- Burgus, R., Butcher, M., Amoss, M., Ling, N., Monahan, M., Rivier, J., Fellows, R., Blackwell, R., Vale, W. and Guillemin, R. (1972) Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF) (LH-hypothalamus-LRF-gas chromatography-mass spectrometry-decapeptide-Edman degradation). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 278-282.
- Cailleau, R., Olive, M. and Cruciger, Q.V. (1978) Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, **14**, 911-915.
- Carolsfeld, J., Powell, J.F., Park, M., Fischer, W.H., Craig, A.G., Chang, J.P., Rivier, J.E. and Sherwood, N.M. (2000) Primary structure and function of three gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, from an ancient teleost, herring. *Endocrinology*, **141**, 505-512.
- Castellon, E., Clementi, M., Hitschfeld, C., Sanchez, C., Benitez, D., Saenz, L., Contreras, H. and 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**, 261-268.
- Chang, F., Steelman, L.S., Shelton, J.G., Lee, J.T., Navolanic, P.M., Blalock, W.L., Franklin, R. and McCubrey, J.A. (2003) Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol*, **22**, 469-480.
- Chegini, N., Rong, H., Dou, Q., Kipersztok, S. and Williams, R.S. (1996) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in human myometrium and leiomyomata and the direct action of GnRH analogs on myometrial smooth muscle cells and interaction with ovarian steroids in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, **81**, 3215-3221.

- Chen, A., Yahalom, D., Ben-Aroya, N., Kaganovsky, E., Okon, E. and Koch, Y. (1998) A second isoform of gonadotropin-releasing hormone is present in the brain of human and rodents. *FEBS Lett*, **435**, 199-203.
- Chen, W., Yoshida, S., Ohara, N., Matsuo, H., Morizane, M. and Maruo, T. (2005) Gonadotropin-releasing hormone antagonist cetrorelix down-regulates proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor expression and up-regulates apoptosis in association with enhanced poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase expression in cultured human leiomyoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **90**, 884-892.
- Claus, E.B., Risch, N. and Thompson, W.D. (1994) Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. *Cancer*, **73**, 643-651.
- Collins, J.A., Schandi, C.A., Young, K.K., Vesely, J. and Willingham, M.C. (1997) Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem*, **45**, 923-934.
- Conn, P.M. and Crowley, W.F., Jr. (1991) Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *N Engl J Med*, **324**, 93-103.
- Cusan, L., Auclair, C., Belanger, A., Ferland, L., Kelly, P.A., Seguin, C. and Labrie, F. (1979) Inhibitory effects of long term treatment with a luteinizing hormone-releasing hormone agonist on the pituitary-gonadal axis in male and female rats. *Endocrinology*, **104**, 1369-1376.
- Dao, T.L. and Huggins, C. (1955) Bilateral adrenalectomy in the treatment of cancer of the breast. *AMA Arch Surg*, **71**, 645-657.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M.E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, **91**, 231-241.
- de Souza, P.L. and Friedlander, M.L. (1992) Prognostic factors in ovarian cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*, **6**, 761-782.
- Didenko, V.V. and Hornsby, P.J. (1996) Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. *J Cell Biol*, **135**, 1369-1376.

- Dobkin-Bekman, M., Naidich, M., Pawson, A.J., Millar, R.P., Seger, R. and Naor, Z. (2006) Activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) by GnRH is cell-context dependent. *Mol Cell Endocrinol*, **252**, 184-190.
- Dowsett, M., Martin, L.A., Smith, I. and Johnston, S. (2005) Mechanisms of resistance to aromatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **95**, 167-172.
- Dubois, E.A., Zandbergen, M.A., Peute, J. and Goos, H.J. (2002) Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. *Brain Res Bull*, **57**, 413-418.
- Eicke, N., Günthert, A.R., Emons, G. and Gründker, C. (2006) GnRH-II agonist [D-Lys6]GnRH-II inhibits the EGF-induced mitogenic signal transduction in human endometrial and ovarian cancer cells. *Int J Oncol*, **29**, 1223-1229.
- Eicke, N., Günthert, A.R., Viereck, V., Siebold, D., Behe, M., Becker, T., Emons, G. and Gründker, C. (2005) GnRH-II receptor-like antigenicity in human placenta and in cancers of the human reproductive organs. *Eur J Endocrinol*, **153**, 605-612.
- Ellison, G., Klinowska, T., Westwood, R.F., Docter, E., French, T. and Fox, J.C. (2002) Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435. *Mol Pathol*, **55**, 294-299.
- Emons, G. (2001) [Hormone replacement therapy after menopause]. *Dtsch Med Wochenschr*, **126**, 253-254.
- Emons, G., Gründker, C., Günthert, A.R., Westphalen, S., Kavanagh, J. and Verschraegen, C. (2003) GnRH antagonists in the treatment of gynecological and breast cancers. *Endocr Relat Cancer*, **10**, 291-299.
- Emons, G., Huschmand-Nia, A., Krauss, T. and Hinney, B. (2004) Hormone replacement therapy and endometrial cancer. *Onkologie*, **27**, 207-210.
- Emons, G., Muller, V., Ortmann, O., Grossmann, G., Trautner, U., Stuckrad, B.V., Schulz, K.D. and Schally, A.V. (1996a) Luteinizing hormone-releasing hormone agonist triptorelin antagonizes signal transduction and mitogenic activity of epidermal growth factor in human ovarian and endometrial cancer cell lines. *Int J Oncol*, **9**, 1129-1137.

- Emons, G., Ortmann, O., Becker, M., Irmer, G., Springer, B., Laun, R., Holzel, F., Schulz, K.D. and Schally, A.V. (1993a) High affinity binding and direct antiproliferative effects of LHRH analogues in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*, **53**, 5439-5446.
- Emons, G., Ortmann, O. and Schulz, K.D. (1993b) [The role of endocrine therapy in ovarian cancer]. *Gynakologe*, **26**, 123-130.
- Emons, G., Ortmann, O., Schulz, K.D. and Schally, A.V. (1997) Growth inhibitory actions of luteinizing hormone-releasing hormone on tumor cells. *Trends Endocrinol Metab*, **8**, 355-362.
- Emons, G., Ortmann, O., Teichert, H.M., Fassl, H., Lohrs, U., Kullander, S., Kauppila, A., Ayalon, D., Schally, A. and Oberheuser, F. (1996b) Luteinizing hormone-releasing hormone agonist triptorelin in combination with cytotoxic chemotherapy in patients with advanced ovarian carcinoma. A prospective double blind randomized trial. Decapeptyl Ovarian Cancer Study Group. *Cancer*, **78**, 1452-1460.
- Emons, G., Schroder, B., Ortmann, O., Westphalen, S., Schulz, K.D. and Schally, A.V. (1993c) High affinity binding and direct antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone analogs in human endometrial cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab*, **77**, 1458-1464.
- Emons, G. and Schulz, K.D. (2000) Primary and salvage therapy with LH-RH analogues in ovarian cancer. *Recent Results Cancer Res*, **153**, 83-94.
- Engel, J.B., Griesinger, G., Schultze-Mosgau, A., Felberbaum, R. and Diedrich, K. (2006) GnRH agonists and antagonists in assisted reproduction: pregnancy rate. *Reprod Biomed Online*, **13**, 84-87.
- Fekete, M., Wittliff, J.L. and Schally, A.V. (1989) Characteristics and distribution of receptors for [D-TRP6]-luteinizing hormone-releasing hormone, somatostatin, epidermal growth factor, and sex steroids in 500 biopsy samples of human breast cancer. *J Clin Lab Anal*, **3**, 137-147.
- Felberbaum, R.E., Ludwig, M. and Diedrich, K. (2000) Clinical application of GnRH-antagonists. *Mol Cell Endocrinol*, **166**, 9-14.

- Ferguson, S.S. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, **53**, 1-24.
- Figueroa, C., Tarras, S., Taylor, J. and Vojtek, A.B. (2003) Akt2 negatively regulates assembly of the POSH-MLK-JNK signaling complex. *J Biol Chem*, **278**, 47922-47927.
- Fink, G. (1976) The development of the releasing factor concept. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **5 Suppl**, 245S-260S.
- Fister, S., Günthert, A.R., Emons, G. and Gründker, C. (2007a) Gonadotropin-Releasing Hormone Type II Antagonists Induce Apoptotic Cell Death in Human Endometrial and Ovarian Cancer Cells In vitro and In vivo. *Cancer Res*, **67**, 1750-1756.
- Fister, S., Schlotawa, L., Günthert, A.R., Emons, G. and Gründker, C. (2007b) Increase of doxorubicin-induced apoptosis after knock-down of gonadotropin-releasing hormone receptor expression in human endometrial, ovarian and breast cancer cells. *Gynecol Endocrinol*, 1-6.
- Flouret, G., Mahan, K. and Majewski, T. (1992) Decreased histamine release by luteinizing hormone-releasing hormone antagonists obtained upon translocation of the cationic amino acid from position 8 to position 7. *J Med Chem*, **35**, 636-640.
- Fogh, J., Wright, W.C. and Loveless, J.D. (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst*, **58**, 209-214.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R. and Cantley, L.C. (1997) PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, **88**, 435-437.
- Freake, H.C., Marcocci, C., Iwasaki, J. and MacIntyre, I. (1981) 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> specifically binds to a human breast cancer cell line (T47D) and stimulates growth. *Biochem Biophys Res Commun*, **101**, 1131-1138.
- Galli, M.C., De Giovanni, C., Nicoletti, G., Grilli, S., Nanni, P., Prodi, G., Gola, G., Rocchetta, R. and Orlandi, C. (1981) The occurrence of multiple

- steroid hormone receptors in disease-free and neoplastic human ovary. *Cancer*, **47**, 1297-1302.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S.A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, **119**, 493-501.
- Giampietro, F., Sancilio, S., Tiboni, G.M., Rana, R.A. and Di Pietro, R. (2006) Levels of apoptosis in human granulosa cells seem to be comparable after therapy with a gonadotropin-releasing hormone agonist or antagonist. *Fertil Steril*, **85**, 412-419.
- Glasel, J.A. (1995) Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*, **18**, 62-63.
- Godwin, A.K., Testa, J.R. and Hamilton, T.C. (1993) The biology of ovarian cancer development. *Cancer*, **71**, 530-536.
- Gogvadze, V., Orrenius, S. and Zhivotovsky, B. (2006) Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, **1757**, 639-647.
- Goldenberg, M.M. (1999) Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Ther*, **21**, 309-318.
- Goldhirsch, A., Glick, J.H., Gelber, R.D., Coates, A.S., Thurlimann, B. and Senn, H.J. (2005) Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol*, **16**, 1569-1583.
- Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I. and Green, D.R. (2000) The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol*, **2**, 156-162.
- Goodman, M.T. and Howe, H.L. (2003) Descriptive epidemiology of ovarian cancer in the United States, 1992-1997. *Cancer*, **97**, 2615-2630.
- Goodwin, P.J., DeBoer, G., Clark, R.M., Catton, P., Redwood, S., Hood, N. and Boyd, N.F. (1995) Cyclical mastopathy and premenopausal breast cancer risk. Results of a case-control study. *Breast Cancer Res Treat*, **33**, 63-73.

- Gordon, K., Irianni, F. and Hodgen, G.D. (1993) Management of pituitary gonadal function via gonadotrophin releasing hormone (GnRH) antagonists, including ovulation induction by co-administration of either gonadotrophins or pulsatile GnRH. *Hum Reprod*, **8 Suppl 2**, 204-209.
- Gründker, C., Günthert, A.R., Millar, R.P. and Emons, G. (2002a) Expression of gonadotropin-releasing hormone II (GnRH-II) receptor in human endometrial and ovarian cancer cells and effects of GnRH-II on tumor cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 1427-1430.
- Gründker, C., Günthert, A.R., Westphalen, S. and Emons, G. (2002b) Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers. *Eur J Endocrinol*, **146**, 1-14.
- Gründker, C., Schlotawa, L., Viereck, V., Eicke, N., Horst, A., Kairies, B. and Emons, G. (2004) Antiproliferative effects of the GnRH antagonist cetrorelix and of GnRH-II on human endometrial and ovarian cancer cells are not mediated through the GnRH type I receptor. *Eur J Endocrinol*, **151**, 141-149.
- Gründker, C., Schlotawa, L., Viereck, V. and Emons, G. (2001a) Protein kinase C-independent stimulation of activator protein-1 and c-Jun N-terminal kinase activity in human endometrial cancer cells by the LHRH agonist triptorelin. *Eur J Endocrinol*, **145**, 651-658.
- Gründker, C., Schulz, K., Günthert, A.R. and Emons, G. (2000a) Luteinizing hormone-releasing hormone induces nuclear factor kappaB-activation and inhibits apoptosis in ovarian cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 3815-3820.
- Gründker, C., Völker, P. and Emons, G. (2001b) Antiproliferative signaling of luteinizing hormone-releasing hormone in human endometrial and ovarian cancer cells through G protein alpha(I)-mediated activation of phosphotyrosine phosphatase. *Endocrinology*, **142**, 2369-2380.
- Gründker, C., Völker, P., Schulz, K.D. and Emons, G. (2000b) Luteinizing hormone-releasing hormone agonist triptorelin and antagonist cetrorelix inhibit EGF-induced c-fos expression in human gynecological cancers. *Gynecol Oncol*, **78**, 194-202.

- Günthert, A.R., Gründker, C., Oloa, A., Lasche, J., Eicke, N. and Emons, G. (2005) Analogs of GnRH-I and GnRH-II inhibit epidermal growth factor-induced signal transduction and resensitize resistant human breast cancer cells to 4OH-tamoxifen. *Eur J Endocrinol*, **153**, 613-625.
- Gusberg, S.B. (1990) Tamoxifen for breast cancer: associated endometrial cancer. *Cancer*, **65**, 1463-1464.
- Hamilton, T.C., Young, R.C., McKoy, W.M., Grotzinger, K.R., Green, J.A., Chu, E.W., Whang-Peng, J., Rogan, A.M., Green, W.R. and Ozols, R.F. (1983) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res*, **43**, 5379-5389.
- Harris, C.A. and Johnson, E.M., Jr. (2001) BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *J Biol Chem*, **276**, 37754-37760.
- Harris, D., Bonfil, D., Chuderland, D., Kraus, S., Seger, R. and Naor, Z. (2002) Activation of MAPK cascades by GnRH: ERK and Jun N-terminal kinase are involved in basal and GnRH-stimulated activity of the glycoprotein hormone LHbeta-subunit promoter. *Endocrinology*, **143**, 1018-1025.
- Heding, A., Vrecl, M., Hanyaloglu, A.C., Sellar, R., Taylor, P.L. and Eidne, K.A. (2000) The rat gonadotropin-releasing hormone receptor internalizes via a beta-arrestin-independent, but dynamin-dependent, pathway: addition of a carboxyl-terminal tail confers beta-arrestin dependency. *Endocrinology*, **141**, 299-306.
- Hershkovitz, E., Marbach, M., Bosin, E., Levy, J., Roberts, C.T., Jr., LeRoith, D., Schally, A.V. and Sharoni, Y. (1993) Luteinizing hormone-releasing hormone antagonists interfere with autocrine and paracrine growth stimulation of MCF-7 mammary cancer cells by insulin-like growth factors. *J Clin Endocrinol Metab*, **77**, 963-968.
- Hoffman, M.A. and Khan, A. (2006) Durable response of metastatic endometrial carcinoma to treatment with fulvestrant (Faslodex) after prior progestin and anastrozole therapy. *Gynecol Oncol*, **100**, 439-441.

- Hopkins, C.R. and Gregory, H. (1977) Topographical localization of the receptors for luteinizing hormone-releasing hormone on the surface of dissociated pituitary cells. *J Cell Biol*, **75**, 528-540.
- Horwitz, R.I., Feinstein, A.R., Vidone, R.A., Sommers, S.C. and Robboy, S.J. (1981) Histopathologic distinctions in the relationship of estrogens and endometrial cancer. *Jama*, **246**, 1425-1427.
- Hsieh, K.P. and Martin, T.F. (1992) Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins Gq and G11. *Mol Endocrinol*, **6**, 1673-1681.
- Hsueh, A.J. and Jones, P.B. (1981) Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Rev*, **2**, 437-461.
- Imai, A., Sugiyama, M., Furui, T. and Tamaya, T. (2006) Gi protein-mediated translocation of serine/threonine phosphatase to the plasma membrane and apoptosis of ovarian cancer cell in response to gonadotropin-releasing hormone antagonist cetrorelix. *J Obstet Gynaecol*, **26**, 37-41.
- Irmer, G., Burger, C., Ortmann, O., Schulz, K.D. and Emons, G. (1994) Expression of luteinizing hormone releasing hormone and its mRNA in human endometrial cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab*, **79**, 916-919.
- Jadhav, P.R., Agerso, H., Tornøe, C.W. and Gobburu, J.V. (2006) Semi-mechanistic pharmacodynamic modeling for degarelix, a novel gonadotropin releasing hormone (GnRH) blocker. *J Pharmacokinetics Pharmacodyn*, **33**, 609-634.
- Jager, W., Sauerbrei, W., Beck, E., Maassen, V., Stumpfe, M., Meier, W., Kuhn, W. and Janicke, F. (1995) A randomized comparison of triptorelin and tamoxifen as treatment of progressive ovarian cancer. *Anticancer Res*, **15**, 2639-2642.
- Jeyarajah, A.R., Gallagher, C.J., Blake, P.R., Oram, D.H., Dowsett, M., Fisher, C. and Oliver, R.T. (1996) Long-term follow-up of gonadotrophin-releasing hormone analog treatment for recurrent endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, **63**, 47-52.

- Johnston, S.R., Martin, L.A., Head, J., Smith, I. and Dowsett, M. (2005) Aromatase inhibitors: combinations with fulvestrant or signal transduction inhibitors as a strategy to overcome endocrine resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **95**, 173-181.
- Jungwirth, A., Pinski, J., Galvan, G., Halmos, G., Szepeshazi, K., Cai, R.Z., Groot, K., Vadillo-Buenfil, M. and Schally, A.V. (1997) Inhibition of growth of androgen-independent DU-145 prostate cancer in vivo by luteinising hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix and bombesin antagonists RC-3940-II and RC-3950-II. *Eur J Cancer*, **33**, 1141-1148.
- Kakar, S.S., Grizzle, W.E. and Neill, J.D. (1994) The nucleotide sequences of human GnRH receptors in breast and ovarian tumors are identical with that found in pituitary. *Mol Cell Endocrinol*, **106**, 145-149.
- Kakar, S.S., Musgrove, L.C., Devor, D.C., Sellers, J.C. and Neill, J.D. (1992) Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **189**, 289-295.
- Karten, M.J. and Rivier, J.E. (1986) Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective. *Endocr Rev*, **7**, 44-66.
- Kasten, T.L., White, S.A., Norton, T.T., Bond, C.T., Adelman, J.P. and Fernald, R.D. (1996) Characterization of two new preproGnRH mRNAs in the tree shrew: first direct evidence for mesencephalic GnRH gene expression in a placental mammal. *Gen Comp Endocrinol*, **104**, 7-19.
- Katanoda, K. and Qiu, D. (2007) Comparison of Time Trends in Female Breast Cancer Incidence (1973 1997) in East Asia, Europe and USA, from Cancer Incidence in Five Continents, Vols IV VIII. *Jpn J Clin Oncol*, **37**, 638-639.
- Kauffman, A.S. (2004) Emerging functions of gonadotropin-releasing hormone II in mammalian physiology and behaviour. *J Neuroendocrinol*, **16**, 794-806.
- Keizer, J., Li, Y.X., Stojilkovic, S. and Rinzel, J. (1995) InsP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> excitability of the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, **6**, 945-951.

- Kennedy, B.J. (1962) Massive estrogen administration in premenopausal women with metastatic breast cancer. *Cancer*, **15**, 641-648.
- Kim, B.J., Ryu, S.W. and Song, B.J. (2006a) JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem*, **281**, 21256-21265.
- Kim, K.Y., Choi, K.C., Auersperg, N. and Leung, P.C. (2006b) Mechanism of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I and -II-induced cell growth inhibition in ovarian cancer cells: role of the GnRH-I receptor and protein kinase C pathway. *Endocr Relat Cancer*, **13**, 211-220.
- Kim, K.Y., Choi, K.C., Park, S.H., Auersperg, N. and Leung, P.C. (2005) Extracellular signal-regulated protein kinase, but not c-Jun N-terminal kinase, is activated by type II gonadotropin-releasing hormone involved in the inhibition of ovarian cancer cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab*, **90**, 1670-1677.
- Kim, K.Y., Choi, K.C., Park, S.H., Chou, C.S., Auersperg, N. and Leung, P.C. (2004) Type II gonadotropin-releasing hormone stimulates p38 mitogen-activated protein kinase and apoptosis in ovarian cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**, 3020-3026.
- Kimura, A., Ohmichi, M., Kurachi, H., Ikegami, H., Hayakawa, J., Tasaka, K., Kanda, Y., Nishio, Y., Jikihara, H., Matsuura, N. and Murata, Y. (1999) Role of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade in gonadotropin-releasing hormone-induced growth inhibition of a human ovarian cancer cell line. *Cancer Res*, **59**, 5133-5142.
- Kleinman, D., Douvdevani, A., Schally, A.V., Levy, J. and Sharoni, Y. (1994) Direct growth inhibition of human endometrial cancer cells by the gonadotropin-releasing hormone antagonist SB-75: role of apoptosis. *Am J Obstet Gynecol*, **170**, 96-102.
- Klijn, J.G. and de Jong, F.H. (1982) Treatment with a luteinising-hormone-releasing-hormone analogue (buserelin) in premenopausal patients with metastatic breast cancer. *Lancet*, **1**, 1213-1216.

- Klingmuller, D., Schepke, M., Enzweiler, C. and Bidlingmaier, F. (1993) Hormonal responses to the new potent GnRH antagonist Cetrorelix. *Acta Endocrinol (Copenh)*, **128**, 15-18.
- Knobil, E. (1990) The GnRH pulse generator. *Am J Obstet Gynecol*, **163**, 1721-1727.
- Korner, W., Hanf, V., Schuller, W., Bartsch, H., Zwirner, M. and Hagenmaier, H. (1998) Validation and application of a rapid in vitro assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals. *Chemosphere*, **37**, 2395-2407.
- Kovacs, M., Schally, A.V., Csernus, B. and Rekasi, Z. (2001) Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist Cetrorelix down-regulates the mRNA expression of pituitary receptors for LH-RH by counteracting the stimulatory effect of endogenous LH-RH. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1829-1834.
- Kraus, S., Levy, G., Hanoch, T., Naor, Z. and Seger, R. (2004) Gonadotropin-releasing hormone induces apoptosis of prostate cancer cells: role of c-Jun NH2-terminal kinase, protein kinase B, and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Cancer Res*, **64**, 5736-5744.
- Kraus, S., Naor, Z. and Seger, R. (2001) Intracellular signaling pathways mediated by the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. *Arch Med Res*, **32**, 499-509.
- Kumar, S. (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*, **14**, 32-43.
- 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**, 47-58.
- Kuramoto, H., Tamura, S. and Notake, Y. (1972) Establishment of a cell line of human endometrial adenocarcinoma in vitro. *Am J Obstet Gynecol*, **114**, 1012-1019.
- La Vecchia, C., Altieri, A., Franceschi, S. and Tavani, A. (2001) Oral contraceptives and cancer: an update. *Drug Saf*, **24**, 741-754.

- Labrie, F., Belanger, A., Kelly, P.A., Seguin, C., Cusan, L., Lefebvre, F.A., Reeves, J.J., Lemay, A., Faure, N., Gourdeau, Y. and Raynaud, J.P. (1981) Antifertility effects of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists. *Prog Clin Biol Res*, **74**, 273-291.
- Labrie, F., Belanger, A., Luu-The, V., Labrie, C., Simard, J., Cusan, L., Gomez, J. and Candas, B. (2005) Gonadotropin-releasing hormone agonists in the treatment of prostate cancer. *Endocr Rev*, **26**, 361-379.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamharzi, N., Schally, A.V. and Koppan, M. (1998) Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist Cetrorelix inhibits growth of DU-145 human androgen-independent prostate carcinoma in nude mice and suppresses the levels and mRNA expression of IGF-II in tumors. *Regul Pept*, **77**, 185-192.
- Lan, N.C. and Katzenellenbogen, B.S. (1976) Temporal relationships between hormone receptor binding and biological responses in the uterus: studies with short- and long-acting derivatives of estriol. *Endocrinology*, **98**, 220-227.
- Latimer, V.S., Rodrigues, S.M., Garyfallou, V.T., Kohama, S.G., White, R.B., Fernald, R.D. and Urbanski, H.F. (2000) Two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH-I and GnRH-II) are expressed by two separate populations of cells in the rhesus macaque hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res*, **75**, 287-292.
- Lee, H.J., Wang, C.J., Kuo, H.C., Chou, F.P., Jean, L.F. and Tseng, T.H. (2005) Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicol Appl Pharmacol*, **203**, 124-131.
- Legha, S.S. and Carter, S.K. (1976) Antiestrogens in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat Rev*, **3**, 205-216.
- Lescheid, D.W., Terasawa, E., Abler, L.A., Urbanski, H.F., Warby, C.M., Millar, R.P. and Sherwood, N.M. (1997) A second form of gonadotropin-

- releasing hormone (GnRH) with characteristics of chicken GnRH-II is present in the primate brain. *Endocrinology*, **138**, 5618-5629.
- Levi, N.L., Hanoch, T., Benard, O., Rozenblat, M., Harris, D., Reiss, N., Naor, Z. and Seger, R. (1998) Stimulation of Jun N-terminal kinase (JNK) by gonadotropin-releasing hormone in pituitary alpha T3-1 cell line is mediated by protein kinase C, c-Src, and CDC42. *Mol Endocrinol*, **12**, 815-824.
- Limonta, P., Dondi, D., Moretti, R.M., Maggi, R. and Motta, M. (1992) Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone agonists on the human prostatic cancer cell line LNCaP. *J Clin Endocrinol Metab*, **75**, 207-212.
- Limonta, P., Moretti, R.M., Marelli, M.M., Dondi, D., Parenti, M. and Motta, M. (1999) The luteinizing hormone-releasing hormone receptor in human prostate cancer cells: messenger ribonucleic acid expression, molecular size, and signal transduction pathway. *Endocrinology*, **140**, 5250-5256.
- Limonta, P., Moretti, R.M., Marelli, M.M. and Motta, M. (2003) The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Front Neuroendocrinol*, **24**, 279-295.
- Lin, L.S., Roberts, V.J. and Yen, S.S. (1995) Expression of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene in the placenta and its functional relationship to human chorionic gonadotropin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, **80**, 580-585.
- Ling, K., Wang, P., Zhao, J., Wu, Y.L., Cheng, Z.J., Wu, G.X., Hu, W., Ma, L. and Pei, G. (1999) Five-transmembrane domains appear sufficient for a G protein-coupled receptor: functional five-transmembrane domain chemokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7922-7927.
- Lu, Z.L., Gallagher, R., Sellar, R., Coetsee, M. and Millar, R.P. (2005) Mutations remote from the human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor-binding sites specifically increase binding affinity for GnRH II but not GnRH I: evidence for ligand-selective, receptor-active conformations. *J Biol Chem*, **280**, 29796-29803.

- Maiti, K., Oh, D.Y., Moon, J.S., Acharjee, S., Li, J.H., Bai, D.G., Park, H.S., Lee, K., Lee, Y.C., Jung, N.C., Kim, K., Vaudry, H., Kwon, H.B. and Seong, J.Y. (2005) Differential Effects of Gonadotropin-Releasing Hormone-I (GnRH-I) and GnRH-II on Prostate Cancer Cell Signaling and Death. *J Clin Endocrinol Metab.*
- Manetta, A., Gamboa-Vujicic, G., Paredes, P., Emma, D., Liao, S., Leong, L., Asch, B. and Schally, A. (1995) Inhibition of growth of human ovarian cancer in nude mice by luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix (SB-75). *Fertil Steril*, **63**, 282-287.
- Mangia, A., Tommasi, S., Reshkin, S.J., Simone, G., Stea, B., Schittulli, F. and Paradiso, A. (2002) Gonadotropin releasing hormone receptor expression in primary breast cancer: comparison of immunohistochemical, radioligand and Western blot analyses. *Oncol Rep*, **9**, 1127-1132.
- Martinetti, A., Ferrari, L., Celio, L., Mariani, L., Miceli, R., Zilembo, N., Di Bartolomeo, M., Toffolatti, L., Pozzi, P., Seregni, E., Bombardieri, E. and Bajetta, E. (2000) The luteinising hormone-releasing hormone analogue triptorelin with or without the aromatase inhibitor formestane in premenopausal breast cancer: effects on bone metabolism markers. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **75**, 65-73.
- Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R.M., Arimura, A. and Schally, A.V. (1971) Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, **43**, 1334-1339.
- McArdle, C.A., Franklin, J., Green, L. and Hislop, J.N. (2002) The gonadotrophin-releasing hormone receptor: signalling, cycling and desensitisation. *Arch Physiol Biochem*, **110**, 113-122.
- McCann, S.M., Karanth, S., Mastronardi, C.A., Dees, W.L., Childs, G., Miller, B., Sower, S. and Yu, W.H. (2001) Control of gonadotropin secretion by follicle-stimulating hormone-releasing factor, luteinizing hormone-releasing hormone, and leptin. *Arch Med Res*, **32**, 476-485.

- McDonnell, M.W., Simon, M.N. and Studier, F.W. (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol*, **110**, 119-146.
- Medl, M., Peters-Engel, C., Fuchs, G. and Leodolter, S. (1993) Triptorelin (D-Trp-6-LHRH) in combination with carboplatin-containing polychemotherapy for advanced ovarian cancer: a pilot study. *Anticancer Res*, **13**, 2373-2376.
- Millar, R., Lowe, S., Conklin, D., Pawson, A., Maudsley, S., Troskie, B., Ott, T., Millar, M., Lincoln, G., Sellar, R., Faurholm, B., Scobie, G., Kuestner, R., Terasawa, E. and Katz, A. (2001) A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9636-9641.
- Millar, R.P. (2003) GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends Endocrinol Metab*, **14**, 35-43.
- Millar, R.P., Pawson, A.J., Morgan, K., Rissman, E.F. and Lu, Z.L. (2007) Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling. *Front Neuroendocrinol*.
- Mills, J.C., Stone, N.L., Erhardt, J. and Pittman, R.N. (1998) Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol*, **140**, 627-636.
- Minaretzis, D., Jakubowski, M., Mortola, J.F. and Pavlou, S.N. (1995) Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in human ovary and granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **80**, 430-434.
- Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Nomura, M., Igarashi, M., Kangawa, K. and Matsuo, H. (1984) Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 3874-3878.
- Mizutani, T., Sugihara, A., Nakamuro, K. and Terada, N. (1998) Suppression of cell proliferation and induction of apoptosis in uterine leiomyoma by gonadotropin-releasing hormone agonist (leuprolide acetate). *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 1253-1255.

- Montaner, A.D., Affanni, J.M., King, J.A., Bianchini, J.J., Tonarelli, G. and Somoza, G.M. (1999) Differential distribution of gonadotropin-releasing hormone variants in the brain of *Hydrochaeris hydrochaeris* (Mammalia, Rodentia). *Cell Mol Neurobiol*, **19**, 635-651.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263-273.
- Nagaraja, N.V., Pechstein, B., Erb, K., Klipping, C., Hermann, R., Locher, M. and Derendorf, H. (2003) Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of luteinizing hormone (LH) suppression and LH surge delay by cetrorelix after single and multiple doses in healthy premenopausal women. *J Clin Pharmacol*, **43**, 243-251.
- Namy, O., Rousset, J.P., Naphine, S. and Brierley, I. (2004) Reprogrammed genetic decoding in cellular gene expression. *Mol Cell*, **13**, 157-168.
- Naor, Z. (1990) Signal transduction mechanisms of Ca<sup>2+</sup> mobilizing hormones: the case of gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Rev*, **11**, 326-353.
- Naor, Z., Benard, O. and Seger, R. (2000) Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab*, **11**, 91-99.
- Neill, J.D. (2002a) GnRH and GnRH receptor genes in the human genome. *Endocrinology*, **143**, 737-743.
- Neill, J.D. (2002b) Mammalian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor subtypes. *Arch Physiol Biochem*, **110**, 129-136.
- Neill, J.D., Duck, L.W., Sellers, J.C. and Musgrove, L.C. (2001) A gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor specific for GnRH II in primates. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 1012-1018.
- Neill, J.D., Musgrove, L.C. and Duck, L.W. (2004) Newly recognized GnRH receptors: function and relative role. *Trends Endocrinol Metab*, **15**, 383-392.
- Newcomb, P.A., Storer, B.E., Longnecker, M.P., Mittendorf, R., Greenberg, E.R., Clapp, R.W., Burke, K.P., Willett, W.C. and MacMahon, B. (1994)

- Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med*, **330**, 81-87.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. and Riccardi, C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, **139**, 271-279.
- Nishida, M., Kasahara, K., Kaneko, M., Iwasaki, H. and Hayashi, K. (1985) [Establishment of a new human endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells, containing estrogen and progesterone receptors]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, **37**, 1103-1111.
- Noh, Y.H., Matsuda, K., Hong, Y.K., Kunstfeld, R., Riccardi, L., Koch, M., Oura, H., Dadras, S.S., Streit, M. and Detmar, M. (2003) An N-terminal 80 kDa recombinant fragment of human thrombospondin-2 inhibits vascular endothelial growth factor induced endothelial cell migration in vitro and tumor growth and angiogenesis in vivo. *J Invest Dermatol*, **121**, 1536-1543.
- O'Regan, R.M., Cisneros, A., England, G.M., MacGregor, J.I., Muenzner, H.D., Assikis, V.J., Bilimoria, M.M., Piette, M., Dragan, Y.P., Pitot, H.C., Chatterton, R. and Jordan, V.C. (1998) Effects of the antiestrogens tamoxifen, toremifene, and ICI 182,780 on endometrial cancer growth. *J Natl Cancer Inst*, **90**, 1552-1558.
- Olive, D.L. (2004) Optimizing gonadotropin-releasing hormone agonist therapy in women with endometriosis. *Treat Endocrinol*, **3**, 83-89.
- Oriel, K.A., Hartenbach, E.M. and Remington, P.L. (1999) Trends in United States ovarian cancer mortality, 1979-1995. *Obstet Gynecol*, **93**, 30-33.
- Ozols, R.F. (1992) Role of chemotherapy in the future treatment of ovarian cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl*, **155**, 55-60.
- Pahwa, G.S., Kullander, S., Vollmer, G., Oberheuser, F., Knuppen, R. and Emons, G. (1991) Specific low affinity binding sites for gonadotropin-releasing hormone in human endometrial carcinomata. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **41**, 135-142.

- Parborell, F., Irusta, G., Rodriguez Celin, A. and Tesone, M. (2007) Regulation of ovarian angiogenesis and apoptosis by GnRH-I analogs. *Mol Reprod Dev.*
- Pareek, T.K., Joshi, A.R., Sanyal, A. and Dighe, R.R. (2007) Insights into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists. *Apoptosis.*
- Pawson, A.J., Katz, A., Sun, Y.M., Lopes, J., Illing, N., Millar, R.P. and Davidson, J.S. (1998) Contrasting internalization kinetics of human and chicken gonadotropin-releasing hormone receptors mediated by C-terminal tail. *J Endocrinol*, **156**, R9-12.
- Pearson, O.H. and Ray, B.S. (1959) Results of hypophysectomy in the treatment of metastatic mammary carcinoma. *Cancer*, **12**, 85-92.
- Perey, L., Paridaens, R., Hawle, H., Zaman, K., Nole, F., Wildiers, H., Fiche, M., Dietrich, D., Clement, P., Koberle, D., Goldhirsch, A. and Thurlimann, B. (2007) Clinical benefit of fulvestrant in postmenopausal women with advanced breast cancer and primary or acquired resistance to aromatase inhibitors: final results of phase II Swiss Group for Clinical Cancer Research Trial (SAKK 21/00). *Ann Oncol*, **18**, 64-69.
- Philipson, K.A., Elder, M.G. and White, J.O. (1985) The effects of medroxyprogesterone acetate on enzyme activities in human endometrial carcinoma. *J Steroid Biochem*, **23**, 1059-1064.
- Pinski, J., Lamharzi, N., Halmos, G., Groot, K., Jungwirth, A., Vadillo-Buenfil, M., Kakar, S.S. and Schally, A.V. (1996) Chronic administration of the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonist cetrorelix decreases gonadotrope responsiveness and pituitary LHRH receptor messenger ribonucleic acid levels in rats. *Endocrinology*, **137**, 3430-3436.
- Potolog-Nahari, C., Fishman, A. and Cohen, I. (2007) Protection of ovarian function and fertility using a combination of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist and GnRH antagonist during cancer treatment in young females. *Gynecol Endocrinol*, **23**, 290-294.

- Preston, G.A., Barrett, J.C., Biermann, J.A. and Murphy, E. (1997) Effects of alterations in calcium homeostasis on apoptosis during neoplastic progression. *Cancer Res*, **57**, 537-542.
- Princivalle, M., Broqua, P., White, R., Meyer, J., Mayer, G., Elliott, L., Bjarnason, K., Haigh, R. and Yea, C. (2007) Rapid suppression of plasma testosterone levels and tumor growth in the dunning rat model treated with degarelix, a new gonadotropin-releasing hormone antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, **320**, 1113-1118.
- Riggins, R.B., Schrecengost, R.S., Guerrero, M.S. and Bouton, A.H. (2007) Pathways to tamoxifen resistance. *Cancer Lett*, **256**, 1-24.
- Roberson, M.S., Zhang, T., Li, H.L. and Mulvaney, J.M. (1999) Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, **140**, 1310-1318.
- Robertson, J.F. (2001) ICI 182,780 (Fulvestrant)--the first oestrogen receptor down-regulator--current clinical data. *Br J Cancer*, **85 Suppl 2**, 11-14.
- Robertson, J.F. and Blamey, R.W. (2003) The use of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) agonists in early and advanced breast cancer in pre- and perimenopausal women. *Eur J Cancer*, **39**, 861-869.
- Ronacher, K., Matsiliza, N., Nkwanyana, N., Pawson, A.J., Adam, T., Flanagan, C.A., Millar, R.P. and Katz, A.A. (2004) Serine residues 338 and 339 in the carboxyl-terminal tail of the type II gonadotropin-releasing hormone receptor are critical for beta-arrestin-independent internalization. *Endocrinology*, **145**, 4480-4488.
- Rose, A., Froment, P., Perrot, V., Quon, M.J., LeRoith, D. and Dupont, J. (2004) The luteinizing hormone-releasing hormone inhibits the anti-apoptotic activity of insulin-like growth factor-1 in pituitary alphaT3 cells by protein kinase Calpha-mediated negative regulation of Akt. *J Biol Chem*, **279**, 52500-52516.
- Roth, C. (2002) Therapeutic potential of GnRH antagonists in the treatment of precocious puberty. *Expert Opin Investig Drugs*, **11**, 1253-1259.

- Ruf, F., Fink, M.Y. and Sealson, S.C. (2003) Structure of the GnRH receptor-stimulated signaling network: insights from genomics. *Front Neuroendocrinol*, **24**, 181-199.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Salvesen, G.S. and Renatus, M. (2002) Apoptosome: the seven-spoked death machine. *Dev Cell*, **2**, 256-257.
- Santen, R.J., Santner, S., Davis, B., Veldhuis, J., Samojlik, E. and Ruby, E. (1978) Aminoglutethimide inhibits extraglandular estrogen production in postmenopausal women with breast carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, **47**, 1257-1265.
- Satyaswaroop, P.G., Zaino, R.J. and Mortel, R. (1984) Estrogen-like effects of tamoxifen on human endometrial carcinoma transplanted into nude mice. *Cancer Res*, **44**, 4006-4010.
- Schaffler, A., Scholmerich, J. and Buechler, C. (2007) Mechanisms of disease: adipokines and breast cancer - endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, **3**, 345-354.
- Schally, A.V., Arimura, A., Kastin, A.J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T.W., Nair, R.M., Debeljuk, L. and White, W.F. (1971) Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science*, **173**, 1036-1038.
- Schmidt, F., Sundaram, K., Thau, R.B. and Bardin, C.W. (1984) [Ac-D-NAL(2)1,4FD-Phe2,D-Trp3,D-Arg6]-LHRH, a potent antagonist of LHRH, produces transient edema and behavioral changes in rats. *Contraception*, **29**, 283-289.
- Schmitz, G.G., Walter, T., Seibl, R. and Kessler, C. (1991) Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal Biochem*, **192**, 222-231.

- Schueler, J.A., Cornelisse, C.J., Hermans, J., Trimpos, J.B., van der Burg, M.E. and Fleuren, G.J. (1993) Prognostic factors in well-differentiated early-stage epithelial ovarian cancer. *Cancer*, **71**, 787-795.
- Sealfon, S.C., Weinstein, H. and Millar, R.P. (1997) Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr Rev*, **18**, 180-205.
- Sellappan, S., Grijalva, R., Zhou, X., Yang, W., Eli, M.B., Mills, G.B. and Yu, D. (2004) Lineage infidelity of MDA-MB-435 cells: expression of melanocyte proteins in a breast cancer cell line. *Cancer Res*, **64**, 3479-3485.
- Shah, B.H. and Milligan, G. (1994) The gonadotrophin-releasing hormone receptor of alpha T3-1 pituitary cells regulates cellular levels of both of the phosphoinositidase C-linked G proteins, Gq alpha and G11 alpha, equally. *Mol Pharmacol*, **46**, 1-7.
- Shah, N.R. and Wong, T. (2006) Current breast cancer risks of hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Expert Opin Pharmacother*, **7**, 2455-2463.
- Simon, W.E., Albrecht, M., Hansel, M., Dietel, M. and Holzel, F. (1983) Cell lines derived from human ovarian carcinomas: growth stimulation by gonadotropic and steroid hormones. *J Natl Cancer Inst*, **70**, 839-845.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. and et al. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, **244**, 707-712.
- Smiley, S.T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T.W., Steele, G.D., Jr. and Chen, L.B. (1991) Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3671-3675.
- Soto, A.M., Silvia, R.M. and Sonnenschein, C. (1992) A plasma-borne specific inhibitor of the proliferation of human estrogen-sensitive breast tumor cells (estrocolyone-I). *J Steroid Biochem Mol Biol*, **43**, 703-712.

- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. and Brennan, M. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **51**, 1409-1416.
- Stojilkovic, S.S., Reinhart, J. and Catt, K.J. (1994) Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev*, **15**, 462-499.
- Sun, Y.M., Flanagan, C.A., Illing, N., Ott, T.R., Sellar, R., Fromme, B.J., Hapgood, J., Sharp, P., Sealfon, S.C. and Millar, R.P. (2001) A chicken gonadotropin-releasing hormone receptor that confers agonist activity to mammalian antagonists. Identification of D-Lys(6) in the ligand and extracellular loop two of the receptor as determinants. *J Biol Chem*, **276**, 7754-7761.
- Susemihl, D. (1975) [Tumor classification using the TNM system. Sequel 1: breast cancer]. *Fortschr Med*, **93**, 1759-1763.
- Tanaka, Y., Gavrielides, M.V., Mitsuuchi, Y., Fujii, T. and Kazanietz, M.G. (2003) Protein kinase C promotes apoptosis in LNCaP prostate cancer cells through activation of p38 MAPK and inhibition of the Akt survival pathway. *J Biol Chem*, **278**, 33753-33762.
- Tang, M.X., Redemann, C.T. and Szoka, F.C., Jr. (1996) In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconj Chem*, **7**, 703-714.
- Tang, X., Yano, T., Osuga, Y., Matsumi, H., Yano, N., Xu, J., Wada, O., Koga, K., Kugu, K., Tsutsumi, O., Schally, A.V. and Taketani, Y. (2002) Cellular mechanisms of growth inhibition of human epithelial ovarian cancer cell line by LH-releasing hormone antagonist Cetrorelix. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 3721-3727.
- Temple, J.L., Millar, R.P. and Rissman, E.F. (2003) An evolutionarily conserved form of gonadotropin-releasing hormone coordinates energy and reproductive behavior. *Endocrinology*, **144**, 13-19.
- Terry, M.B., Knight, J.A., Zablotska, L., Wang, Q., John, E.M., Andrulis, I.L., Senie, R.T., Daly, M., Ozcelik, H., Briollais, L. and Santella, R.M. (2007) Alcohol metabolism, alcohol intake, and breast cancer risk: a sister-set

- analysis using the Breast Cancer Family Registry. *Breast Cancer Res Treat.*
- Thigpen, J.T., Brady, M.F., Alvarez, R.D., Adelson, M.D., Homesley, H.D., Manetta, A., Soper, J.T. and Given, F.T. (1999) Oral medroxyprogesterone acetate in the treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma: a dose-response study by the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol*, **17**, 1736-1744.
- Thorpe, S.M., Rose, C., Rasmussen, B.B., Mouridsen, H.T., Bayer, T. and Keiding, N. (1987) Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patients with node negative primary breast cancer. *Cancer Res*, **47**, 6126-6133.
- Tortolero-Luna, G. and Mitchell, M.F. (1995) The epidemiology of ovarian cancer. *J Cell Biochem Suppl*, **23**, 200-207.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Urbanski, H.F., White, R.B., Fernald, R.D., Kohama, S.G., Garyfallou, V.T. and Densmore, V.S. (1999) Regional expression of mRNA encoding a second form of gonadotropin-releasing hormone in the macaque brain. *Endocrinology*, **140**, 1945-1948.
- Valavaara, R., Pyrhonen, S., Heikkinen, M., Rissanen, P., Blanco, G., Tholix, E., Nordman, E., Taskinen, P., Holsti, L. and Hajba, A. (1988) Toremifene, a new antiestrogenic compound, for treatment of advanced breast cancer. Phase II study. *Eur J Cancer Clin Oncol*, **24**, 785-790.
- Van Laethem, A., Van Kelst, S., Lippens, S., Declercq, W., Vandenabeele, P., Janssens, S., Vandenheede, J.R., Garmyn, M. and Agostinis, P. (2004) Activation of p38 MAPK is required for Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and apoptosis induced by UVB irradiation in human keratinocytes. *Faseb J*, **18**, 1946-1948.
- van Loenen, A.C., Huirne, J.A., Schats, R., Hompes, P.G. and Lambalk, C.B. (2002) GnRH agonists, antagonists, and assisted conception. *Semin Reprod Med*, **20**, 349-364.

- Veres, G., Gibbs, R.A., Scherer, S.E. and Caskey, C.T. (1987) The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science*, **237**, 415-417.
- Vitale, A.M., Abramovich, D., Peluffo, M.C., Meresman, G. and Tesone, M. (2006) Effect of gonadotropin-releasing hormone agonist and antagonist on proliferation and apoptosis of human luteinized granulosa cells. *Fertil Steril*, **85**, 1064-1067.
- Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 615-619.
- Völker, P., Gründker, C., Schmidt, O., Schulz, K.D. and Emons, G. (2002) Expression of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in human ovarian and endometrial cancers: frequency, autoregulation, and correlation with direct antiproliferative activity of luteinizing hormone-releasing hormone analogues. *Am J Obstet Gynecol*, **186**, 171-179.
- von Alten, J., Fister, S., Schulz, H., Viereck, V., Frosch, K.H., Emons, G. and Gründker, C. (2006) GnRH analogs reduce invasiveness of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*.
- Vrecl, M., Anderson, L., Hanyaloglu, A., McGregor, A.M., Groarke, A.D., Milligan, G., Taylor, P.L. and Eidne, K.A. (1998) Agonist-induced endocytosis and recycling of the gonadotropin-releasing hormone receptor: effect of beta-arrestin on internalization kinetics. *Mol Endocrinol*, **12**, 1818-1829.
- Walker, G.R., Schlesselman, J.J. and Ness, R.B. (2002) Family history of cancer, oral contraceptive use, and ovarian cancer risk. *Am J Obstet Gynecol*, **186**, 8-14.
- Wertz, I.E. and Dixit, V.M. (2000) Characterization of calcium release-activated apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *J Biol Chem*, **275**, 11470-11477.
- White, R.B., Eisen, J.A., Kasten, T.L. and Fernald, R.D. (1998) Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 305-309.

- Wilfinger, W.W., Mackey, K. and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, **22**, 474-476, 478-481.
- Willars, G.B., Heding, A., Vrecl, M., Sellar, R., Blomenrohr, M., Nahorski, S.R. and Eidne, K.A. (1999) Lack of a C-terminal tail in the mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor confers resistance to agonist-dependent phosphorylation and rapid desensitization. *J Biol Chem*, **274**, 30146-30153.
- Windle, J.J., Weiner, R.I. and Mellon, P.L. (1990) Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol Endocrinol*, **4**, 597-603.
- Wingo, P.A., Tong, T. and Bolden, S. (1995) Cancer statistics, 1995. *CA Cancer J Clin*, **45**, 8-30.
- Wyllie, A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**, 555-556.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. and Currie, A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, **68**, 251-306.
- Yang-Feng, T.L., Seeburg, P.H. and Francke, U. (1986) Human luteinizing hormone-releasing hormone gene (LHRH) is located on short arm of chromosome 8 (region 8p11.2----p21). *Somat Cell Mol Genet*, **12**, 95-100.
- Yano, T., Pinski, J., Halmos, G., Szepeshazi, K., Groot, K. and Schally, A.V. (1994) Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancer xenografts in nude mice by treatment with luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7090-7094.

## 7 ANHANG

### 7.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
Az	Acetylgruppe
bp	Basenpaare
BRCA	<i>breast cancer genes</i>
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
C	Cytosin
cAMP	zyklisches AMP (cyclic AMP)
cDNA	<i>copy-DNA</i>
CD-FCS	<i>charcoal dextran-treated FCS</i>
cerb-B2	siehe Her2/neu
CMV	Cytomegalie Virus
CRE	<i>cyclization recombination</i>
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diaglycerol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat

---

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
Dnase I	Deoxyribonuklease I
dNTP	Deoxyribonukleosid-Triphosphat
ds	doppelsträngig ( <i>double strand</i> )
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure-Na-Salz
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	<i>extracellular regulated kinases 1/2</i>
E-Screen	<i>estradiol screen</i> (Östradiol Screen)
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
GAP	GnRH assoziiertes Peptid
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor ( <i>G-protein coupled receptor</i> )
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n) ( <i>hour(s)</i> )
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazino-Ethansulfonsäure
HER2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IGF	<i>insulin like growth factor</i>
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>

---

IU	internationale Einheit ( <i>international unit</i> )
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
µl	Mikroliter
LB	Luria Bertani
LH	Luteinisierendes Hormon
LHRH	Luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon
LISS	<i>ligand induced selective signalling</i>
M	Molar
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
β-ME	Beta-Mercaptoethanol
MEM	<i>minimal essential medium</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MW	Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> )
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
n.s.	nicht signifikant
o/n	über Nacht ( <i>over night</i> )
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pGlu	para - Glutamat
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphat
PKC	Phosphokinase C
PLC	Phospholipase C

---

PTEN	<i>phosphatase and tensin like homolog</i>
PTP	Phosphotyrosinphosphatase
PTX	Pertussis Toxin
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro minute ( <i>rounds per minute</i> )
RPTK	Rezeptorphosphotyrosinkinase
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SAPK	<i>stress activated protein kinase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sec	Sekunde(n) ( <i>second(s)</i> )
SDF-1	<i>stromal derived factor-1</i>
SERD	<i>selective estrogen receptor destructor</i>
SERM	<i>selective estrogen receptor modulator</i>
ss	einzelsträngig ( <i>single strand</i> )
SSC	<i>side scatter</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
tBu	Butylgruppe
TBST	Tween-TBS Puffer
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoracetat
TM-R	Transmembran-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TV	Tumorvolumen
U	Uracil
UV	ultraviolett
V	Volt
w	mit ( <i>with</i> )
w/o	ohne ( <i>without</i> )

z.B. zum Beispiel

## 7.2 CODE FÜR AMINOSÄUREN

### 7.2.1 NATÜRLICHE AMINOSÄUREN

Tab. 7.1: Drei- und Einbuchstabencode für Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstaben Code	1-Buchstaben Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## 7.2.2 NICHT-NATÜRLICHE AMINOSÄUREN

Tab. 7.2: Buchstabencode für Nicht-natürliche Aminosäuren

Aminosäure	Code
D- $\beta$ -(2-Naphthyl)-Alanin	D-2Nal
D- $\beta$ -(3-Pyridyl)-Alanin	D-3Pal
D-(4-Chloro) Phenylalanin	D-4Cpa
D-Citrullin	D-Cit

## 7.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

**Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Rückkopplungsmechanismus' der Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden-Achse.** GnRH-I stimuliert die Sekretion von LH und FSH in der Hypophyse, während diese Hormone für die Steroidhormonsynthese in den Ovarien verantwortlich sind. Durch einen *feedback* Mechanismus wird die Ausschüttung der Hormone reguliert..... 2

**Abb. 1.2: Strukturvergleich des GnRH-II Rezeptors beim Affen mit dem humanen GnRH-I Rezeptor.** Der GnRH-II Rezeptor besitzt im Gegensatz zum GnRH-I Rezeptor einen zytoplasmatischen Schwanz, was nach Phosphorylierung zu einer schnelleren Internalisierung des Rezeptors führt. Phosphorylierungsmöglichkeiten an den Aminosäuren Serin und Threonin im cytoplasmatischen Schwanz des Affen GnRH-II Rezeptors sind schwarz hinterlegt. Glykosylierungsschnittstellen sind mit (Y) markiert (Neill, 2002a). .... 3

**Abb. 1.3: Graphische Darstellung der GnRH-I Rezeptor Signaltransduktion in der Hypophyse.** Nach GnRH-Stimulation der hypophysären GnRH-I Rezeptoren erfolgt die Aktivierung des G-Proteins  $\alpha_q$ , dem eine Kalzium-abhängige Signaltransduktion folgt. Nach Aktivierung der Phospholipase C (PLC) wird die mitogene Signaltransduktion über die Proteinkinase C (PKC) reguliert und die Synthese der Gonadotropine Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) initiiert. Gestrichelte Pfeile geben indirekte Signalwege an und durchgezogene Pfeile indirekte Signalwege..... 5

**Abb. 1.4: Graphische Darstellung der Signaltransduktion von GnRH-I und -II über seinen Rezeptor in gynäkologischen Karzinomzellen.** (A) Durch GnRH Analoga wird eine PTP aktiviert, die die Autophosphorylierung des Wachstumsfaktorrezeptors inhibiert, was in einer Hemmung der Zellproliferation resultiert. (B) Zusätzlich wird durch GnRH-I Agonisten die Migration und

Invasion von Mammakarzinomzellen inhibiert. (C) Durch die Induktion von NFκB durch GnRH-I Agonisten werden die Zellen vor Apoptose geschützt und durch die Aktivierung von AP-1 und c-Jun der Zellzyklus verlängert (D). Des Weiteren wird die Zellproliferation über den GnRH-II Rezeptor inhibiert, was ebenfalls durch eine Interaktion mit der mitogenen Wachstumsfaktor-Signaltransduktion assoziiert ist und auf der Aktivierung einer Phosphotyrosin-Phosphatase beruht (E) (Abschnitt 1.1.6). Gestrichelte Pfeile geben indirekte Signalwege an und durchgezogene Pfeile indirekte Signalwege. (Gründker et al., 2002b) ..... 6

**Abb. 1.5: Wirkungsmechanismus von GnRH-I Agonisten (A) und GnRH-I Antagonisten (B).** Bei der Verabreichung von GnRH-I Agonisten kommt es initial zu einem Anstieg der LH und FSH Synthese (*flare up* Effekt). Eine chronische Applikation führt zur *Downregulation* der Rezeptoren und zur Desensibilisierung gegenüber GnRH-I. Im Gegensatz dazu führt eine Verabreichung von GnRH-I Antagonisten zur sofortigen Inhibition der LH und FSH Synthese und die GnRH-I Rezeptoren bleiben erhalten. .... 10

**Abb. 2.1: Vektorkarte pIRES – 6,1 kb (BD Biosciences):** Der Expressionsvektor für eukaryotische Zellen ermöglicht die Expression von zwei Proteinen, da zwei *multiple cloning sites* (MCS) verfügbar sind. Als Promotor dient der Cytomegalievirus (CMV)-Promotor. Die Selektion erfolgt über eine Ampicillin und Neomycin-Resistenz. .... 30

**Abb. 4.1: Strukturformel des GnRH-II Antagonisten Ant-3.** Das Dekapeptid hat im Vergleich zum nativen GnRH-II Aminosäuresubstitutionen an den Positionen eins, zwei, drei, sechs, acht und zehn. .... 58

**Abb. 4.2: Effekte von GnRH-II Antagonisten auf die Proliferation von gynäkologischen Karzinomzelllinien.** Die Inkubation mit dem GnRH-II Antagonisten Ant-3 ( $10^{-9}$  M) erfolgte für fünf Tage. In den Endometrium- und Mammakarzinomzelllinien und in der Ovarialkarzinomzelllinie EFO21 wurde die Proliferation signifikant gehemmt. a,  $P < 0,05$  vs. Kontrolle; b,  $P < 0,01$  vs. Kontrolle; n.s., nicht signifikant. .... 59

**Abb. 4.3: Zellmorphologie nach Induktion von Apoptose in der Ovarialkarzinomzelllinie EFO21.** Die Inkubation erfolgte 72 h mit PBS (A), Doxorubicin (B) oder Ant-3 (C) Anschließend erfolgte die Auswertung mittels Phasenkontrastmikroskopie. Die mit dem Chemotherapeutikum (B) und Antagonisten (C) behandelten Zellen zeigen deutlich morphologische

Eigenschaften des programmierten Zelltods. Die mit PBS behandelte Kontrolle zeigt keine Induktion von Apoptose. (20x) ..... 60

**Abb. 4.4: DNA-Degradation durch Induktion von Apoptose in der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3.** Die Inkubation erfolgte 72 h mit PBS (A), Ant-1 (B), Ant-2 (C) oder Ant-3 (D). Anschließend erfolgte die Analyse mittels Durchflußzytometrie im FACS. Apoptotische Zellen spiegeln sich im prä-G1-Peak wieder. Ohne Behandlung mit GnRH-II Antagonisten zeigte sich nur eine geringe Spontanapoptose (A: 19,1 %), während nach Behandlung mit GnRH-II Antagonisten die Apoptose stark erhöht ist (B: 49,7 %; C: 33,5 %, D: 40,5 %).62

**Abb. 4.5: GnRH-II Antagonisten-induzierte Apoptose in der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 (A) und der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa (B).** Die Inkubation erfolgte dosisabhängig für 72 h und der Apoptosenachweis erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Induktion von Apoptose konnte dosisabhängig nachgewiesen werden. a,  $P < 0,05$  vs. Kontrolle; b,  $P < 0,01$  zur Kontrolle; n.s., nicht signifikant..... 63

**Abb. 4.6: Induktion von Apoptose in der Ovarialkarzinomzelllinie NiH:OVCAR-3.** Die Inkubation erfolgte jeweils für 72 h mit PBS (Kontrolle) und dosisabhängig mit dem GnRH-II Antagonisten Ant-3. A, Die Detektion der aktiven Caspase-3 erfolgte im Western Blot und konnte dosisabhängig nachgewiesen werden. B, die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials erfolgte mittels JC-1 Mitochondrial Membran Potential Detection Kit im Multidetektion Reader. Der Verlust des Potentials erfolgte dosisabhängig. a,  $P < 0,05$  vs. Kontrolle; b,  $P < 0,01$  vs. Kontrolle; n.s., nicht signifikant. .... 64

**Abb. 4.7: Verlauf des Tumorumens in xenotransplantierten Nacktmäusen.** Die Mäuse wurden ohne (Kontrolle 1) oder mit 25 nmol Triptorelin (Kontrolle 2) und 25 nmol der GnRH-II Antagonisten (Ant-1, Ant-2, Ant-3) behandelt. A, Tumorumensverlauf von NiH:OVCAR-3. Die Behandlung erfolgte täglich i.p. und die Tiere waren in Gruppen von fünf Mäusen eingeteilt. B, Tumorumensverlauf von Hec-1B. Die Behandlung erfolgte alle zwei Tage i.p. und die Tiere waren in Gruppen von fünf Mäusen eingeteilt. a,  $P < 0,05$  vs. Kontrolle1; b,  $P < 0,01$  vs. Kontrolle 1; c,  $P < 0,001$  vs. Kontrolle 1; n.s., nicht signifikant. .... 66

**Abb. 4.8: Verlauf des Tumorumens in xenotransplantierten Nacktmäusen.** Die Mäuse wurden ohne (Kontrolle 1) oder mit 25 nmol [D-

Lys<sup>6</sup>]GnRH-II (Kontrolle 2) und 25 nmol der GnRH-II Antagonisten (Ant-1, Ant-2, Ant-3) behandelt. Die Behandlung erfolgte alle zwei Tage und die Tiere waren in Gruppen von fünf Mäusen eingeteilt. A, Tumolvolumenverlauf von MCF7. B, Tumolvolumenverlauf von MDA-MB-435. a, P<0,05 vs. Kontrolle1; b, P<0,01 vs. Kontrolle 1; c, P<0,001 vs. Kontrolle 1; n.s., nicht signifikant. .... 70

**Abb. 4.9: TUNEL-Assay zum Nachweis apoptotischer Zellen in Tumoren von NiH:OVCA3, gewachsen *in vivo*.** Die Kontrollgruppe (A) zeigt nur wenige apoptotische Zellkerne im Vergleich zu Paraffinschnitten von mit GnRH-II Antagonisten behandelten Tieren (B: Ant-1; C: Ant-2; D: Ant-3). Skala 50 µm. .... 71

**Abb. 4.10: Indirekte Wirkung der GnRH-II Antagonisten über die Hypophyse.** A, Bestimmung des Uterus-Ovarialgewichts von xenotransplantierten Nacktmäusen (Hec-1B). Das Gewicht der Uteri von mit GnRH-II Antagonisten behandelten Nacktmäusen ist im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. B, E-Screen Assay zur Bestimmung der östrogenen Aktivität der murinen Seren. Untersucht wurde das Proliferationsverhalten von MCF7 Mammakarzinomzellen. a, P<0,05 vs. Kontrolle1; b, P<0,01 vs. Kontrolle 1; c, P<0,001 vs. Kontrolle 1; n.s., nicht signifikant. .... 72

**Abb. 4.11: Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten gewonnen aus Tumoren von Hec-1B, gewachsen *in vivo*.** Die Expression der GnRH Rezeptoren ist in Tumoren von mit GnRH-II Antagonisten behandelten Mäusen unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Skala 100 µm. .... 74

**Abb. 4.12: GnRH-I und -II Rezeptor-Expression in gynäkologischen Karzinomzelllinien.** Die stärkste Expression beider Rezeptoren ist in der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 zu detektieren. In der Endometriumzelllinie Hec-1B ist nur der GnRH-II Rezeptor stark exprimiert. Bei den Mammakarzinomzelllinien sind beide Rezeptoren am stärksten in MCF-7 exprimiert. Als Kontrolle diente das ribosomale Protein L7. .... 77

**Abb. 4.13: Rezeptor-Bindungs-Assay zur Analyse der GnRH-II Antagonisten.** Als Kontrolle wurde der GnRH-II Agonist [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II eingesetzt. Alle vier Substanzen zeigen im nanomolaren Bereich eine signifikante Aktivität am GnRH-I Rezeptor. Als Vergleich erreicht natives GnRH-II eine EC<sub>50</sub> von ca. 76 nM. .... 79

- Abb. 4.14: Funktionalitäts-Assay zur agonistischen Wirkung der GnRH-II Antagonisten.** Eine agonistische Wirkung konnte nur für [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II (Kontrolle) mit einer EC<sub>50</sub> von 13nM erhalten werden. Die anderen Substanzen zeigen keine agonistische Aktivität in Verbindung mit der CRE-Aktivierung durch den GnRH-I Rezeptor..... 80
- Abb. 4.15: Funktionalitäts-Assay zur antagonistischen Wirkung der GnRH-II Antagonisten.** Eine antagonisitsche Wirkung konnte bei allen drei GnRH-II Antagonisten bestätigt werden. Diese lag im Bereich von ungefähr 1 nM. Für den GnRH-II Agonisten [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II konnte keine antagonistische Wirkung ermittelt werden..... 81
- Abb. 4.16: Induktion von Apoptose in NiH:OVCAR-3.** Die Inkubation erfolgte jeweils für 72 h mit PBS (Kontrolle) oder Ant-3 (10<sup>-7</sup> M) mit oder ohne PTX (20ng/ml). Die Aktivität der Caspase-3 konnte durch Koinkubation von Ant-3 mit PTX nicht signifikant reduziert werden. n.s., nicht signifikant. .... 82
- Abb. 4.17: Interaktion der GnRH-II Antagonisten mit der IGF-Rezeptor Signalkaskade.** (A) Aufgrund einer PTEN-Mutation ist in Ishikawa und EFO21 die Aktivität von PKB/Akt stark erhöht, was in einer Phosphorylierung des Proteins resultiert. (B) Die GnRH-II Antagonisten (10<sup>-7</sup> M) haben keinen zeitabhängigen Effekt auf die Aktivität von PKB/Akt in Ishikawa Zellen. .... 83
- Abb. 4.18: Interaktion der GnRH-II Antagonisten mit der MAPK Signalkaskade.** (A) Auf die Aktivierung bzw. Inhibition von ERK1/2 und den *downstream* Transkriptionsfaktor c-Fos haben die GnRH-II Antagonisten keinen zeitabhängigen Einfluss. Die Effekte sind exemplarisch in der Ovarialkarzinomzelllinien EFO27 dargestellt. (B) Die Stress-aktivierten MAPK p38 und JNK werden jedoch zeitabhängig durch die GnRH-II Antagonisten aktiviert. Exemplarisch ist der Einfluss auf die Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa dargestellt..... 84
- Abb. 4.19: Interaktion mit der MAPK Signalkaskade nach GnRH-I Rezeptor knock down.** Immunzytologische Färbung nach GnRH-I Rezeptor knock down in der Ovarialkarzinomzelllinie EFO21 mit dem polyklonalen GnRH-I Rezeptor Antiserum (20x). Die Expression des GnRH-I Rezeptors ist im Vergleich zur Postivkontrolle (B) nach *knock down* (C) deutlich reduziert und korreliert mit der Negativkontrolle (A). Nach *knock down* des GnRH-I Rezeptors wird p38 nur schwach aktiviert, während ohne *knock down* (k.d.) eine starke Aktivierung von p38 vorliegt (D)..... 86

**Abb. 5.1: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Konformationszustände einzelner Rezeptoren durch Ligandenbindung.** Die verschiedenen Liganden-Rezeptor-Komplexe sind an unterschiedliche Signalwege gekoppelt, die zu unterschiedlichen Effekten, wie Gonadotropin-Synthese, Apoptose oder Zell-Ahäsion und Migration, in Zellen führen..... 93

**Abb. 5.2: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit ermittelten Signalwege zur Induktion von Apoptose durch GnRH-II Antagonisten.** Die GnRH-II Antagonisten aktivieren über die GnRH Rezeptoren die Stress-aktivierten MAPK p38 und JNK, die zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führen. Dies resultiert in einer Aktivierung der Effektor-Caspase-3 und in einer Fragmentierung der DNA als spät-apoptotisches Ereignis. Direkte Nachweise sind In grün dargestellt. .... 95

## 7.4 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.1: Primärstruktur der Dekapeptide GnRH-I und GnRH-II .....	8
Tab. 1.2: Einige auf dem Markt befindliche GnRH-I Analoga. Aminosäuresubstitutionen sind in fett dargestellt. ....	11
Tab. 2.1 Verwendete GnRH Analoga.....	25
Tab. 2.2: Verwendeter Bakterienstamm.....	28
Tab. 2.3: Verwendete Zelllinien: Endometrium-, Ovarial- und Mammakarzinom, Fibroblasten .....	28
Tab. 2.4: Verwendeter Mausstamm .....	29
Tab. 2.5: Plasmide .....	30
Tab. 2.6: Primärantikörper .....	31
Tab. 2.7: HRP-gekoppelte Sekundärantikörper.....	32
Tab. 3.1: Zellzahl pro Tumor .....	36
Tab. 3.2: Molekulargewicht der GnRH Analoga .....	37
Tab. 3.3: Faktoren zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	47
Tab. 3.4: Enzym-Mix für Reverse Transkription .....	48

Tab. 3.5: Reaktionsansatz einer Standard-PCR .....	49
Tab. 3.6: PCR-Programm: Temperatur und Zeit .....	49
Tab. 3.7: Pipettierschema zur Erstellung der Regressionsgeraden mit BSA ...	52
Tab. 3.8: 5 % Sammelgel .....	52
Tab. 3.9: 10 % und 14% Trenngel (Ansatz für zwei Gele) .....	53
Tab. 4.1: Statistische Analyse der Wachstumsfaktorexpression auf mRNA-Ebene in Tumoren von NiH:OVCAR-3, n.s. ....	75
Tab. 4.2: Statistische Analyse der Wachstumsfaktorexpression auf mRNA-Ebene in Tumoren von Hec-1B, n.s. ....	75
Tab. 4.3: GnRH-II Rezeptor Expression im menschlichen Körper .....	76
Tab. 7.1: Drei- und Einbuchstabencode für Aminosäuren.....	139
Tab. 7.2: Buchstabencode für Nicht-natürliche Aminosäuren .....	140

## 7.5 FORMELVERZEICHNIS

(1) Formel zur Berechnung des Tumolvolumens.....	43
--	----

## 7.6 FIRMENINDEX

Abcam	Cambridge, UK
Abd Serotec	Düsseldorf, D
Abnova GmbH c/o EMBLEM	Heidelberg, D
Acris Antibodies GmbH	Hiddenhausen, D
Adobe Systems GmbH	Unterschleißheim, D
Aeterna Zentaris GmbH	Frankfurt am Main, D
ATCC LGC Promochem	Wesel, D
B. Braun Melsungen AG	Melsungen, D
BD Biosciences	Heidelberg, D
BD Plastipak	Heidelberg, D
BDH Chemicals Ltd.	Poole, UK

---

Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, D
Bender & Hobein AG	Zürich, CH
Biochrom AG	Berlin, D
Biometra GmbH i.L	Göttingen, D
Bio-Rad Laboratories GmbH	München, D
Bio-Tek Instruments GmbH	Bad Friedrichshall, D
Biozym Scientific	Hess. Oldendorf, D
Cambrex GmbH	Taufkirchen, D
Carl-Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, D
Carl Zeiss AG	Oberkochen, D
Cell Signaling Technology Inc.	Danvers, USA
Cell Technology Inc.	Minneapolis, USA
Charles River Laboratories	Sulzfeld, D
Dako Deutschland GmbH	Hamburg, D
Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH	Hamburg, D
Ferring Pharmaceuticals	Kiel, D
GE Healthcare	München, D
GraphPad Software Inc.	San Diego, USA
Greiner GmbH	Frickenhausen, D
Hanna Instruments Deutschland GmbH	Kehi, D
Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, D
Heraeus Holding GmbH	Hanau, D
Hettich-Zentrifugen GmbH & Co. KG	Tuttlingen, D
HMD Healthcare	Horsham, UK
IKA® Werke GmbH & Co. KG	Staufen, D
Invitrogen GmbH	Karlsruhe, D
Kern & Sohn GmbH	Balingen-Frommern, D
Kodak GmbH	Stuttgart, D
Konica Minolta Medical and Graphic Imaging Europe GmbH,	München, D
Memmert GmbH & Co. KG	Schwabach, D
Merck KGaA	Darmstadt, D
Microsoft Deutschland GmbH	Unterschleißheim, D

---

Millipore Corporation	Billerica, USA
Molecular Devices Corporation	Sunnyvale, USA
MWG-Biotech AG	Ebersberg, D
New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main, D
Nunc GmbH und Co. KG	Wiesbaden, D
Optik-Labor	Friedrichshofen, D
OWL Separation Systems Inc.	Portsmouth, USA
PAA Laboratories GmbH	Pasching, A
Peptide Specialty Laboratories GmbH	Heidelberg, D
Polaroid Corporation	Dreieich-Sprendlingen, D
Promega GmbH	Mannheim, D
Qiagen GmbH	Hilden, D
REX Messinstrumente GmbH	Babenhausen, D
Roche Deutschland Holding GmbH	Grenzach-Wyhlen, D
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Heidelberg, D
Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, D
Sartorius AG	Göttingen, D
Schleicher & Schuell GmbH	Dassel, D
Schott-Geräte GmbH	Mainz, D
Schütt Labortechnik GmbH	Göttingen, D
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, D
Slee Mainz	Mainz, D
SuperBioChips Laboratories	Seoul, Südkorea
Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Thomson Scientific	London, UK
Tuttnauer Europe B.V.	Breda, NL
Ultima Interchim	Montlucon, F
X-Ray GmbH	Augsburg, D
Zymed® Laboratories	South San Francisco, USA

## DANKSAGUNG

Prof. Dr. Rüdiger Hardeland, meinem Doktorvater, danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit, die stetige Diskussionbereitschaft und für die freundliche Übernahme der Betreuung und die Vertretung meiner Doktorarbeit seitens der Biologischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen.

Jun.-Prof. Dr. Ralf Heinrich danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe Vorträge zu halten.

Ich danke Prof. Dr. Günter Emons dafür, dass ich die vorliegende Arbeit im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Carsten Gründker anfertigen konnte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Carsten Gründker für seine engagierte und lehrreiche Betreuung, die oftmals über den Inhalt der Arbeit hinausging. Ich danke ihm für die Stellung des interessanten und herausfordernden Themas. Er trug entscheidend dazu bei, Motivation und Spaß bis zur Fertigstellung dieser Arbeit zu erhalten.

PD Dr. Andreas R. Günthert danke ich besonders dafür, mir Einblicke in andere Bereiche der gynäkologischen Onkologie zu ermöglichen und für die Einweisung und Betreuung am Durchflusszytometer.

Ein herzliches Dankeschön für die freundschaftliche Atmosphäre und Unterstützung gilt all meinen Kollegen im Labor für Molekulare Gynäkologie. Ich danke ihnen für ihr stetiges Beistehen und die vielen netten Stunden im Labor.

Ein besonders großer Dank gilt dabei Antje Schubert, Christa Hahmann, Fadi Hussein, Martin Block und Nicola Eicke, mit denen ich nicht nur lange Arbeitstage verbracht habe, sondern auch viele wichtige Fragen des Lebens diskutieren konnte.

Bei der Firma Aeterna Zentaris möchte ich für die freundliche Kooperation bedanken und die Bereitstellung der Daten zum Rezeptor-Bindungs-Assay.

Bei der Mildred-Scheel-Stiftung möchte ich mich für die Förderung dieses aussichtsreichen Projektes bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meiner Familie für die fortwährende Unterstützung, Geduld und den stetigen Glauben an mich bedanken.

## PUBLIKATIONEN

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben zu folgenden Publikationen beigetragen:

### Originalarbeiten:

Fister S, Günthert AR, Emons G, Gründker C (2007) GnRH-II antagonists induce apoptotic cell death in human endometrial and ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Research* **67**:1750-1756.

Fister S, Schlotawa L, Günthert AR, Emons G, Gründker C (2007) Increase of Doxorubicin-induced apoptosis after knock-down of GnRH receptor expression in human endometrial, ovarian and breast cancer cells. *Gynecological Endocrinology* Oct **11**:1-6.

In Vorbereitung:

Fister S, Günthert AR, Emons G, Gründker C: Induction of apoptosis by antagonistic analogs of gonadotropin-releasing hormone type II (GnRH-II) in human endometrial and ovarian cancers is mediated by activation of the stress-induced MAPK p38 and JNK.

Fister S, Günthert AR, Emons G, Gründker C: Antagonistic analogs of gonadotropin-releasing hormone type II (GnRH-II) induce apoptosis in human breast cancers *in vitro* and *in vivo*.

### Kongressbeiträge:

Fister S, Günthert AR, Rivier J, Emons G, Gründker C (2006) Wirkung von Antagonisten des Gonadotropin-Releasing Hormons Typ II (GnRH-II) auf das Wachstum humaner Ovarialkarzinome in vitro und in vivo. 56. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Berlin, *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, **67**. Jahrgang, S1, S. 167

Fister S, Günthert AR, Emons G, Gründker C (2007) Antagonistic analogs of gonadotropin-releasing hormone type II (GnRH-II) induce apoptotic cell death in human breast cancer cells in vivo and in vitro. 51. Symposium der Deutschen

Gesellschaft für Endokrinologie, Salzburg, Austria, *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, **115**, S1, S. 74

Fister S, Günthert AR, Emons G, Gründker C (2007) Induction of apoptosis by antagonistic analogs of gonadotropin-releasing hormone type II is mediated by activation of the stress-induced MAPK p38 in human breast cancer cells. 2. Wissenschaftliches Symposium der Kommission Translationale Forschung der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie in der DGGG und DKG, Bergisch Gladbach, Hauptprogramm (ISBN: 978-3-938669-03-7) S. 39-40

Fister S, Schlotawa L, Günthert AR, Emons G, Gründker C (2007) Erhöhung der Doxorubicin-induzierten Apoptose nach knock down der GnRH-I Rezeptor Expression in humanen Endometrium-, Ovarial- und Mammakarzinomzellen. 123. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Göttingen, *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* **68**. Jahrgang, S1, S. 812

Fister S, Günthert AR, Emons G, Gründker C (2007) Antagonisten des Gonadotropin-Releasing Hormons Typ II induzieren Apoptose durch die Aktivierung der stress-induzierten MAPK p38 in gynäkologischen Karzinomen. 123. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Göttingen, *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* **68**. Jahrgang, S1, S. 812

Gründker C, Fister S, Günthert AR, Emons G (2007) Induktion von Apoptose durch GnRH-II Antagonisten in humanen Endometrium-, Ovarial- und Mammakarzinomen in vitro und in vivo. 20. Akademische Tagung deutschsprechender Hochschullehrer in der Gynäkologie und Geburtshilfe, Lübeck, *Archives of Gynecology and Obstetrics* **276**: S. 439

Gründker C, Fister S, Günthert AR, Emons G (2007) GnRH-II antagonists induce apoptotic cell death in human endometrial, ovarian and breast cancer cells via activation of the stress-induced MAPK p38. 15<sup>th</sup> International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology, Berlin, Abstract-CD

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

---

Name	Fister
Vorname	Stefanie
Geburtsdatum	19.01.1981
Geburtsort	Erfurt
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Anschrift	Springstr. 29c 37077 Göttingen Deutschland

---

### Ausbildung

---

seit Januar 2005	Promotion zum Thema : «Induktion von Apoptose in gynäkologischen Karzinomen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> durch Antagonisten des Gonadotropin-Releasing Hormons Typ II» im Labor für Molekulare Gynäkologie der Universitätsfrauenklinik Göttingen  Betreuer: Prof. Dr. Carsten Gründker
Oktober 2004 - Dezember 2004	Wissenschaftliche Hilfskraft im Bereich « Theoretische Medizin » im Erich- und Hanna Klessmann Institut des Herz- und Diabeteszentrums NRW, Ruhr-Universität Bochum
Oktober 2003 - August 2004	Diplomarbeit zum Thema : « Expression von humanem, kardialem Aktin zur Untersuchung von Mutationen der hypertrophen Kardiomyopathie » im Erich- und Hanna Klessmann Institut des Herz- und Diabeteszentrums NRW, Ruhr-Universität Bochum  Betreuer: PD Dr. Hendrik Milting
1999-2004	Studium der Molekularen Biotechnologie an der Universität Bielefeld, Abschluss : Dipl.-Biotechnologin
1991-1999	Johann-Wilhelm Häßler Gymnasium Erfurt Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

---