

Aus der Frauenklinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Achim Wöckel

**Rezeptor-vermittelte Chemotherapie von ovarialen Karzinomzellen mit Disorazol-
GnRH-Konjugaten**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Franziska Grän

aus Bürgstadt

Würzburg, Mai 2020

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen

Korreferent: PD Dr. rer. nat. Roland Houben

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2020

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Ovarialkarzinom	1
1.1.1 Allgemeines, Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2 Klassifikation, Metastasierung und histologische Typisierung.....	3
1.1.3 Diagnostik, Therapie und Prognose.....	7
1.2 Das Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) und sein Rezeptor	10
1.2.1 Physiologische Funktion und Verteilung	10
1.2.2 Extrahypophysäre Wirkungen.....	11
1.2.3 Molekulare Signaltransduktion	13
1.2.4 Rezeptorregulierung und –Internalisierung	15
1.2.5 Bedeutung in der Onkologie.....	16
1.3 Disorazol.....	17
1.4 Zielsetzung	18
2. Material und Methoden.....	20
2.1 Materialien.....	20
2.1.1 Antikörper.....	20
2.1.2 Geräte	21
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	23
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	29
2.1.4 Puffer und Lösungen	30
2.1.5 verwendete Kits.....	31
2.1.6 Lösungen für Gelelektrophorese und Westernblotting	31
2.1.7 Primer und Oligonukleotide	32
2.1.8 Zelllinien.....	33

2.2 Methoden	34
2.2.1 Zellkultur und Isolierung.....	34
2.2.2 Molekularbiologie.....	35
2.2.3 Reporter-gen-Versuche	37
2.2.4 Durchflusszytometrie	38
2.2.5 Proliferations-und Toxizitätsversuche.....	40
2.2.6 Proteinbiochemie	41
2.2.7 Statistik	43
3. Ergebnisse	44
3.1 GnRH-Rezeptor-Expressionsanalyse.....	44
3.1.1 Expression auf mRNA-Ebene.....	44
3.1.2 Expression auf Protein-Ebene	45
3.2 Rezeptor-Funktionstest	47
3.3 Toxizität von Disorazol Z und GnRH-Konjugaten.....	47
3.4 Zelltodmechanismen von Disorazol.....	53
3.5 Disorazol-Resistenz	56
3.6 Hämatotoxizität	57
4. Diskussion	60
4.1 GnRH-Rezeptor-Expression und -Funktion in ovarialen Karzinom-Zellen.....	60
4.2 Toxizität von Disorazol und seiner Konjugate	61
4.3 Mögliche Resistenzen	63
4.4 Hämatotoxizität	64
4.5 Ausblick.....	65
5. Zusammenfassung.....	67
6. Literatur	68

Danksagung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schemadarstellung des Eierstocks und Tumor mit zugehörigem Eileiter und Gebärmutter	1
Abbildung 2: Primärstruktur von GnRH-I nach Schally et al. 1977 [24]	10
Abbildung 3: Signaltransduktion des GnRH-Rezeptors in der Übersicht.	15
Abbildung 4: Strukturgerüst der Disorazole.....	18
Abbildung 5: Relative Expression der GnRH-Rezeptor I (A) und II (B) mRNA in Ovarialkarzinom-Zelllinien	44
Abbildung 6: Relative mRNA Level in murinen Fibroblasten	45
Abbildung 7: Western Blot mit GnRH-Rezeptor-Antikörper LHRHR (N-20) SC8682 von Santa Cruz.	46
Abbildung 8: Western Blot mit dem GnRHR Antikörper EPR5293 (Novus).....	46
Abbildung 9: Western Blot mit GHR-106L.....	46
Abbildung 10: Lichteinheiten im Luciferase-Test.....	47
Abbildung 11: Spezifitätsanalyse anhand des Kristallviolett-Versuchs in murinen Fibroblasten.....	49
Abbildung 12: Spezifitätsanalyse anhand des Kristallviolett-Versuchs in humaner Ovarialkarzinom-Zelllinie A2780.	51
Abbildung 13: Spezifitätsanalyse anhand des Kristallviolett-Versuchs in weiteren humanen Ovarialkarzinom-Zelllinien	52
Abbildung 14: Kristallviolett-Versuch mit zVAD-fmk.....	53
Abbildung 15: Annexin-V-Färbung von SKOV3- und OvCAR3-Zellen	54
Abbildung 16: Annexin-V-Färbung von SKOV3- und OvCAR3-Zellen.	55
Abbildung 17: Kristallviolett-Versuch mit Verapamil	57
Abbildung 18: Annexin-Färbung von Lymphozyten	58
Abbildung 19: WST-Versuch mit Lymphozyten	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Stadien-Einteilung des Ovarialkarzinoms nach der UICC- (TNM)/FIGO-Nomenklatur [9].....	4
Tabelle 2:	Antikörper und ihre Herkunft	20
Tabelle 3:	Zelllinien, Spezifizierung und Herkunft.....	33
Tabelle 4:	Mengenangaben für eine Probe der RT-PCR-Ansätze.....	37
Tabelle 5:	Programmablauf der RT-PCR	37
Tabelle 6:	Puffer für Luciferase-Versuch	38

Abkürzungsverzeichnis

AAD	Aminoactinomycin
ABC	<i>engl. ATP Binding Cassette</i>
ASCO	Gesellschaft für klinische Onkologie der vereinigten Staaten (<i>engl. American Society for Clinical Oncology</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BMK-1	große Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1 (<i>engl. Big Mitogen protein Kinase 1</i>)
BRCA	Brustkrebs-Gen (<i>engl. BReast CAncer gene</i>)
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>engl. Bovine Serum Albumin</i>)
CA-125	Cancer-Antigen 125
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat (<i>engl. Cyclicadenosine monophosphate</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>engl. complementary DNA</i>)
CRE	cAMP reagibles Element (<i>engl. cAMP responsive Element</i>)
DAG	Diacylglycerin
ECL	Chemolumineszenz-Lösung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase (<i>engl. Extracellular-signal Regulated Kinase</i>)
et al.	und andere (<i>lat. et alii</i>)
FACS	Durchflusszytometrie (<i>engl. Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>)
FasL	Todesrezeptor Fas (APO-1, CD 95) -Ligand

FIGO	Internationale Föderation für Gynäkologie und Geburtshilfe (<i>franz. Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>)
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin freisetzendes Hormon (<i>engl. Gonadotropin-Relasing-Hormon</i>)
GnRH-R	GnRH-Rezeptor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (<i>engl. G-Protein Coupled Receptor</i>)
HE-4	Humanes Epididymis Protein 4
HNPPC	hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom (<i>engl. Hereditary Non Polypos Colorectal Cancer</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>engl. HorseRadish Peroxidase</i>)
IP ₃	Inostioltriphosphat
JNK	c-Jun Aminoterminalkinase
LH	luteinisierendes Hormon
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (<i>engl Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MDR	Mehrfach-Resistenz (<i>engl. Multidrug Resistance</i>)
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	Boten-RNA (<i>engl. messenger RNA</i>)
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBSO	bilaterale Salpingo-Oophorektomie
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumiodid
PIP ₃	Phosphatidylinositoltriphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl. Rounds Per Minute</i>)
RT-PCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (<i>engl. Real Time Polymerase Chain Reaction</i>)
STIC	Serös Tubares Intraepitheliales Carcinom
SDS	Natriumduodecylsulfat (<i>engl. Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
sog.	sogenannte
UICC	Internationale Vereinigung gegen Krebs (<i>franz. Union Internationale Contre le Cancer</i>)
vgl.	vergleiche
WST	Wasserlösliches Tetrazolium (<i>engl. Water Soluble Tetrazolium</i>)
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem
zVAD-fmk	Pan-Caspase-Inhibitor

1. Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

1.1.1 Allgemeines, Epidemiologie und Ätiologie

Maligne Neubildungen stellen nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache in entwickelten Ländern dar. Gerade in industrialisierten Ländern steigt mit der Lebenserwartung auch die Inzidenz von Krebserkrankungen deutlich an [1]. Die häufigste Lokalisation eines Karzinoms ist die Lunge, gefolgt von Darm. In geschlechtsspezifischen Analysen nimmt bei Frauen das Mammakarzinom die wichtigste Position ein. Jedoch hat der Eierstockkrebs mit circa 8000 Neuerkrankungen pro Jahr eine bedeutende Stellung in der gynäkologischen Onkologie inne (vgl. Abbildung 1). Er stellt die sechsthäufigste Krebserkrankung dar und liegt bei den Todesfällen sogar auf dem fünften Platz. Verglichen mit anderen gynäkologischen Malignomen ist die Sterberate hier am höchsten. Unabhängig vom Subtyp liegt die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate in Europa und den USA bei circa 40% [2].

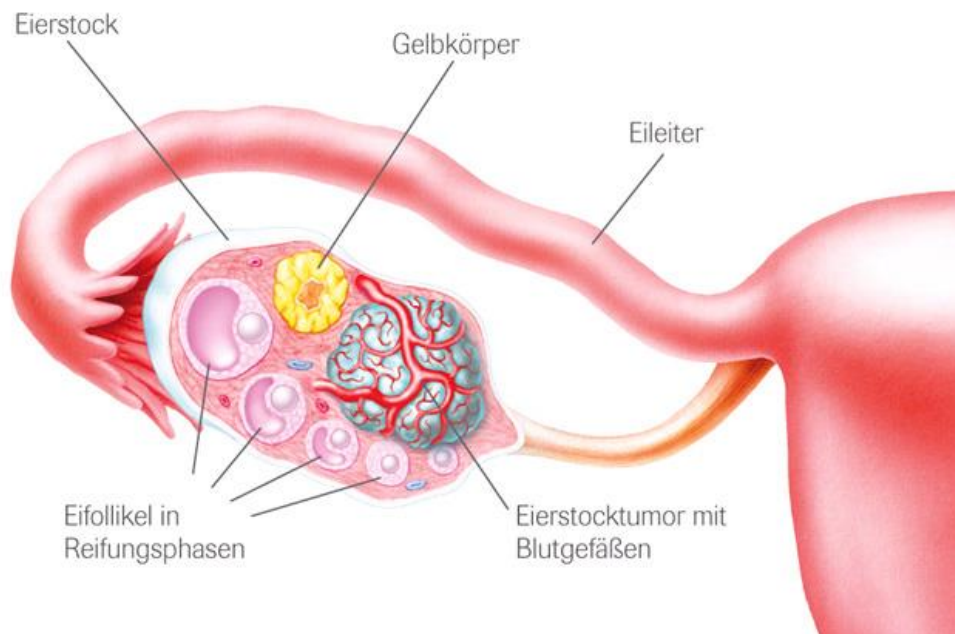


Abbildung 1: Schemadarstellung des Eierstocks und Tumors mit zugehörigem Eileiter und Gebärmutter. Das Ovar ist über das *Ligamentum ovarii proprium* mit dem Uterus verbunden. (Quelle: <https://www.roche.de/pharma/onkologie/eierstockkrebs/was-ist-eierstockkrebs.html>, aufgerufen am 15.12.2015)

Häufigkeit, Verlauf und Sterblichkeit der Erkrankung haben sich in den letzten Jahren nur minimal verändert. Es sterben mehr Frauen an einem Karzinom des Eierstocks als an allen anderen malignen Erkrankungen der Genitalorgane zusammengenommen [3]. Dies lässt sich vor allem durch die meist späte Diagnosestellung erklären. Circa drei Viertel der Fälle werden erst entdeckt, wenn der Tumor bereits die Grenzen des kleinen Beckens überschritten hat. Hinzu kommt, dass über die Karzinogenese des Ovarialkarzinoms immer noch wenig bekannt ist. Früherkennungsmaßnahmen können sich folglich vor allem auf Risikofaktoren beziehen, unter denen dem gehäuften Vorkommen in der Familie, vor allem bei Verwandten ersten Grades, die wichtigste Bedeutung zukommt. Daneben gibt es noch weitere Faktoren wie hormonelle Einflüsse oder westeuropäische und nordamerikanische Herkunft [3, 4]. Letzteres ist vermutlich auch durch diätetische Gewohnheiten mit einem hohen Anteil an tierischen Fetten und Fleisch bedingt. Mehrfach konnte ein Zusammenhang zwischen dem Konsum von Milchprodukten und dem Auftreten eines Ovarialkarzinoms gezeigt werden, ausreichend scheint dies jedoch nicht abschließend geklärt zu sein [5]. Zu den endokrinologischen Faktoren gehören unter anderem Nulliparität, Infertilität, frühe Menarche, späte Menopause oder eine späte erste Schwangerschaft. Protektiv hingegen wirkt die Einnahme von Ovulationshemmern oder andere Faktoren, die den Eisprung unterdrücken. Dies wird im Allgemeinen durch das Verhindern der Follikelruptur und somit das Ausbleiben der regenerativen Vorgänge im ovariellen Epithel mit potenzieller Akkumulation von Mutationen erklärt [3]. Zudem spielen Umweltfaktoren eine Rolle wie die Benutzung asbesthaltigen Talkumpuders und die daraus folgende retrograde Verschleppung in das pelvine Retroperitoneum und zur Ovar-Oberfläche. Mit einem Altersgipfel im sechsten Lebensjahrzehnt stellt auch zunehmendes Lebensalter ein Risikofaktor für ein Ovarialkarzinom dar, allerdings werden 10% dieser Erkrankung bei Frauen unter 40 Jahren diagnostiziert. Ebenso können auch Kinder betroffen sein. Bei diesen findet sich dann meist ein maligner Keimzelltumor [3, 6].

Bei 90% der Patientinnen mit Eierstockkrebs findet sich keine auffällige Familienanamnese mit mehreren Fällen. Dies sind sogenannte sporadische

Erkrankungen, die im Gegensatz zu 10% der familiären Karzinome nicht mit einer genetischen Prädisposition einhergehen. Prädisponierende Faktoren im Erbgut sind Mutationen im BRCA1- oder BRCA2-Gen [7]. Beide Gene sind Tumorsuppressorgene, die essenziell für die Stabilität des Genoms sind. Sie sind involviert in die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, in die korrekte Aufteilung der Chromosomen und in die Kontrolle des Zellzyklus. Ist ein Allel dieser Gene bereits in der Keimbahn mutiert hat die Trägerin ein Risiko von 80% im Verlaufe ihres Lebens an einem Ovarialkarzinom zu erkranken. Ebenso finden sich gehäuft Mammakarzinome. Auch beim sogenannten Lynch- oder HNPCC (hereditary-non-polyposis-colorectal-cancer)-Syndrom findet man neben Kolon- und Endometriumkarzinomen gehäuft maligne Neubildungen in den Ovarien. Bei dieser autosomal-dominant vererbten Erkrankung liegt eine Mutation eines Allels für DNA-Reparatur-Enzyme vor. Durch eine zweite spontane Mutation fällt der Reparatur-Mechanismus aus und in den Zellen akkumulieren verschiedene genetische Veränderungen, die die Tumorentstehung begünstigen können [6, 8]. Eine weitere Erkrankung, bei der ebenfalls hereditäre Formen des Ovarialkarzinoms auftreten können, ist das Li-Fraumeni-Syndrom.

In solchen Fällen ist eine umfassende interdisziplinäre Beratung vor jeglicher humangenetischen Untersuchung notwendig, die am besten in spezialisierten Zentren stattfinden sollte. Da das Lebenszeit-Risiko für eine Erkrankung bei einer Mutation in entsprechenden Genen bis zu 60% betragen kann, muss nicht nur das individuelle Risiko sondern auch die damit zusammenhängenden weitreichenden Folgen bestimmt werden [6]. Liegt beispielsweise eine Mutation im BRCA1- oder 2-Gen vor, kann eine prophylaktische beidseitige Salpingoovarektomie (BSO) das Risiko um bis zu 97% reduzieren [6, 7].

1.1.2 Klassifikation, Metastasierung und histologische Typisierung

Klinisch werden Tumore des Eierstocks nach dem FIGO (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*)-System klassifiziert (vgl. Tabelle 1). Dieses System macht einheitliche Therapiestandards möglich und erlaubt eine Aussage zur Prognose und prospektiven Einschätzung des Therapieerfolgs. Die Stadien der FIGO-Klassifikation

stehen in einem engen Zusammenhang mit der Überlebenszeit. Die definitive Zuordnung zu einem bestimmten Stadium erfolgt in der Regel intraoperativ, 2014 erfolgte eine Überarbeitung [9].

Tabelle 1: Stadien-Einteilung des Ovarialkarzinoms nach der UICC-(TNM-)/FIGO-Nomenklatur [9]

<i>TNM-Stadien</i>	<i>FIGO-Stadien</i>	
Tx		Primärtumor nicht beurteilbar
T0		Kein Anhalt für Primärtumor
T1	I	Begrenzt auf Ovarien
T1a	IA	Auf ein Ovar begrenzt, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Ovaroberfläche
T1b	IB	Beide Ovarien befallen, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Ovaroberfläche
T1c	IC1 IC2 IC3	iatrogene Kapselruptur präoperative Kapselruptur oder Tumor auf der Ovarialoberfläche maligne Zellen im Ascites oder in der Spülzytologie nachweisbar
T2	II	Befall eines oder beider Ovarien, Tumorausbreitung im Becken
T2a	IIA	Ausbreitung auf Uterus und/oder Tube(n)
T2b	IIB	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
T2c	IIC	Wie in IIA oder IIB und maligne Zellen im Ascites oder in der Peritonealspülung
T3	III	Befall eines oder beider Ovarien, Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder Metastasen an der Leberkapsel oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen

T3a	IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens oder retroperitoneale
	IIIA 1	Lymphknotenmetastasen
	IIIA 1i	Ausschließlicher Befall retroperitonealer Lymphknoten
	IIIA1ii	Metastasen < 1 cm
	IIIA 2	Metastasen > 1 cm
		Mikroskopische Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens mit oder ohne Lymphknotenbefall
T3b	IIIB	Makroskopische (<2cm) Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens inklusive Milz- oder Leberkapsel
T3c (N1)	IIIC	Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens > 2cm und/oder befallene retroperitoneale oder inguinale Lymphknoten (oder beides)
M1	IV	Fernmetastase: z.B. Leberparenchymmetastasen, Pleura (zytologisch nachgewiesen)

Etwa 70% der Karzinome des Ovars werden in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert (FIGO-Stadien III und IV), in denen bereits Lymphknoten und Organe außerhalb des Beckens befallen sind [10]. Die wichtigsten Zielorte für Absiedelungen des Primärtumors sind hierbei das parietale Peritoneum, die Dünn- und Dickdarmserosa, die *Radix mesenterii* des Dünndarms und die peritonealen Lymphknoten des Beckens sowie entlang der Gefäß-Nerven-Straßen [11]. Am häufigsten breitet sich der Tumor direkt intraabdominal aus durch Implantation von Tumorzellen in die Serosa der Bauchhöhle, wobei sie der physiologischen Flüssigkeitszirkulation folgen. Betroffen sind hier vor allem das Peritoneum, das Diaphragma, die Leberkapsel, der Darm und das Omentum. Mittlerweile konnte man zeigen, dass in circa der Hälfte der Fälle bei peritoneal metastasiertem Ovarialkarzinom zusätzlich ein seröses intraepitheliales Karzinom (SITC) der Tube vorliegt. Dies ist häufig am Fimbrientrichter lokalisiert, was zur inzwischen vorherrschenden Meinung führte, dass der eigentliche Primärtumor in der Tube zu suchen ist und die Ausbreitung aufgrund des offenen Endes der Tube sowie dem

intensiven Kontakt zum Ovar und der Bauchhöhle stattfindet [12]. Aus diesem Grund gilt die bilaterale Adnexektomie – also eine Entfernung nicht nur der Ovarien sondern auch der Tuben – als Mittel der Wahl zur Prophylaxe bei Patientinnen mit erhöhtem Risiko für ein Ovarialkarzinom [6].

Lymphogene Ausbreitung erfolgt zuerst in pelvine und paraaortale Lymphknoten, später auch über retroperitoneale Lymphwege oder das Diaphragma in supraklavikuläre und axilläre Lymphknoten. Hämatogene Metastasierung, die klinische Symptome bei Diagnosestellung verursacht, ist selten. Meist sind es rechtsseitige Pleuraergüsse, gefolgt von Lungen- und Lebermetastasen. Nur sehr selten kommt es zur Ausbreitung in das zentrale Nervensystem oder das Skelettsystem [10, 11].

Maligne Neubildungen im Ovar sind charakteristischerweise biologisch und morphologisch sehr heterogen. Die Weltgesundheitsorganisation hat eine feste Einteilung nach der Histogenese aufgestellt, die heute weitgehende Anwendung findet.

1. Epitheliale Tumore
2. Keimstrang- und Keimdrüsenstromatumore
3. Keimzelltumore
4. Tumore des nicht spezialisierten Ovarialgewebes
5. Unklassifizierte Primärtumore des Ovars
6. Metastasierte Tumore

Deutlich dominierend ist dabei der epitheliale Typ, der in 85-90% der malignen Fälle vorliegt und zu dem auch das Ovarialkarzinom gerechnet wird [4, 13]. Generell lässt sich die Gruppe der aus dem Oberflächenepithel abstammenden Tumore weiter untergliedern. Die Untergruppen sind seröse, muzinöse, endometrioid Ovarialtumore, Klarzelltumore, plattenepitheliale, gemischte, undifferenzierte und übergangszellige Tumore. Zu letzteren gehören auch die sogenannten Brenner-Tumore zählen, die gutartig sind, vom Zölomepithel abstammen und nur sehr selten maligne entarten.

All diese Formen können sich maligne entwickeln und ein Ovarialkarzinom mit verschiedenen histologischen Erscheinungsformen bilden. Bei serösen Tumoren, die

circa 80% der epithelialen Neoplasien ausmachen [14], findet sich ein Epithel ähnlich der Tubenmukosa, muzinöse Tumore erscheinen wie das Epithel der *Endozervix*, klarzellige ähneln dem Endometrium in der hypersekretorischen Phase und Übergangskarzinome erscheinen wie das Epithel der ableitenden Harnwege [15].

1.1.3 Diagnostik, Therapie und Prognose

Neoplastische Prozesse in den Eierstöcken sind charakteristischerweise lange symptomlos. Nur wenn Komplikationen wie Tumorrupturn oder Stieldrehung auftreten zeigt sich auch eine akute abdominelle Symptomatik. Häufige und meist unspezifische Beschwerden bei Ovarialkarzinomen sind abdominale Schmerzen, Zunahme des Bauchumfangs, Völlegefühl, Obstipation und abnorme vaginale Blutungen [16]. Letztere können durch Metastasen oder gleichzeitig aufgetretene Karzinome der Gebärmutter verursacht sein, gelegentlich tritt auch eine Endometriumshyperplasie als Ursache auf, die durch im Ovarialtumor produzierte Östrogene hervorgerufen sein kann. Sind Nachbarorgane betroffen, was meist erst dann klinische Beschwerden verursacht, ist der Tumor in vielen Fällen schon 10 cm groß. Daher sollte zunächst eine allgemeine körperliche Untersuchung erfolgen mit anschließender gynäkologischer Untersuchung, da Ovarialtumore in der rektovaginalen Palpation gut tastbar sind. Bei den bildgebenden Verfahren kommen vor allem ein transvaginaler und abdomineller Ultraschall sowie eine Computertomografie des Abdomens zum Einsatz [3, 4, 6, 10].

Die wichtigste Stellung nimmt dabei die Transvaginalsonografie ein, da damit anhand der Zystengröße, Wanddicke, Vorhandensein von Septen und soliden Anteilen die Dignität des Tumors bestimmt werden kann [6]. Eine solide Auffälligkeit größer als 5 cm ist stets malignitätsverdächtig. Zusätzlich sind eine Röntgenuntersuchung des Thorax und eine Mammografie zur Detektion von Metastasen und eines malignen Pleuraergusses von enormer Bedeutung sowie ausführliche Labordiagnostik. Diese schließt ebenfalls Tumormarker ein, wie CA-125. Bei circa 80% der Patientinnen mit Stadium III/IV finden sich erhöhte Serumspiegel und CA-125 spielt bei der Verlaufskontrolle eine wichtige Rolle [4, 6]. Zur Früherkennung scheint er jedoch ungeeignet und eine Senkung der Mortalität durch Screeningprogramme anhand von

CA-125 ist unwahrscheinlich, da er viele falsch positive Ergebnisse produziert beispielsweise bei Endometriose, Adnexitis oder Uterus myomatosus. Bei frühen Stadien von Ovarialkarzinomen hingegen (Stadium I und II) kann seine Bestimmung in bis zu 50% der Fälle falsch negativ ausfallen [6]. Mit dem *human Epididymis Protein-4 (HE-4)* wurde 2011 ein neuer Tumormarker entdeckt, der in Kombination mit der Bestimmung des CA-125 eine höhere Sensitivität in der Risikobewertung ovarialer Tumore aufweist. Diese Kombination kann sowohl zur Früherkennung von Rezidiven als auch zur Bewertung des Therapieansprechens herangezogen werden [17].

Nur 30% der Tumore werden in diesen frühen Stadien diagnostiziert, die Prognose ist dann mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 65-90% gut bis sehr gut. Im Allgemeinen stehen bei der Therapie chirurgische, chemotherapeutische und radiotherapeutische Verfahren zur Verfügung [4]. Die Koordination der Behandlung richtet sich nach der Tumorausdehnung und nach dem Differenzierungsgrad, aber stets spielt die operative Entfernung eine zentrale Rolle. Beispielsweise ist bei FIGO-Stadium IA und einem Grading von 1 eine kurative Operation mit Erhalt des Uterus und des kontralateralen Eierstocks unter Erhaltung der Fertilität möglich [4, 6]. Auch in den anderen frühen Stadien bis FIGO II ist meist eine R0-Resektion möglich. Diese wird auch in weiter fortgeschrittenen Stadien angestrebt, auch wenn sie selten möglich ist. Ein chirurgischer Eingriff wird als mediane Laparotomie durchgeführt, bei der die betroffenen Adnexe des Uterus, das pelvine Peritoneum, das infra- und suprakolische Netz und weitere vom Tumor befallene Nachbarorgane entfernt werden [18]. Weitere Metastasen, beispielsweise in Milz oder Leber werden ebenfalls reseziert. Eine radikale Entfernung ist vor allem im Hinblick auf die Prognose von enormer Bedeutung, gleichzeitig kann bei einer Operation das Staging erfolgen, das abschließend nur chirurgisch möglich ist [6, 18]. Allerdings zeigen die Ergebnisse der LION-Studie, dass die jahrelang praktizierte radikale Lymphadenektomie keinen Nutzen birgt, aber mit erheblicher Komorbidität einhergeht [19].

Ab dem Stadium IC ist eine Tumorentfernung ohne zurückbleibende vitale maligne Zellen kaum wahrscheinlich. Aus diesem Grund muss nach der Operation eine

systemische Therapie erfolgen. Therapie der ersten Wahl in frühen Stadien ist die Gabe von Carboplatin, in höheren Stadien eine Kombination von Carboplatin und Paclitaxel [6, 18]. In bis zu Dreiviertel der Fälle lässt sich somit eine Tumorrückbildung erreichen. Bei Rezidiven kommen weitere Substanzen wie Etoposid, Gemcitabin, Mitoxantron oder Doxorubicin zum Einsatz, eine erneute Operation ist nur bei einem Spätrezidiv, also nach mehr als einem Jahr nach Abschluss der Ersttherapie, sinnvoll. Die Therapiedauer kann sich nach dem Verlauf von Tumormarkern (CA-125) richten, wenn diese positiv sind. So sollte der Serumspiegel des Markers nach drei Zyklen auf mindestens die Hälfte des Ausgangswertes gefallen sein, sonst ist ein Therapiewechsel anzustreben. Auch der häufig vorkommende *Aszites* und ein Pleuraerguss werden durch eine zytostatische Therapie gemindert. In einigen Fällen kann neben der klassischen Chemotherapie auch eine Hormontherapie zum Einsatz kommen. Exprimieren Tumorzellen Hormonrezeptoren, können Gestagene, Antiöstrogene und GnRH-Analoga bei einigen Patientinnen eine Remission bewirken, diese Therapieform wird jedoch erst in zweiter Linie angewandt [4, 18]. Auch Immunmodulatoren wie Interleukine, Interferone und Tumornekrosefaktor können in einigen Fällen die Rückbildung verbleibender Tumorreste bewirken, eine antikörperbasierte Therapie mit Bevacizumab ist seit 2011 für das fortgeschrittene Ovarialkarzinom zugelassen [20]. Trotz einiger positiver Signale [21] erfolgte noch keine Zulassung von Therapien mit Immuncheckpoint-Antikörpern wie anti-PD-1 oder anti-PD-L1. Die Strahlentherapie hat heute vor allem einen palliativen Stellenwert beispielsweise zur Schmerzlinderung bei Knochenmetastasen, zur Zytostase wird sie vor allem bei lokal begrenzten Tumoren und bei Rezidiven eingesetzt [18].

Zu den prognostisch wichtigsten Faktoren zählen Tumorstadium, Alter, postoperativer Tumorrest und Allgemeinzustand. Ebenso spielt die histologische Klassifizierung eine Rolle, beispielsweise zeigen klarzellige und muzinöse Tumore eine deutlich schlechtere Überlebensrate als seröse und endometrioid maligne Neubildungen. Im Gegensatz dazu machen genomische Faktoren oder andere molekularbiologische Aspekte des Tumors im Moment noch keine klinische Vorhersage über die Prognose der Patientinnen möglich und sind daher von geringer Bedeutung. Wichtigster Faktor, der sich aktiv

beeinflussen lässt, ist der postoperative Tumorrest. Aus diesem Grund ist in jedem Fall eine möglichst vollständige Entfernung des Karzinoms anzustreben [18].

1.2 Das *Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)* und sein Rezeptor

In der menschlichen Sexualentwicklung und Fortpflanzung spielen Hormone und ihre durch diverse Rezeptoren vermittelte Einflüsse eine entscheidende Rolle. Durch ein komplexes Regulationssystem mit verschiedenen hierarchischen Ebenen wird die exakte Steuerung der Entwicklung, Funktion und des Verhaltens orchestriert. So ist der weibliche Zyklus durch eine stets gleiche Abfolge an Hormonspitzen gekennzeichnet, die für einen genauen Ablauf und Funktionserhaltung exakt koordiniert sein muss. An oberster Stelle dieser endokrinen Hierarchie steht der Hypothalamus mit seiner Sekretion des *Gonadotropin-Releasing-Hormons* [22, 23].

1.2.1 Physiologische Funktion und Verteilung

GnRH – ein Peptidhormon mit einer Länge von 10 Aminosäuren (vgl. Abbildung 2) – wird von präoptischen Neuronen des Hypothalamus als Prä-Pro-Hormon synthetisiert, durch Peptidasen gespalten und in das Portalvenen-System der Hypophyse sezerniert [24]. Von dort gelangt es in den *Pars anterior* der Hypophyse, wo es an seinen Rezeptor bindet [22, 25]

pyroGly	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly
---------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Abbildung 2: Primärstruktur von GnRH-I nach Schally et al. 1977 [24]

Es sind verschiedene Unterformen des GnRH bei vielen Wirbeltieren bekannt. Beim Menschen existiert neben dem oben gezeigten GnRH-I eine zweite Form, GnRH-II. Diese unterscheidet sich von GnRH-I in drei Aminosäuren, scheint allgemein neuromodulatorische Funktionen zu erfüllen und besitzt einen eigenen Rezeptor [25-27]. Im Folgenden beziehen sich Bemerkungen und Untersuchungen über GnRH auf die Isoform I. Die Sekretion erfolgt in Pulsen, die durch die Sexualsteroiden beeinflusst werden. Gestagene verlängern das Pulsintervall auf circa 240 min, unter *Östrogen* liegt es bei 90 min [28]. Die Beeinflussung erfolgt indirekt. Die Sexualhormone stimulieren Neurone des ZNS, die über weitere sekundäre Botenstoffe die GnRH-Sekretion regulieren [22]. Störungen in diesem Muster beeinflussen das Zusammenspiel der

Sexualhormone und können Veränderungen in der LH- und FSH-Sekretion bewirken sowie die Aktivität und Anzahl des GnRH-Rezeptors und der Expression Gonadotropin-spezifischer Gene positiv oder negativ regulieren [29].

In der Hypophyse bewirkt das Gonadoliberin die Biosynthese und Freisetzung der Gonadotropine Follikel stimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH), welchen wichtige Effektorfunktionen im weiblichen Zyklus obliegen [30]. Beide sind Glykoproteine mit zwei Untereinheiten. Durch die spezifisch determinierte Dynamik ihrer Serumspiegel steuern sie den präzisen Ablauf des weiblichen Menstruationszyklus mit Follikelreifung, Ovulation und – bei Ausbleiben der Konzeption – Menstruation. In der ersten Hälfte des Zyklus bewirkt FSH im Ovar Reifung und Wachstum des Follikels mit der darin enthaltenen Eizelle und fördert die Synthese von Östrogen und seinen Rezeptoren im *Stratum granulosum* des Follikels. Östrogene bewirken eine Vermehrung der FSH-Rezeptoren, so dass derjenige Follikel mit der höchsten Östrogenproduktion empfindlicher für FSH wird und somit als dominanter Follikel heranreift. Zum Ende der ersten Hälfte steigt zunächst FSH- und schließlich auch die LH-Freisetzung stark an (*LH-Peak*). Dies bewirkt die erste Reifeteilung der Eizelle und schließlich die Ovulation mit Aufbrechen des Epithels. In der zweiten Hälfte des Zyklus wird der Follikelrest durch LH, FSH und Östrogene in das *Corpus luteum* umgebaut, das Progesteron synthetisiert. Die Sexualsteroiden wirken nun als negative Rückkopplung auf die Hypophyse und den Hypothalamus, was zu einem Absinken von LH, FSH und GnRH führt. Dadurch fallen auch die Östrogen- und Progesteronkonzentrationen wieder und die Menstruationsblutung wird ausgelöst [31, 32]. Dies bedeutet, dass monatlich Umbau- und Regenerationsprozesse am ovariellen Epithel stattfinden, was das Auftreten und Akkumulieren onkogener Mutationen möglich macht.

1.2.2 Extrahypophysäre Wirkungen

Neben Stimulation der gonadotropen Zellen zur Hormonsynthese und -freisetzung, hat GnRH vielfältige andere Wirkungen in diversen Geweben. Beispielsweise hat GnRH einen negativen Effekt auf die Steroidproduktion in den Eierstöcken [33] und steht damit der stimulierenden Wirkung der Gonadotropine entgegen. Kang et al. [34] konnten

zeigen, dass dieser inhibitorische Effekt auf mRNA-Ebene reguliert wird und dass das Hormon nicht mit dem cAMP-Spiegel der Zelle interferiert. Nicht nur die Steroidsynthese kann durch GnRH negativ beeinflusst werden, auch das Wachstum von Zellen wird durch das Hormon gehemmt. Für verschiedenste Karzinomarten konnte gezeigt werden, dass GnRH als negativer Wachstumsfaktor wirkt, beispielsweise bei Ovarial-, Endometrium-, Mamma- und Prostatakarzinomen, ebenso beim malignen Melanom [25, 35, 36]. In verschiedenen gynäkologischen Zelllinien wurde durch eine Behandlung mit GnRH-Analoga der Zellzyklus blockiert und die DNA-Synthese vermindert [37, 38]. Auch Myome der Gebärmutter und Endometriose können im Wachstum gehemmt werden, was vor allem indirekt durch eine verminderte Freisetzung der Gonadotropine und Sexualsteroiden, aber auch durch veränderte Expression von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonrezeptoren erfolgt [25, 39]. Es wird nicht nur das Wachstum in verschiedenen Zelltypen geringer, es kann durch GnRH-Behandlung auch zu Apoptose kommen, wenn dazu auch sehr kontroverse Daten existieren. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass in Granulosazellen des Ovars GnRH eine typische DNA-Fragmentierung induziert. Ebenso zeigte sich Apoptose in *Corpus luteum*-Zellen [40, 41]. Die vermehrte Expression von Bax-Proteinen stellt ein molekulares Äquivalent des Zelltodes dar, wobei Cytochrom C eine wichtige Rolle spielt [25, 42]. Auch nach dem Eisprung greift GnRH in die Fortpflanzung ein. Durch die Stimulation des Plasminogen-Aktivators in Zytotrophoblast-Zellen der Plazenta und in uterinen Zellen sowie der Enzyme Matrix-Metalloprotease (MMP-) 2 und MMP-9, die ebenfalls degradierende Eigenschaften haben, trägt es dazu bei, Anheftung und Invasion des Embryos in maternales Gewebe zu erleichtern [43, 44]. Auch außerhalb des Reproduktionstrakts zeigte sich GnRH für verschiedene Effekte verantwortlich. Experimentell konnte gezeigt werden, dass durch GnRH-I und -II in humanen peripheren T-Zellen die Expression von Laminin-Rezeptoren stimuliert wird, welche unter anderem in der Zelladhäsion und -migration sowie auch in Tumorinvasion und Metastasierung eine wichtige Rolle spielen [45]. Auch in sensorische Systeme greift GnRH ein. Es hat sich gezeigt, dass dieses Hormon als autokriner Wachstumsfaktor an olfaktorischen Neuronen wirkt. GnRH-erge Neurone sind entwicklungsgeschichtlich aus dem gleichen

Gewebe entstanden wie olfaktorische Neurone, so dass sie viele gemeinsame Eigenschaften besitzen und GnRH-Rezeptor exprimieren. Somit ist GnRH für das Axon-Wachstum, die Zellmigration und Differenzierung in diesen Zellen mitverantwortlich [25, 46].

1.2.3 Molekulare Signaltransduktion

Wie bei allen Peptidhormonen erfolgt die Signalübermittlung von GnRH über einen Rezeptor, der in der Plasmamembran der Zielzelle sitzt. Dieser ist für die jeweilige Isoform spezifisch. Neben dem primären Zielgewebe der Adenohypophyse findet sich der Rezeptor auch noch in weiteren Geweben, beispielsweise in Abhängigkeit vom Schwangerschaftsstadium in der Plazenta, im Brustdrüsengewebe, im Ovar, in glatten und quergestreiften Muskelzellen des Uterus sowie im Endometrium und in der Prostata [25, 26, 47]. Der GnRH-Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembran-Domänen [47]. Die Signaltransduktion innerhalb der Zelle erfolgt über verschiedene sekundäre Botenstoffe. Die Art des G-Proteins, an welches der Rezeptor gekoppelt ist und somit die Antwort auf das Signal, variiert je nach Herkunft der Zelle [25]. Es kann sich dabei um $G\alpha_s$ -, $G\alpha_i$ - oder ein $G\alpha_{q/11}$ -Protein handeln. In einigen Fällen wurde auch ein Wechsel des angeschlossenen G-Proteins in bestimmten Zelltypen nachgewiesen [48]. Waren Neurone einer hohen Konzentration von GnRH-Analoga ausgesetzt, wurde anstatt des $G\alpha_s$ - das $G\alpha_i$ -Protein aktiviert, was zu einer verminderten Hormon-Freisetzung und somit zu einer negativen Rückkopplung führte. Solche Mechanismen sind für den korrekten Ablauf der pulsatilen GnRH-Ausschüttung von enormer Bedeutung [25]. Im weiteren Verlauf der von den G-Proteinen angestoßenen Signalkaskade spielen diverse Systeme mit sekundären Botenstoffen eine wichtige Rolle, in die Adenylcyclasen, Proteinkinasen, Calciummobilisation und Leukotriene involviert sind. Die Freisetzung der gonadotropen Hormone LH und FSH aus hypophysialen Zellen wird beispielsweise durch Erhöhung des Calciumspiegels in der Zelle bewirkt. Weiterhin ist die Phospholipase C von großer Bedeutung für die Signalweiterleitung in der Zelle. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Phosphoinositolbisphosphat (PIP_2) zu Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG), die auch in den Calciumhaushalt der Zelle eingreifen. Schließlich

wird die Phospholipase A₂ aktiviert, die für die Synthese von Leukotrienen eine entscheidende Rolle spielt. Es konnte gezeigt werden, dass die durch GnRH stimulierte LH-Freisetzung durch Inhibition der Leukotrien-Rezeptoren weitgehend reversibel ist [24, 49] (vgl. auch Abbildung 3). Im Verlauf der Signaltransduktion ist auch das MAPK-System von großer Bedeutung. In murinen Zellen wurden vier verschiedene Wege nachgewiesen, die durch GnRH induziert werden und in spezifische Proteinaktivierungen münden. Durch die Proteinkinase C wird ERK1/2 aktiviert, ebenso p38 MAPK und BMK1/ERK5. Ein erhöhter Calciumspiegel sorgt für eine Induktion von JNK (c-Jun Aminoterminalkinase) [25, 50, 51]. Die Endpunkte all dieser Kaskaden greifen in die Regulation der Embryogenese, Zelldifferenzierung, Zellwachstums und der Apoptose ein und sind somit für eine GnRH-Wirkung über die reine Hormonstimulation hinaus verantwortlich. Es spricht aber vieles dafür, dass sich die Signalwege in karzinogenen Zellen von denen ursprünglicher Zellen unterscheiden. Aus diesem Grund müssen die genauen molekularen Bedingungen noch weiter aufgeklärt werden [52].

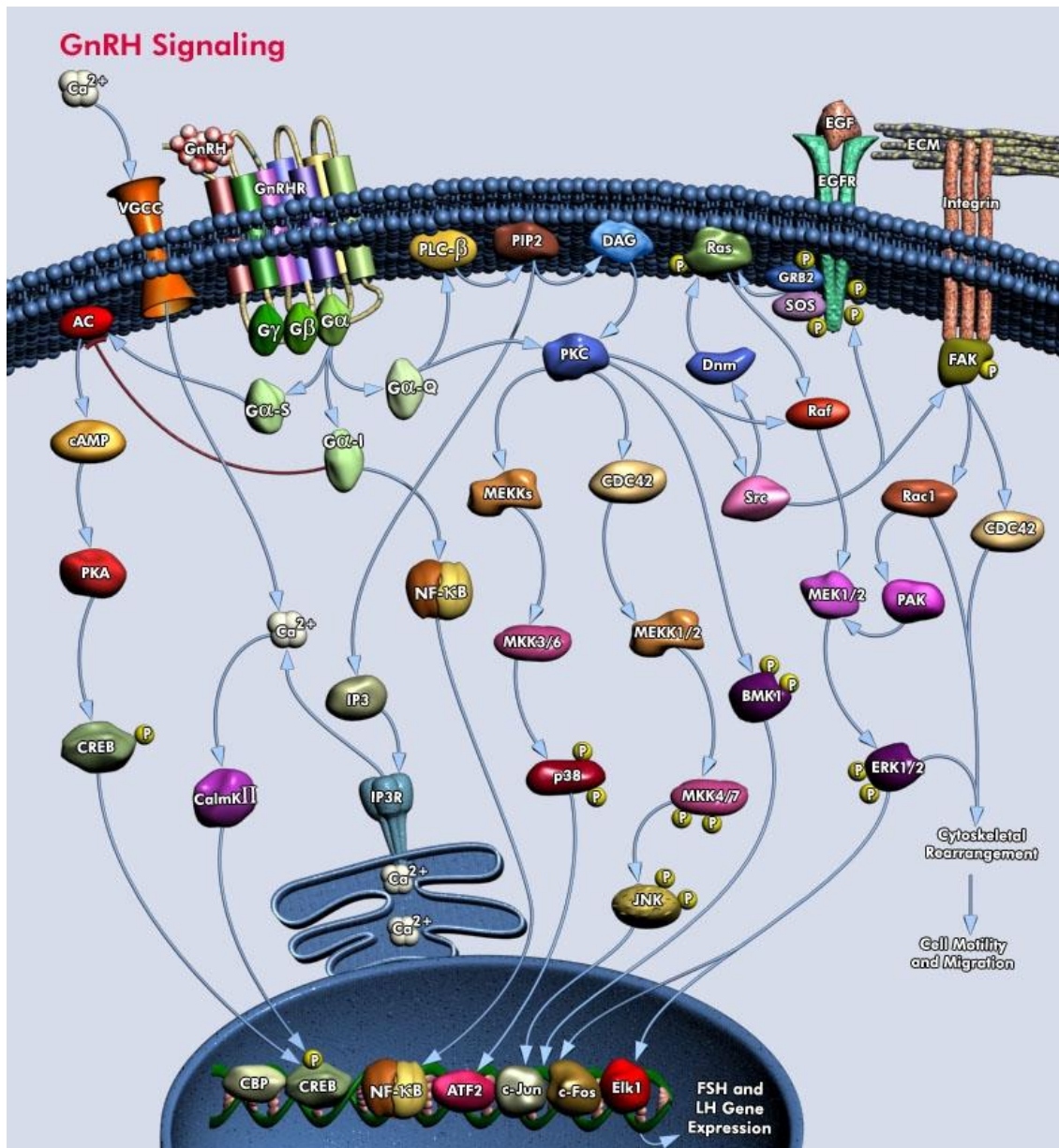


Abbildung 3: Signaltransduktion des GnRH-Rezeptors in der Übersicht. (Quelle: <https://www.qiagen.com/geneglobe/pathwayview.aspx?pathwayID=206>, aufgerufen am 28.06.2016)

1.2.4 Rezeptorregulierung und -Internalisierung

Um übermäßige Stimulation durch Hormone zu vermeiden, findet meist eine Desensibilisierung der Rezeptoren statt, was bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren vor allem durch Phosphorylierung des Rezeptors oder der mit sekundären Botenstoffen assoziierten Serin/Threonin-Kinasen [49, 53] am c-terminalen Ende geschieht. Folglich bindet β -Arrestin an GPCR, verhindert dadurch eine weitere Ligandenbindung und

induziert die Endozytose des Rezeptors [53]. Dem humanen GnRH-Rezeptor fehlt diese C-terminale Ende, so dass keine Phosphorylierung stattfindet und dieser Rezeptor somit auch nicht an Sensibilität verliert [54]. Allerdings kommt es zur einer signifikanten Verminderung der Gonadotropin-Ausschüttung durch Desensibilisierung der IP_3 -Rezeptoren und der Calcium-Mobilisation [49]. Der GnRH-Rezeptor II hingegen besitzt solch ein typisches C-terminales Ende und zeigt dementsprechend eine schnelle Desensibilisierung und Internalisierung. Dies könnte auch ein Grund dafür sein, dass GnRH I-Rezeptor positive Zellen unter Behandlung mit Hormonagonisten eine reduzierte Proliferationsaktivität zeigen. Dies findet sich jedoch nicht bei einer Expression des Typs II [49]. Die Internalisierung des GnRH-Rezeptors verläuft mittels Endozytose in Clathrin-abhängigen Vesikeln [55].

1.2.5 Bedeutung in der Onkologie

Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass der GnRH-Rezeptor in ovarialen Karzinom-Zellen exprimiert wird [56]. Etwa 80% der Eierstock-Tumore exprimieren einen GnRH-Rezeptor mit hoher Affinität, ebenso wurde dieser in Zellen von Prostata-, Endometrium- und Brust-Tumoren [36, 57, 58] gefunden. Dies ist bereits ein deutlicher Hinweis auf eine potenziell wichtige Rolle dieses Hormons und seines Signalwegs. Aber nicht nur das Vorhandensein des Rezeptors ist von Bedeutung, sondern auch die Funktionalität und die Auswirkungen seiner Aktivierung.

Wie bereits erwähnt hat GnRH in diversen Krebszelllinien einen antiproliferativen Effekt [25]. Bis jetzt sind die Ergebnisse bezüglich der genauen Auswirkungen von GnRH auf Tod und Überleben einer Zelle widersprüchlich. Sowohl die Hemmung der Proliferation durch die Applikation von GnRH-Agonisten als auch das vermehrte Wachstum der Tumorzellen durch Inkubation mit einem Antiserum gegen GnRH [59] sprechen für einen antiproliferativen Effekt und einen etwaigen autokrinen Einfluss des Tumors auf sein eigenes Wachstum [59, 60]. Hingegen wurden beispielsweise in Zellen der Linie ES-2 proliferationshemmende und -steigernde Effekte durch Hormonanaloga nachgewiesen, je nach Dosierung und Inkubationsdauer [61]. Auch in den neuesten Studien wurde erneut ein hemmender Effekt auf das Wachstum gezeigt, der sich ausschließlich in

bestimmten ovariellen Zelllinien zeigte [62]. Auf molekularer Ebene bewirken GnRH-Agonisten einen Arrest des Zellzyklus in der G2/M-Phase durch veränderte Expression und Phosphorylierung verschiedener regulatorischer Proteine [62] wie beispielsweise ERK. Diese ist normalerweise ein Stimulator der Zellteilung, jedoch kann deren Aktivierung auch zum Zelltod führen [63, 64]. Da ERK von der Proteinkinase C aktiviert wird, die im normalen Verlauf des GnRH-Signalwegs liegt, spricht vieles für eine zentrale Rolle dieses Enzyms in den beobachteten Effekten [62]. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Aktivierung von hemmenden G-Proteinen durch die Hormonanaloga. Gründker et al. konnten zeigen, dass die so aktivierten G_i -Proteine Phosphatasen induzieren, die wiederum den Phosphat-Rest an Proteinen der Wachstumsfaktor-Kaskaden wie des MAPK-Signalwegs entfernen und somit inaktivieren [65].

Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede der Auswirkungen des Hormons in diversen Zelllinien bietet die hohe molekulargenetische Variabilität von Krebszellen, wobei sich durch rasche Proliferation und Mutation schnell erhebliche Differenzen in Expression, Affinität und Funktionalität von Genen im Allgemeinen und des GnRH-Rezeptors im Besonderen ergeben können. Von besonderem Interesse hierbei ist, welche molekularen Unterschiede im Signalweg zwischen den verschiedenen Zelllinien bestehen, die entscheidend für den antiproliferativen Effekt sein könnten. Hier zeigt sich erneut, dass noch weitere Untersuchungen dieser Beziehungen nötig sind, um diese genau verstehen und gegebenenfalls therapeutisch nutzen zu können.

1.3 Disorazol

1994 gelang es Jansen et al. [66] zum ersten Mal eine neuartige Substanz, produziert durch das Mykobakterium *Sorangium cellulosum*, zu isolieren, die sie Disorazol nannten. Diese stellte sich in späteren Versuchen als äußerst toxisch gegenüber eukaryotischen Zellen heraus [66, 67]. Disorazol gehört zu den Makrodioliden, inzwischen sind 29 Subtypen bekannt, die sich geringfügig in ihrer chemischen Struktur unterscheiden (vgl. Abbildung 4) [68].

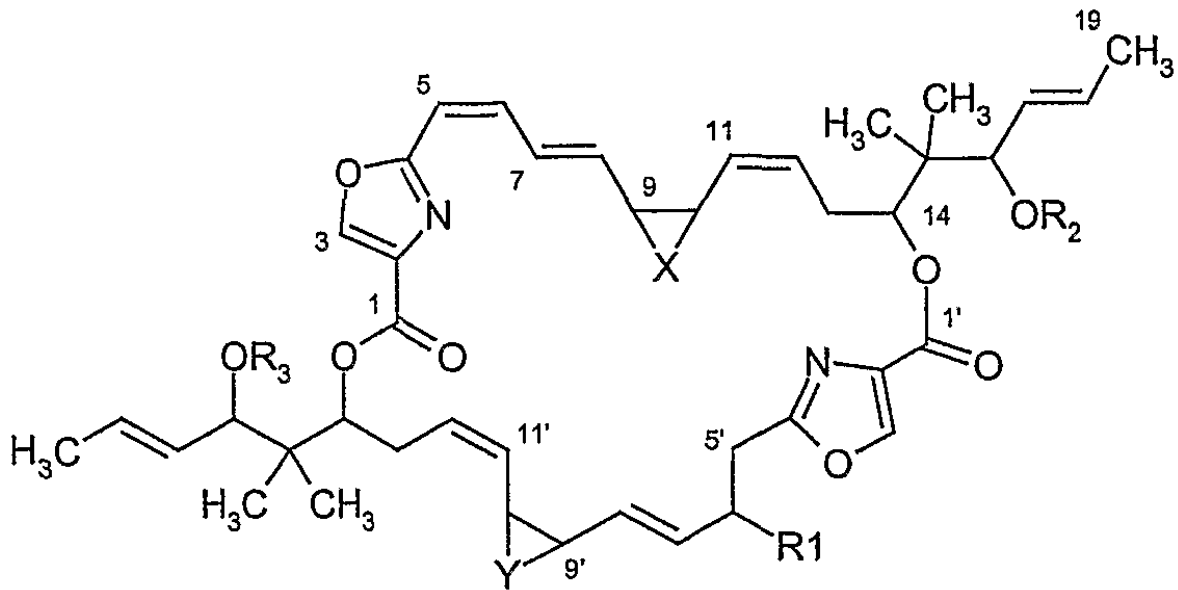


Abbildung 4: Strukturgerüst der Disorazole [69]

Inzwischen konnte mehrfach gezeigt werden, dass Disorazol in den Zellzyklus eingreift, wodurch sich auch die erhöhte Effektivität bei verlängerter Einwirkdauer erklären lässt. Auch wenn der genaue Wirkmechanismus noch nicht abschließend geklärt ist, wurde Disorazol als Inhibitor der Mikrotubuli-Polymerisation identifiziert und bewirkt somit einen Arrest der Zelle in der G2/M-Phase des Zellzyklus, was zur Induktion proapoptotischer Signalwege führt [70]. Aufgrund seiner hohen Wirksamkeit auf eukaryotische Zellen im subnanomolaren Bereich scheint Disorazol als effektives Zytostatikum im Bereich der Onkologie einsetzbar zu sein. Da aber hier auch mit verstärkten Nebenwirkungen zu rechnen ist bietet der Einsatz in der gezielten Therapie eine gute Alternative.

1.4 Zielsetzung

Durch die eingeschränkten Therapiemöglichkeiten und die damit verbundene hohe Letalität des Ovarialkarzinoms herrscht enormer Bedarf an Neu- und Weiterentwicklung sowohl der Diagnostik als auch der Behandlung. In der modernen Onkologie spielt die sogenannte zielgerichtete Therapie (*targeted therapy*) eine immer größere Rolle. Dabei sollen spezifische zelluläre Strukturen genutzt werden, um selektiv onkogen

transformierte Zellen zu eliminieren. Ansatzpunkte sind dabei typischerweise Signalwege von Wachstumsfaktoren aber auch Hormonen, wie beispielsweise GnRH. Unter der Voraussetzung, dass deren Rezeptoren in gynäkologischen Tumorzellen überexprimiert sind, ergäbe sich hier durch Kopplung des Hormons an zytostatisch wirksames Therapeutikum die Möglichkeit, zielgerichtet diese Zellen zu zerstören und die Nebenwirkungen zu minimieren.

Ziel dieser Arbeit war es, zu ermitteln, ob mit Disorazol konjugiertes GnRH als Mittel gegen Ovarialkarzinom einsetzbar ist. Dafür musste zunächst die gängige Annahme, dass ovariale Krebszellen eine hohe Expression des GnRH-Rezeptors zeigen, überprüft werden und dies auch an Primärmaterial gezeigt werden, damit bei einem therapeutischen Einsatz eine spezifische Zielrichtung auf diese Zellen erfolgen kann. Schließlich sollte in mehreren Toxizitätsanalysen nachgewiesen werden, ob und wie Disorazolkonjugate inhibierend auf das Zellwachstum wirken. Abschließend wurden weitere Analysen zu Interaktionen und Hämatotoxizität durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Antikörper

Tabelle 2: Antikörper und ihre Herkunft

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Spezies</u>	<u>Label</u>	<u>Klon/Katalog-Nr.</u>
GnRH-R Antikörper (N-20):SC8682	Santa Cruz	Ziege, polyklonal	Unkonjugiert	sc-8682
GnRH-R Antikörper EPR5293	Novus Biologicals	Kaninchen, monoklonal	Unkonjugiert	NBP1-95988
GnRH-R Antikörper GHR-106-L	Lee et al. 2010 [71]	Maus, monoklonal	Unkonjugiert	
Anti-β-Actin Antikörper (I-19): SC1616	Santa Cruz	Ziege, polyklonal	Unkonjugiert	sc-1616
Anti-β-Actin Antikörper, Maus	Biolegend	Maus, monoklonal	Unkonjugiert	643802
Anti-Maus IgG- Antikörper (Sekundärantikörper)	Cell signaling Technology	Pferd	HRP	7076S
Anti-Ziege IgG- Antikörper (Sekundärantikörper)	Santa Cruz	Esel, polyklonal	HRP	sc-2020
Anti-Kaninchen IgG Antikörper (Sekundärantikörper)	Cell signaling Technology	Ziege	HRP	7074S

2.1.2 Geräte

Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur	MupiD-exU, Eurogentec GmbH, Köln, Deutschland
Autoklav	H+P, Labortechnik AG, Oberschleißheim, Deutschland
Brutschrank	Thermo Electron GmbH, Dreieich, Deutschland
Digitalkamera	Canon, Japan
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, Illinois 60061, USA
ELISA-Reader	Sunrise Tecan, Crailsheim, Deutschland
FACScan	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Gefrierschrank	Liebherr; Thermo Electron, Kirsch, Deutschland
Geldokumentationssystem	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Heizblock	Biometra GmbH
Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland
Kryobox	Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland

Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz Thermo Electron GmbH
Luminometer	Orion II Berthold Detection Systems, Pforzheim, Deutschland
Magnetrührer	VWR, Darmstadt, Deutschland
Mikroskope	Leica, Wetzlar, Deutschland Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle	Sharp Electronics Europa, Deutschland
PCR-Thermocycler	Biometra GmbH
pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Photometer	Thermo Electron GmbH
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Power-Supply	Thermo Electron GmbH
Röntgenfilmkassetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Rollinkubator	Stuart, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK
Schüttler	Heidolph Instrumente GmbH, Schwabach, Deutschland
SDS-Gelelektrophorese-System	Whatman, GE Healthcare, München, Deutschland

Sterilbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Stickstofftank	Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland
Vortex	VWR, Darmstadt, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf AG
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München, Deutschland
Ultratiefkühlschrank (-86°C)	Heraeus, Hanau, Deutschland
UV-Lampe	Biometra GmbH
Wasserheizbad	Julabo, Seelbach, Deutschland
Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zählkammer	Carl Roth GmbH
Zentrifugen	Eppendorf AG; Thermo Electron

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

ACD-A (Natriumcitratlösung)	Haemonetics, Braintree, Massachusetts, USA
Acrylamid/ Bisacrylamid	Carl Roth GmbH
AEZS125	Æterna Zentaris, Frankfurt, Deutschland
Agarose	Carl Roth GmbH
Ampicillin	Carl Roth GmbH
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH

Annexin-V (-FITC)	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Aprotinin	Carl Roth GmbH
7-aminoactinomycin D (7-AAD)	Biotium, Fremont, Kalifornien, USA
Aqua ad iniectabilia	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Beriglobinlösung	CSL Behring GmbH, Hattersheim, Deutschland
Brefeldin A	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH
Bovines Serum Albumin (BSA)	AppliChem GmbH
Carboxylfluorescein succinimidylester (CFSE)	Calbiochem, Molecular Probes
Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Coomassie Brilliant Blue 6250	Sigma-Aldrich
Cutasept	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH
Disorazol Z	Æterna Zentaris
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA)	AppliChem GmbH
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)- tetraessigsäure (EGTA)	AppliChem GmbH

Eisessig	Carl Roth GmbH
Essigsäure	Carl Roth GmbH
Ethanol (EtOH)	Klinikapotheke des Uniklinikums Würzburg
FACS-Clean	Becton Dickinson (BD), Franklin Lakes, New Jersey, USA
FACS-Flow	BD
FACS-Rinse	BD
Fötales Kälberserum („fetal calf serum“, FCS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Formaldehyd	Carl Roth GmbH
Formamid	Carl Roth GmbH
FugeneHD Transfection Reagenz	Roche AG, Basel, Schweiz
GelRed	Biotium
Geneticindisulfat (G418)	Carl Roth GmbH
GnRH-Peptid	Æterna Zentaris
Glycin	Carl Roth GmbH
Glycyl-Glycin	Carl Roth GmbH
Glycerin	Carl Roth GmbH
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonsäure (Hepes)	Carl Roth GmbH
Humanes Serumalbumin (HSA)	CSL Behring GmbH

Isopropanol	Carl Roth GmbH, Merck
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH
(Di-) Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Kalium (di-)hydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Kaninchenserum	Caltag Laboratories, Carlsbad, Kalifornien, USA
Kristallviolettsalz	Carl Roth GmbH
Leupeptin	Carl Roth GmbH
Luziferin	P.J.K., Kleinblittersdorf, Deutschland
Luminolsalz	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH
beta-Mercapthoethanol	Carl Roth GmbH
Methanol (MetOH)	Merck
Monensin USA	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
Natriumacetat	AppliChem
Natriumazid	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH
Natriumfluorid	AppliChem

Natrium (di-)hydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Natriumhydrogenphosphat	AppliChem
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH
Natriumorthovanadat	AppliChem
Nonidet P-40	Carl Roth GmbH
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH
Penicillin/Streptomycinlösung (P/S)	PAA
peqGold TriFast-Lösung	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Phythämagglutinin (PHA)	Sigma-Aldrich
Phospho-Stopp (Tabletten)	Roche AG
PKH-26	Sigma-Aldrich
Phorbol-12-myristoyl-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH
Ponceau S	Carl Roth GmbH
PrepProtect	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Puromycin	Carl Roth GmbH
Reporter-Lysis-Buffer	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Roti-Quant	Carl Roth GmbH
RPMI1640	PAA
Salzsäure	AppliChem

Saponin	Carl Roth GmbH
SDS	Carl Roth GmbH
SYBR Safe DNA Gel Stain	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Carl Roth GmbH
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH
Triethanolamine	Carl Roth GmbH
Tricine	Carl Roth GmbH
Tri-Reagenz	Thermo Fisher Scientific Abgene, San Diego, Kalifornien, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)-Ultra	Carl Roth GmbH
Tris-HCl	Carl Roth GmbH
Triton-X-100	Carl Roth GmbH
Tween20	Carl Roth GmbH
Verapamil-Hydrochlorid	Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien
VybrantDill	Cambrex, East Rutherford, New Jersey, USA
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich
WST-1-Reagenz	Roche AG

In dieser Arbeit wurde ausschließlich Disorazol Z verwandt und im Allgemeinen als Disorazol bezeichnet.

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

FACS-Röhrchen	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Falcon-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Film (TaqMan)	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Filmentwickler	Kodak, Rochester, New York, USA
Filmfixierer	Kodak
Handschuhe	Cardinal Health, Dublin, Irland
Injektionskanüle	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
LS Säulen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Luminometerplatten	Greiner bio-one
Microteströhrchen (Eppendorf-Caps)	Greiner bio-one
Mikrotiterplatten (Maxisorp)	Nunc
Nylon Cell Strainer 70 µm	BD
Parafilm	Pechiney, Chicago, Illinois, USA
PCR-Röhrchen (8-Streifen, 96-Loch-Platte)	Sarstedt
Perfusorspritze	B. Braun
Petri-Schalen	Carl Roth GmbH
Pipettenspitzen	Sarstedt

PDMF-Membran	Carl Roth GmbH
Röntgenfilme	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Zellkulturflasche (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner bio-one
Zellkulturplatten (96-, 24-, 12-, 6-Lochplatten)	TPP, Trasadingen, Schweiz
2.1.4 Puffer und Lösungen	
50 x TAE	2 M Tris, 0,6 M EDTA, 0,57% Essigsäure
6 x DNA- Ladepuffer	30% Glycerin, 50 mM EDTA, 0,001% Bromphenolblau
FACS-Puffer	PBS, 2% FCS
Freezing-Medium	70% FCS, 20% Standardmedium, 10 % DMSO
PBA	PBS, 1% BSA
PBS	37 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 80 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 M KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
PBS-T	PBS, 0,05% Tween20
Standardmedium	88,5% RPMI 1640, 10% FCS, 1% P/S
TBS 7.5	10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH
TBS-T	TBS mit 0,05% Tween20

2.1.5 verwendete Kits

Absolute Blue QPCR SYBR Green low Rox mix	Thermo Fisher Scientific GmbH
Cell Proliferation Reagent WST	Roche AG
Crimson longAmp Polymerase Kit	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA

2.1.6 Lösungen für Gelelektrophorese und Westernblotting

Blockpuffer	5% Magermilchpulver in PBS-T
ECL Lösung A	50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M Tris- HCl, pH 6,8
ECL Lösung B	11 mg para- Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO
Laufpuffer	25 mM Tris. 193 mM Glycin, 0,5% SDS, pH 8,8
Lysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8, 120 mM NaCl, 5mM EDTA, 0,5% NP-40, 2 µg/ml, Aprotinin, 10µg/ml Leupeptin, 100 µg/ml PMSF, 50 mM NaF, 200 µM NaVO ₅
Neutralisierungspuffer	1,5 M Tris-Base pH 7.4
PBS-T	PBS, 0,05% Tween20
Ponceau S Lösung	0,2% Ponceau S in 3% Trichloressigsäure

5x Proteinladepuffer	100 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 0,2% Bromophenolblau, 20% Glycerol, 10% β -Mercaptoethanol
Stripping-Puffer	0,2 M Glycin, 0,5 M NaCl, pH 2,8
Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol
Trenngel 10%	1,9 ml dd H ₂ O, 1,7 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%), 1,3 ml Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, 50 μ l SDS (10%), 50 μ l APS (10%), 2 μ l TEMED
Sammelgel 5%	0,68 ml dd H ₂ O, 0,17 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%), 0,13 ml Tris-HCl 1 M, pH 6,8, 10 μ l SDS (10%), 10 μ l APS (10%), 1 μ l TEMED

2.1.7 Primer und Oligonukleotide

GnRH-Rezeptor 1 forward	TGCTCGGCCATCAACAACA
GnRH-Rezeptor 1 reverse	GGCAGTAGAGAGTAGGAAAAGGA
GnRH-Rezeptor 2 forward	GCATTTGACCTTAGCCAACCT
GnRH-Rezeptor 2 reverse	AAGCTGGGGCATACATAGAGA

2.1.8 Zelllinien

Tabelle 3: Zelllinien, Spezifizierung und Herkunft

Name	Spezies, Zusatz	Herkunft
LTK wt	Murine Fibroblasten, Wildtyp	Æterna Zentaris, Frankfurt, Deutschland
LTK L3.5/78	Murin, GnRH-Rezeptor exprimierend	Æterna Zentaris, Frankfurt, Deutschland
LTK Zeo37.1(5C6)	Murin, GnRH-Rezeptor sowie Luciferase exprimierend	Æterna Zentaris, Frankfurt, Deutschland
SKOV3G	Human, Ovarialkarzinom	American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, Virginia, USA
OvCAR3G	Human, Ovarialkarzinom	ATCC Manassas, Virginia, USA
Hec1BG	Human, Endometriumkarzinom	ATCC Manassas, Virginia, USA
Hec1A	Human, Endometriumkarzinom	ATCC Manassas, Virginia, USA
HepG2	Human, Leberzellkarzinom	ATCC Manassas, Virginia, USA
OaW-42	Human, Ovarialkarzinom	European Collection of Cell Cultures (ECACC), Public Health England, Salisbury, Großbritannien

A2780/A2780 cis	Human, Cisplatinresistent	cis: Æterna Zentaris, Frankfurt, Deutschland
MCF-7	Human, Mammakarzinom	ATCC Manassas, Virginia, USA
HCC1806	Human, triple-negatives Mammakarzinom	ATCC Manassas, Virginia, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Isolierung

Die gefrorenen Zellen wurden rasch im warmen Wasserbad aufgetaut und in vorgewärmtem Medium resuspendiert. Zur Entfernung des Freezing-Mediums wurde ein Waschschrift mit 5 ml Medium und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 1500 rpm durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in 15 ml frisches Medium übertragen und in 25 und 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zur Ablösung von adhärennten Zellen wurde nach einmaligem Waschen mit 10 ml PBS 1 ml Trypsin/EDTA oder Accutase hinzugegeben. Nach 5 bis 10 min konnten die Zellen mit 9 ml Medium abgelöst und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min bei 1.500 rpm) weiter kultiviert werden. Sollten Zellen kryokonserviert werden, wurden sie in 1 ml Freezing-Medium resuspendiert und in Kryoröhrchen übertragen. Diese wurden für mindestens 24h in Kryoboxen bei -80°C tiefgefroren und anschließend in den Stickstofftank überführt. Für Experimente wurden zu 20µl der abgelösten Zell-Lösung 20 µl Trypanblau gegeben und in der Zählkammer ausgezählt. Nach anschließender Divison durch 4 und Multiplikation mit Faktor 20.000 ergab sich die Zellzahl pro ml. Zur weiteren Subkultivierung wurden zwischen 5.000 und 200.000 Zellen pro Loch in Zellkulturplatten übertragen. Die Experimente wurden, wenn nicht anders beschrieben, in Triplikaten durchgeführt.

Die Isolierung von peripheren Blutlymphozyten („*peripheral blood lymphocytes*“, PBL) wurde folgendermaßen durchgeführt: Aus der Armbeuge eines gesunden Probanden

wurden 50 ml Vollblut in eine zur Antikoagulation mit 10% Citratpuffer gefüllte Perfusor-Spritze entnommen. Dieses wurde mit 90 ml vorgewärmtem PBS verdünnt. Anschließend wurden langsam 35 ml von dieser Mischung auf 15 ml Biocoll-Lösung in einem 50ml-Röhrchen gegeben. Dieser Komplex wurde dann bei 600 rpm 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Von diesem sogenannten Gradienten wurden 5 ml der obersten Schicht, die vor allem Thrombozyten enthält, abgesaugt und danach weitere 30 min bei 1400 rpm ohne Bremse zentrifugiert, um die verschiedenen Leukozyten und anderer Bestandteile aufgrund unterschiedlicher Größe und Dichte weiter zu separieren. Der dabei entstehende weißliche Ring wurde mittels Glaspipetten abgesaugt, in ein neues 50 ml-Röhrchen übertragen und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nun wurde erneut zentrifugiert bei 1800 rpm für 10 min und der Überstand abgesaugt. Darauf folgte ein weiterer Waschschrift, indem das Pellet in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert wurde. Das neue Pellet wurde schließlich in RPMI1640-Komplettmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche übertragen. Diese wurde für 1h bei 37°C inkubiert, damit in der Zellsuspension vorhandene Monozyten adhären konnten. Zellen, die sich anschließend noch in Lösung befanden, stellten Lymphozyten dar und konnten für Experimente herangezogen werden.

2.2.2 Molekularbiologie

2.2.2.1 Isolierung von mRNA

Zellen wurden mit Trypsin-EDTA abgelöst, abzentrifugiert und in 1 ml peqGold TriFast-Lösung resuspendiert und in ein Eppendorf-Cap überführt. Dies wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurde 200 µl Chloroform dazugegeben, 15 sec geschüttelt und 2 bis 3 min inkubiert. Darauf wurde 15 min bei 12.000g und 4°C zentrifugiert. Die sich dabei bildende obere Phase wurde in ein neues Cap überführt und 500 µl Isopropanol hinzugefügt. Dies wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut wie oben 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 1 ml 75% Ethanol resuspendiert. Nun wurde erneut bei 7.500g und 4°C für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet.

Abschließend wurde es in 50 µl dH₂O. resuspendiert. Die Konzentration der RNA-Lösung wurde photometrisch bestimmt.

2.2.2.2 DNA-Verdau und RNA-Fällung

Es wurde zunächst ein Mastermix angesetzt, der je Probe 56,8 µl H₂O, 7,8 µl 3M Natriumacetat pH 5,5, 40 µl 25mM MgCl₂ und 3,6 µl DNase I enthielt. Pro 50 µl RNA-Lösung wurde 55µl Mastermix verwendet. Dies wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann wurden 10 µl 3M Natriumacetat pH 8,0 und 250 µl 100% Ethanol hinzugefügt, vermischt und 15 min bei -20°C inkubiert. Nun wurde bei 15.000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in 15 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

2.2.2.3 Umschreiben in cDNA

Um die isolierte RNA in cDNA umzuschreiben, wurde das kommerziell erhältliche iScript™ cDNA Synthesis Kit von Biorad verwendet. Dazu wurde pro Ansatz 8 µl 5 x iScript reaction mix, 2 µl reverse Transcriptase und 1 µg RNA verwendet. Es wurde mit Nuclease-freiem Wasser auf 40 µl aufgefüllt und die Synthese anschließend in einem PCR-Thermocycler bei einem Ablauf von 5 min 25°C, 30 min 42°C, 5 min 85°C durchgeführt. Der DNA-Gehalt konnte nun photometrisch bestimmt und die DNA bei -20°C aufbewahrt werden.

2.2.2.4 Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde mit dem Absolute Blue SYBR Green Low Rox Kit von Thermo Scientific durchgeführt (vgl. Tabelle 4 und 5). Die Proben wurden als Duplikate angesetzt. Die relative Expression der mRNA wurde in Beziehung der Expression der 18s-RNA der Zellen sowie einer Referenzprobe gesetzt. Die C_T (cycle threshold)-Werte sind indirekt proportional zur Menge der RNA und somit ein Maß für die Stärke der Expression. Nach folgender Formel wurden nun die 2^{-ddC_T}-Werte berechnet: 2^[(C_T Probe – Ct18S Probe) - (C_T Referenz– C_T 18S Referenz)].

Tabelle 4: Mengenangaben für eine Probe der RT-PCR-Ansätze

Komponente	Menge
2 x <i>Absolute Blue SybrGreen-Mix</i>	7,5 µl
<i>Primer forward</i> (5 µM)	1 µl
<i>Primer reverse</i> (5 µM)	1 µl
<i>Aqua ad iniectionabilia</i>	0,5 µl
cDNA 1:20 in <i>Aqua ad iniectionabilia</i>)	5 µl

Tabelle 5: Programmablauf der RT-PCR

Temperatur	Inkubationszeit
50°C	2 min
95°C	15 min
95°C	15 sec (40 Zyklen)
60°C	1 min (40 Zyklen)
95°C	15 sec (Dissoziationskurve)
60°C	1 min
95°C	15 sec

2.2.3 Reporter-gen-Versuche

Um die Funktionalität des Rezeptors und der daran gekoppelten Signalwege zu überprüfen, wurden Reporter-gen-Versuche durchgeführt. Die murine Fibroblasten-Zelllinie LTK Zeo37.1(5C6) ist zusätzlich neben dem GnRH-Rezeptor mit einem cAMP-responsive element (CRE)-induzierbaren Luciferase-Reporter-System transfiziert. Somit wird bei Aktivierung des Rezeptors und Produktion von zyklischem AMP eine CRE-Sequenz aktiviert, die für die Regulation der Expression verschiedener Gene und andere Signalwege zuständig ist. Bei Erhöhung des cAMP-Spiegels intrazellulär erhöht sich die Expression der Luciferase und somit wird mehr Luciferin umgesetzt, was luminometrisch messbar ist.

Die murinen Zelllinien wurden wie oben beschrieben abgelöst und in 96 Loch-Mikrotiterplatten ausgesät. Nach einer Inkubation von 24h wurden die Substanzen

AEZS125 (100 μ M), Disorazol (10 μ M) und Forskolin (50 μ M) als Positivkontrolle sowie das Peptid (100 μ M) hinzugegeben und über 4h inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Vertiefungen mit 100 μ l PBS gewaschen und danach mit 50 μ l Reporter-Lyse-Puffer (Verdünnung 1:5) behandelt. Dies wurde 20 min bei Raumtemperatur belassen und schließlich bei -20°C über Nacht eingefroren. Die Platten wurde dann bei 3.000 rpm für 5 min zentrifugiert und vom Überstand wurde 25 μ l auf eine weiße Mikrotiterplatte übertragen. Zu den Lysaten wurden 25 μ l Luciferin-Puffers (vgl. Tabelle) hinzugefügt und im Luminometer vermessen.

Tabelle 6: Puffer für Luciferase-Versuch

Substanz	Basiskonzentration	Zielkonzentration	Benötigte Menge
Glycyl-Glycerin	0,5 M	25 mM	500 μ l
K ₂ HPO ₄ pH 8	1 M	15 mM	150 μ l
EGTA	0,5 M	4 mM	80 μ l
DTT	0,1 M	1 mM	100 μ l
Coenzyme A	50 mM	0,1 mM	20 μ l
Luciferin	20 mM	75 μ M	37,5 μ l
ATP	50 mM	2 nM	400 μ l
MgSO ₄	1 M	15 mM	150 μ l

2.2.4 Durchflusszytometrie

Für jedes Experiment wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet, in Zellkulturplatten ausgesät und anschließend über einen bestimmten Zeitraum mit den jeweiligen Substanzen behandelt. Danach wurde die entsprechende Färbung durchgeführt. Die Vermessung der Proben wurde in einem FACS Calibur-Gerät

durchgeführt und die Daten anschließend mit Hilfe des Summit-Programms analysiert (Beckman-Coulter, Version 4.3).

2.2.4.1 Annexin-V -Färbung

Um genaueres über die Art der Toxizität von Disorazol und mit diesem konjugiertes GnRH herauszufinden, sollte auch unterschieden werden, ob es sich um einen mehrheitlich unter Apoptose laufenden Zelltod handelt – also einem genau definierten und regulierten Programm, das in den Zellen abläuft – oder ob die Zellen nekrotisch werden, was einem pathologischen eher unkontrollierten Zelltod entspricht, der durch verschiedene Noxen hervorgerufen wird. Gehen Zellen in Apoptose, laufen inzwischen genau bekannte Prozesse ab. Zu diesen gehört die Umverteilung der Phospholipide in der Zytoplasmamembran und vor allem der Transport der Phosphatidylserine auf ihre Außenseite. Fluoreszenzmarkiertes Annexin-V bindet an diese und kann so apoptotische Zellen in der Durchflusszytometrie sichtbar machen [72]. Bei apoptotischen Zellen bleibt die Zellmembran jedoch intakt, was eine genauere Unterscheidung zur Nekrose möglich macht. Die Substanzen 7-Amino-Actinomycin (7AAD) und Propidiumiodid (PI) binden sehr stark an DNA, können aber nicht durch Plasmamembranen in intakte Zellen eindringen. Aus diesem Grund sind Zellen, die nekrotisch sind oder sich in einer späten Phase der Apoptose befinden und deren Plasmamembranen bereits zerstört sind, sowohl Annexin-V- als auch 7-AAD/PI-positiv [73].

Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt: Die Zellen wurden nach entsprechender Behandlung oder unter Kontrollbedingungen kultiviert und mit Accutase abgelöst. Anschließend wurden sie zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in 100 µl Annexin-V-Bindepuffer resuspendiert und bei 1.400 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 µl Annexin-V-Bindepuffer mit je 2 µl Annexin-V-FITC pro 50 µl Lösung aufgenommen. Propidiumjodid wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml hinzugegeben und zusammen für 15 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschriff mit Annexin-V-Bindepuffer und das Pellet wurde erneut in 100 µl Puffer aufgenommen. Abschließend wurden die Proben am Durchflusszytometer gemessen. Zellen, die sich positiv für

Annexin-V zeigten, wurden als apoptisch gewertet. Zellen, die sich zusätzlich auch noch mit PI anfärbten, als nekrotisch.

2.2.5 Proliferations-und Toxizitätsversuche

2.2.5.1 Kristallviolettversuch

Um die toxische Wirkung der Substanzen auf verschiedenen Zelllinien zu evaluieren, wurde der Kristallviolettversuch nach Flick angewandt [74]. Dabei wurden die Zellen trypsinisiert, mobilisiert und in Mikrotiterplatten mit einer Dichte von 5.000 Zellen/well (bei 96 Vertiefungen) beziehungsweise einer Dichte von 20.000 Zellen/well (bei 24 Vertiefungen) überführt. Nach einer Anwuchsphase über 48h wurden die verschiedenen Substanzen zugefügt und nach den jeweiligen Zeitpunkten die Färbung durchgeführt. Dazu wurde der Überstand mit den toten und daher abgeschwommenen Zellen verworfen. Die adhärenen Zellen wurden einmal mit 100 µl bzw. 1.000 µl PBS gewaschen. Zum Färben wurden 50 µl bzw. 200 µl Kristallviolett-Lösung dazu gegeben und 25 min auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Platte durch mehrmaliges Tauchen in Wasser gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Durch Hinzufügen von 50 µl bzw. 200 µl Methanol wurde der in den Zellen enthaltene Farbstoff gelöst und nach 15 min wurden die Platten im Elisa-Photometer bei 540 nm vermessen, wobei die Extinktion als Maß für die noch haftenden Zellen gewertet werden kann. Anschließend wurde der Anteil noch adhärenter Zellen relativ zu unbehandelten Zellen berechnet.

2.2.5.2 WST-Versuch

Nicht nur die Adhärenz von Zellen stellt ein Maß für die Viabilität dar, sondern auch die metabolische Aktivität. Um diese unter Behandlung mit den verschiedenen Toxinen zu untersuchen, wurden Versuche mit dem WST-Reagenz durchgeführt. Dieser Versuch hat den Vorteil, dass er ohne Radioaktivität auskommt und innerhalb von 2 bis 5h durchzuführen ist im Gegensatz zu den klassischen radioaktivitätsabhängigen oder dem zeitaufwändigen BrdU Assay. Das Prinzip des WST-Versuchs ist ähnlich wie beim MTT-Assay und beruht darauf, dass das Tetrazolium-Salz in lebenden Zellen durch

mitochondriale Dehydrogenasen enzymatisch reduziert wird. Dies führt zu einer Farbänderung, die photometrisch messbar ist [75].

Um die verbleibende metabolische Potenz nach Behandlung mit Disorazol und seinen Konjugaten zu evaluieren, wurden Zellen (100.000 in 100 µl) in 96 well-Platten kultiviert und für 24h-72h mit den jeweiligen Substanzen behandelt. Anschließend wurde 10 µl WST-1-Reagenz pro well hinzugegeben und bei 37°C für 2-4h abhängig vom Zelltyp inkubiert. Schließlich wurde die Absorption bei 450 nm in einem Photometer gemessen und die relative metabolische Aktivität wurde errechnet und auf unbehandelte Zellen normalisiert.

2.2.6 Proteinbiochemie

2.2.6.1 Zellyse und Isolierung von Proteinen

Circa 2 Millionen Zellen verschiedener Zelllinien wurden trypsinisiert, mobilisiert und in ein 15 ml Röhrchen überführt, anschließend mit 1.400 rpm 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Pellet in 5 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 1ml Lysepuffer P mit verschiedenen Protease-Inhibitoren (2 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 100 µg/ml PMSF, 50 mM NaF, 200 µM NaVO₅) resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf Cap übertragen. Dieses wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 15 min bei 4°C mit 21.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Cap übertragen und zur Aufbewahrung bei -80°C eingefroren.

2.2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Für weitere Experimente musste die Proteinmenge in den Lysaten bekannt sein, um gleiche Mengen zu benutzen. Dafür wurde ein Bradford-Assay durchgeführt. Dabei bildet der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G250 Komplexe mit Proteinen, was eine mit einem Photometer messbare Reaktion hervorruft. Eine HSA-Lösung als Standard mit einer Konzentration von 50 mg/ml wurde 1:50 verdünnt. In eine 96-Flachboden-well-Platte wurden pro well 50 µl ddH₂O gegeben, in ein Triplikon der Standardreihe jedoch 68 µl ddH₂O. Zu diesen wurde anschließend 32 µl 1 mg/ml HSA-Lösung pipettiert, vermischt und davon 50 µl in das nächste Triplikon übertragen. Dies wurde im Sinne

einer Verdünnungsreihe für sechs weitere Triplikons fortgesetzt, um so eine Standardreihe von 0,25-0,5-1-2-4-8-16 µg/ml zu erhalten. Von den zu evaluierenden Zelllysaten wurden je 1 µl in Triplikaten aufgetragen. Anschließend wurde das Bradford-Reagenz Rotiquant 1:5 mit ddH₂O verdünnt und davon je 200 µl in jedes Well gegeben. Danach wurde sofort die Absorption im ELISA-Reader bei 595 nm gemessen und die Proteinmenge anhand der Standardreihe bestimmt.

2.2.6.3 Auftrennung des Zelllysats mit Hilfe der *SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese* (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine wurden 10%- Polyacrylamidgele verwendet und mit einer Proteinmenge von 7,5 µg bis 20 µg beladen. Zunächst wurde das entsprechende Volumen berechnet und die Probe mit 3 x-Ladepuffer mit 10% β-Mercaptoethanol und 5 min bei 95°C denaturiert, sofort auf Eis gegeben und dann kurz zentrifugiert. Das Gel wurde in die SDS-PAGE-Kammer gegeben und diese mit Laufpuffer gefüllt. Die Proteinlösung wurde nun ebenso wie 8 µl des Größenstandards Spectra Protein Ladder auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Um die Proteine auf einer Höhe zu sammeln, wurden für 20 min 90V angelegt, anschließend für weitere 100 min 110V.

2.2.6.4 Western Blot

Nach Trennung entsprechend der verschiedenen Größen im Gel wurden die Gele aus der Kammer genommen, das Sammelgel abgetrennt und für 15 min in Transfer-Puffer gegeben, um das SDS auszulösen. Eine PVDF-Membran wurde für 2 min in 100% Methanol äquilibriert, mit Wasser gewaschen und auf in Transfer-Puffer getränktes Filterpapier gelegt. Darauf wurde das Gel gegeben und abschließend erneut Filterpapier. Überschüssiger Puffer wurde mittels eines Rollers entfernt und die Proteine bei 25V für 80 min in der *Semi Dry Transfer Cell* auf die Membran übertragen. Um den Transfer zu kontrollieren, wurde eine Färbung mit Ponceau-Rot durchgeführt, das sich an jegliche Proteine anlagert. Zur Entfärbung wurde die Membran zunächst in Wasser, anschließend in TBS-T gewaschen. Damit der später verwendete Antikörper nicht unspezifisch bindet, wurde die Membran für 1h mit 10 ml 5% Milchpulver in TBS-T inkubiert und kurz mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper

in 5% Milchpulver in TBS-T erfolgte über Nacht bei 4°C. Übliche Antikörper-Konzentrationen lagen bei 0,1-2 µg/ml. Hierauf erfolgten drei Waschschriffe mit TBS-T für jeweils 8 min und Inkubation mit dem HRP (horseradish peroxidase) -konjugierten sekundären Antikörper (1:5000) ebenfalls in 5% Milchpulver in TBS-T für 1h, gefolgt von erneut 3 Waschschriffen. Um die Bindung des Zweitantikörper sichtbar zu machen, wurden 3 ml ECL-Lösung A mit 300 µl ECL-Lösung B und 1 µl H₂O₂ angesetzt, worin die Membran für 2 min inkubiert wurde. Überschüssige ECL-Lösung wurde anschließend auf Zellstofftücher abgetropft und die Membran in eine Röntgenfilmkassette gegeben. Anschließend wurden die Filme für 1-5 min in den Kassetten belichtet und für einige min in die Entwicklungslösung gegeben. Danach erfolgte die Fixierung für circa 1 min im Dunkeln.

2.2.7 Statistik

Die Versuche wurden, wenn nicht anders erwähnt, in Triplikaten durchgeführt. Zur statistischen Analyse wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichung bestimmt. Weiterhin wurden Signifikanzberechnungen mittels Student's T-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test sowie dem Friedman-Test mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad Prism® 5.04 (GraphPad software Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Dabei galt ein p-Wert < 0,05 als signifikant (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

3. Ergebnisse

3.1 GnRH-Rezeptor-Expressionsanalyse

Grundbedingung für eine Therapie mit an GnRH gekoppelten Wirkstoffen ist das Vorhandensein des Rezeptors im Zielgewebe. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor für GnRH in gynäkologischen Tumorgeweben wie beispielsweise der Mamma und des Ovars exprimiert wird [36, 56]. Klonierung und Sequenzierung des Rezeptors zeigten, dass der GnRH Rezeptor in mammalen und ovariellen Tumorgewebe identisch ist mit dem der hypophysialen Zellen [76]. Somit stellt dieser Rezeptor einen Angriffspunkt für einen targeted Therapy-Ansatz mit GnRH bei Ovarialkarzinom dar. Um auch bei den hier verwendeten Zelllinien den Rezeptor nachzuweisen, wurden Analysen auf mRNA und Protein-Ebene durchgeführt.

3.1.1 Expression auf mRNA-Ebene

Die quantitative Untersuchung der mRNA-Menge (vgl. Abbildung 5) in der RT-PCR ergab die höchsten relativen Expressionswerte des GnRH-Rezeptors in Lymphozyten, wobei die Werte der SKOV3G-Zellen als 1 festgelegt wurden. Bei den übrigen ovariellen Karzinom-Zelllinien und den aus Tumormaterial isolierten Primärzellen (03, 07) fanden sich um mehr als die Hälfte geringere Werte.

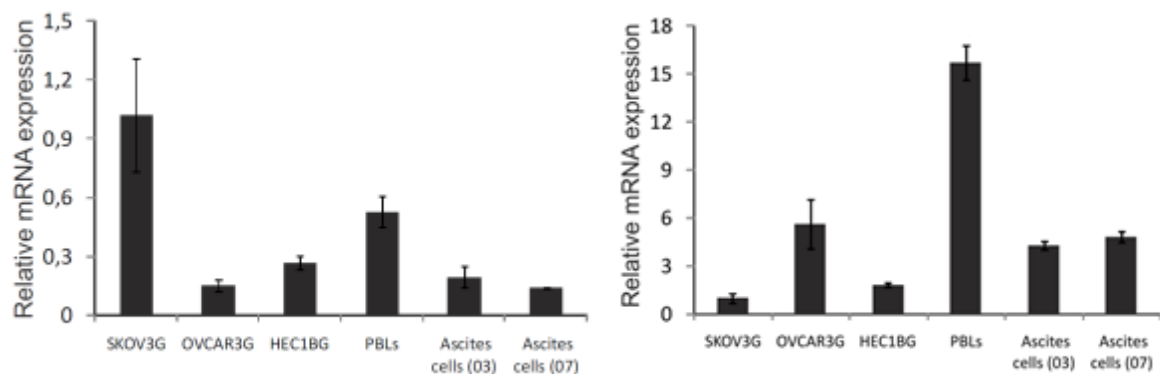


Abbildung 5: Relative Expression der GnRH-Rezeptor I (A) und II (B) mRNA in Ovarialkarzinom-Zelllinien normalisiert zu den Werten der SKOV3G-Zellen. mRNA von den einzelnen Zelllinien wurde isoliert und anschließend cDNA synthetisiert, mit der schließlich die RT-PCR durchgeführt wurde. PBL = periphere Blutlymphozyten

Auch bei den murinen Fibroblasten wurde eine RT-PCR durchgeführt (vgl. Abbildung 6). Diese ergab 800 bis 1200-fach höhere relative normalisierte mRNA-Level (2^{-ddC_T}) bei

den transfizierten Zellen. Unter den getesteten humanen Zellen zeigten die Lymphozyten ebenfalls die höchsten Werte verglichen mit den Karzinomzellen.

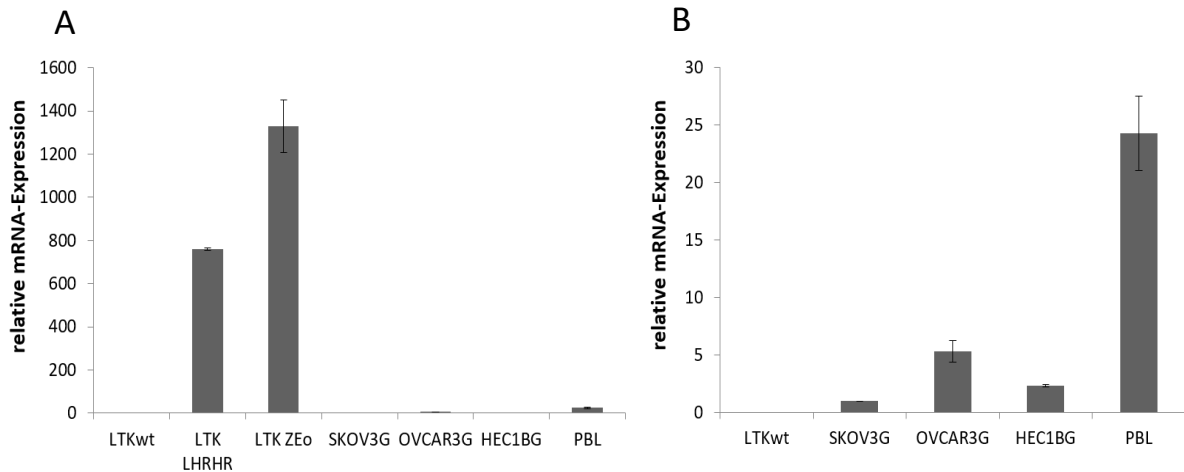


Abbildung 6: Relative mRNA Level in murinen Fibroblasten normalisiert zu SKOV3G (A). Von den einzelnen Zelllinien wurde mRNA isoliert und anschließend cDNA synthetisiert, mit der schließlich die RT-PCR in Duplikaten durchgeführt wurde. $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Werte wurden berechnet und sind mit Standardabweichung gezeigt. B: Darstellung ohne Rezeptor-überexprimierende Zellen zur besseren Übersicht.

3.1.2 Expression auf Protein-Ebene

Um die Expression des GnRH-Rezeptors auf Proteinebene zu analysieren, wurden Immunoblot-Techniken mit kommerziell erhältlichen Antikörpern (vgl. Tabelle 2) gegen den GnRH-Rezeptor eingesetzt. Dabei ergaben sich recht unterschiedliche Ergebnisse. Die besten und eindeutigsten Resultate konnten mit dem Antikörper von Novus (vgl. Abbildung 8) erzielt werden. Die Wildtyp-Zellen zeigten hier nur eine geringe unspezifische Mitreaktion. Mittels der Antikörper von Santa Cruz (vgl. Abbildung 7) und GHR-106L (vgl. Abbildung 9) konnten weniger spezifische Ergebnisse erreicht werden.

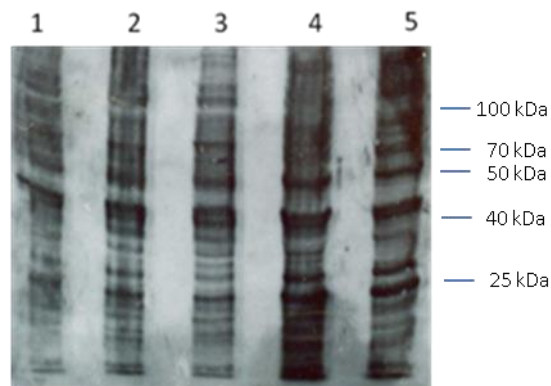


Abbildung 7: Western Blot mit GnRH-Rezeptor-Antikörper LHRHR (N-20) SC8682 von Santa Cruz. Zellen wurden geerntet, lysiert und die Gesamtheit der zellulären Proteine isoliert. Die Konzentration wurde mittels Bradford-Methode bestimmt. Zur Gelelektrophorese wurden 10 µg Protein je Spur aufgetragen und getrennt. Anschließend wurden die aufgetrennten Spuren auf eine Zellulose-Membran übertragen und mit dem Antikörper (1:1000 verdünnt, 0,2µg/ml) gefärbt. Nach ausreichender Inkubationszeit und Wasch-Schritten, erfolgte eine Gegenfärbung mit dem Sekundärantikörper (Anti-Ziege IgG, 1:5000 verdünnt, 0,08µg/ml). 1: LTK wt, 2: LTK L3.5/78, 3: LTK Zeo 37.1(5C6), 4: SKOV3, 5: OAW42

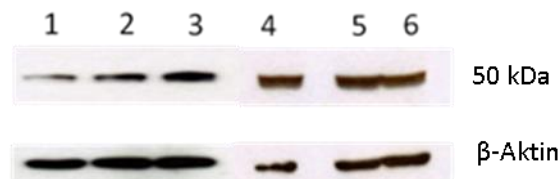


Abbildung 8: Western Blot mit dem GnRHR Antikörper EPR5293 (Novus). Zellpräparation sowie Gelelektrophorese und Blotting wurde durchgeführt wie oben beschrieben mit einer Proteinmenge von 7,5 µg je Spur, EPR5293 1:1000 verdünnt, Sekundärantikörper Anti-Kaninchen Ig IgG 1:5000 verdünnt β -Aktin Antikörper sc1616 1:1000 verdünnt, 0,1µg/ml, Anti-Ziege IgG 1:5000 verdünnt, 0,08µg/ml. 1: LTK wt, 2: LTK L3.5/78, 3: LTK Zeo 37.1(5C6), 4: OAW42, 5: SKOV3, 6: MCF7

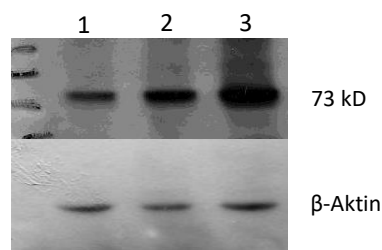


Abbildung 9: Western Blot mit GHR-106L (Lee et al. 2010 [71]). Zellpräparation sowie Gelelektrophorese und Blotting wurde durchgeführt wie oben beschrieben mit einer Proteinmenge von 7,5 µg je Spur, GHR-106L 1:1000 verdünnt, Sekundärantikörper Anti-Kaninchen IgG 1:5000 verdünnt. 1: LTK wt 2: LTK L3.5/78 3: LTK Zeo37.1(5C6)

3.2 Rezeptor-Funktionstest

Bei Aktivierung des GnRH-Rezeptors entsteht über diverse Zwischenschritte zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Dieses kann über eine CRE-Sequenz die Expression verschiedener Gene aktivieren. Die Zelllinie LTK Ze037.1(5C6) weist neben dem humanen GnRH-Rezeptor eine CRE-induzierbare Luciferase auf. Diese wiederum setzt Luciferin unter Emission von Lichtquanten um. Bei Behandlung der murinen Fibroblasten-Zelllinien mit Disorazol, AEZS125, dem GnRH-Peptid und Forskolin als Positivkontrolle ergaben sich erhöhte Lichteinheiten sowohl bei AEZS125, Forskolin und dem Peptid, wobei die mit dem Konjugat behandelten Zellen mit über 400000 Einheiten die höchste Induktion zeigten (vgl. Abbildung 10).

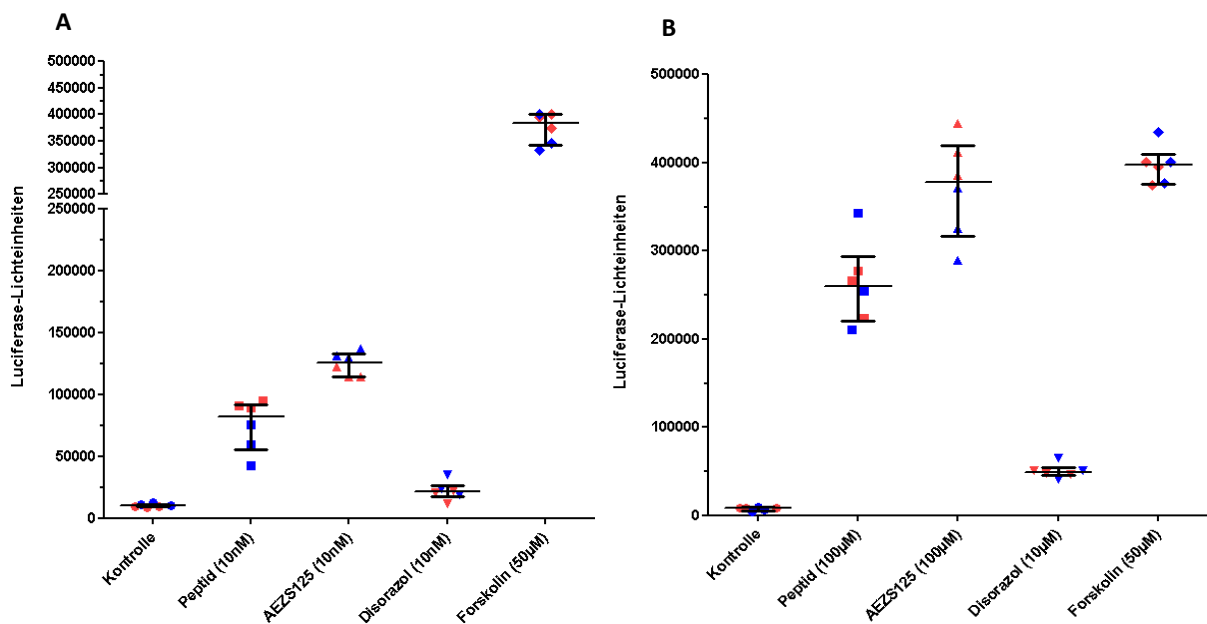
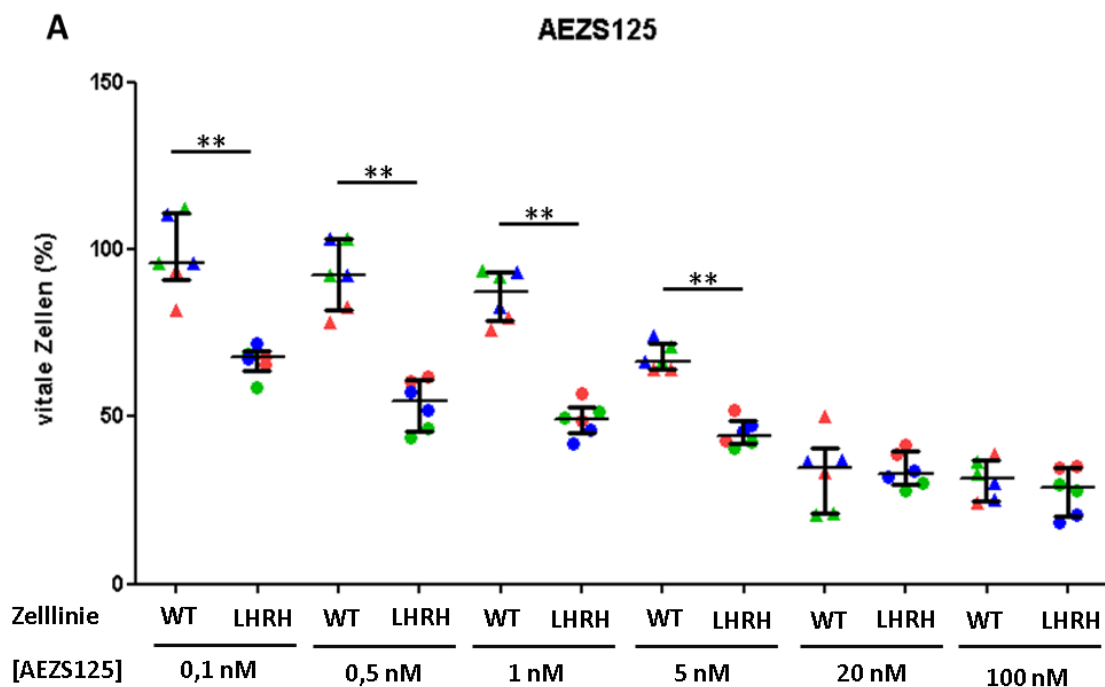


Abbildung 10: Lichteinheiten im Luciferase-Test: Die Zellen der einzelnen Zelllinie LTK Ze037.1(5C6)-Zellen wurden auf 96 well-Platten mit den entsprechenden Substanzen in verschiedenen hohen Konzentrationen (A bzw. B) behandelt, 4h inkubiert und anschließend gewaschen. Schließlich wurde Luciferin hinzugegeben und die abgestrahlten Einheiten im Luminometer vermessen. Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten sind unterschiedlich farbig dargestellt zusammen mit Median und Interquartilsabstand.

3.3 Toxizität von Disorazol Z und GnRH-Konjugaten

Um die Auswirkungen von Disorazol allein und in Verbindung mit GnRH zu untersuchen, wurden zunächst Kristallviolett-Versuche (vgl. Abbildung 11) durchgeführt. Dabei ergaben sich bei Behandlung mit steigenden Konzentrationen von Disorazol sowohl bei GnRH überexprimierenden Zellen als auch bei Wildtyp-Zellen kontinuierlich fallende Anteile an überlebenden Zellen (vgl. Abbildung 11B). Hier unterschieden sich die Zelllinien bei den jeweiligen Konzentrationen nicht signifikant. Bei AEZS125 und dem GnRH-Peptid unterscheiden sich die Zelllinien: der Anteil überlebender LTK Ze037.1(5C6)-Zellen unter AEZS125 liegt bei etwa 65% und fällt weiter mit steigender Konzentration des Wirkstoffes (signifikante Ergebnisse im Bereich 0,1 nM bis 5 nM). Die Wildtyp-Zellen zeigen eine Reduktion der Zelldichte erst ab 5 nM. Unter Behandlung mit dem Peptid liegt die Dichte bei LTK WT-Zellen kontinuierlich um 100%, während die Werte bei den überexprimierenden Zellen darunterliegen.



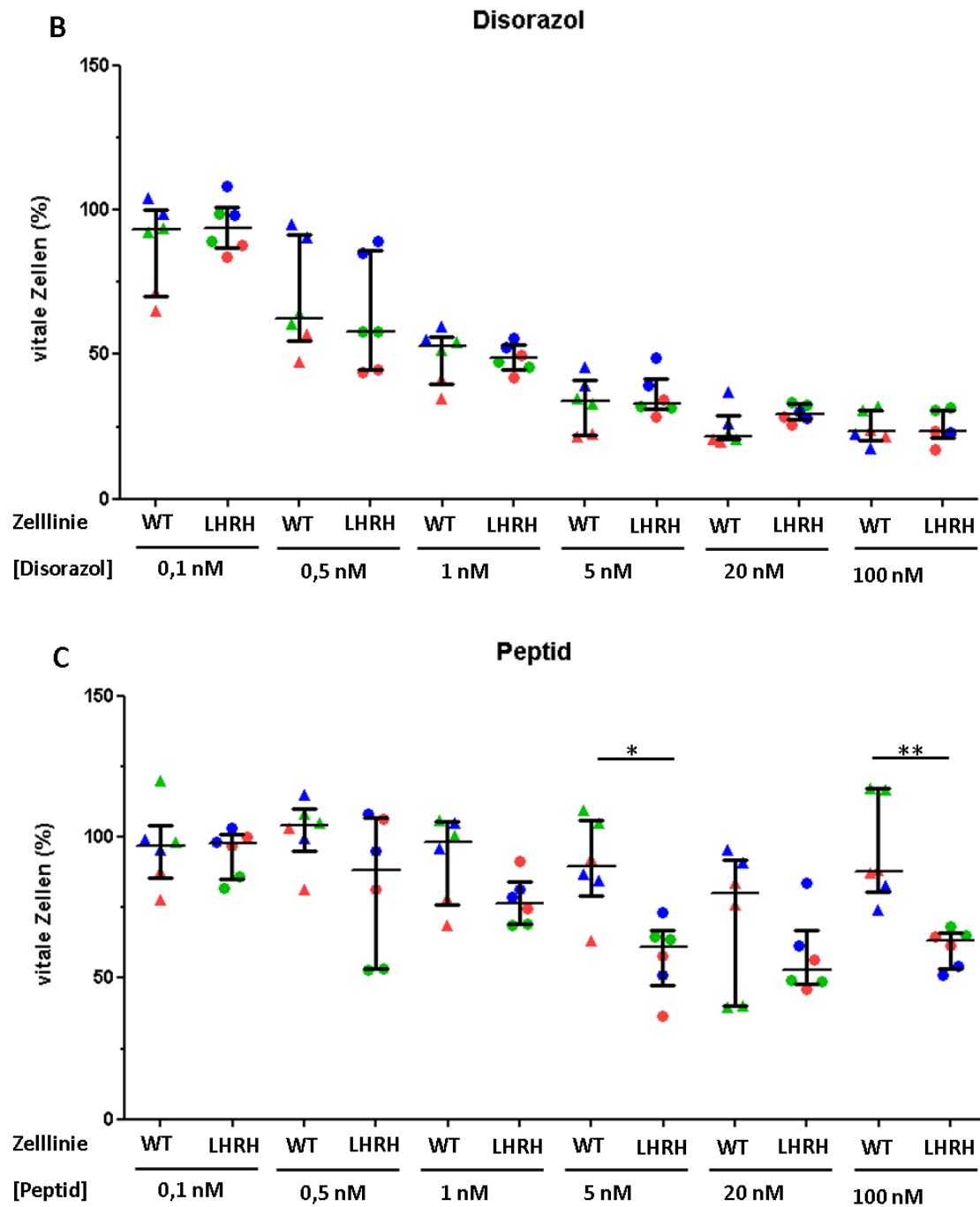


Abbildung 11: Spezifitätsanalyse anhand des Kristallviolett-Versuchs in murinen Fibroblasten: der Anteil an überlebenden Zellen ist relativ zu den unbehandelten Zellen in Prozent angegeben. LTK-Zellen wurden in 96 well-Platten in Duplikaten kultiviert und entweder unbehandelt belassen oder mit AEZS125 (A), Disorazol (B), oder dem GnRH-Peptid (C) in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 48h wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und die relative Zelldichte wurde anhand der Absorption bei 540nm gemessen. Die Ergebnisse als Anteil der überlebenden Zellen von drei unabhängigen Experimenten sind unterschiedlich farbig dargestellt zusammen mit Median und Interquartilsabstand. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-Tests ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Auch bei der humanen Ovarialkarzinom-Zelllinie A2780 ergab sich eine deutliche reduzierte Zelldichte ab einer Konzentration von Disorazol bereits ab 0,1 nM ($28,78 \pm 3,6\%$), bei AEZS125 zeigt sich eine Reduktion erst ab 1nM und bei 10nM sind die Werte ähnlich denen des unkonjugierten Disorazols (AEZS125: $13,6 \pm 2,4\%$; Disorazol: $12,4 \pm 2,3\%$).

Zudem wurden Viabilitätsversuche mit der Cisplatin-resistenten Schwester-Zelllinie A2780 cis durchgeführt. Diese Sublinie wurde durch Exposition steigender Konzentrationen von Cisplatin resistent gegenüber diesem Zytostatikum. Erworbene Resistenzen sind *in vivo* ebenfalls zu beobachten und begrenzen somit die therapeutischen Optionen. Aus diesem Grund ist die Frage nach einer Kreuzresistenz von Cisplatin und Disorazol von besonderer Bedeutung. Cisplatin-resistente und -sensiblen Karzinomzellen zeigten unterschiedliche Longivität unter Platin-Exposition, jedoch nicht bei Disorazol (vgl. Abbildung 12). Bei der A2780 cis -Linie lag die Zelldichte unter Cisplatin stets über 60% und zeigt somit einen deutlichen Kontrast zur sensiblen Zelllinie. Im Gegensatz dazu konnte Disorazol die Zellen deutlich stärker dezimieren, auch wenn sich leichte Unterschiede zwischen den Zelllinien zeigten. Schon bei 1 nM findet sich eine Reduktion um mehr als 70 % auch bei Platin-resistenten Zellen.

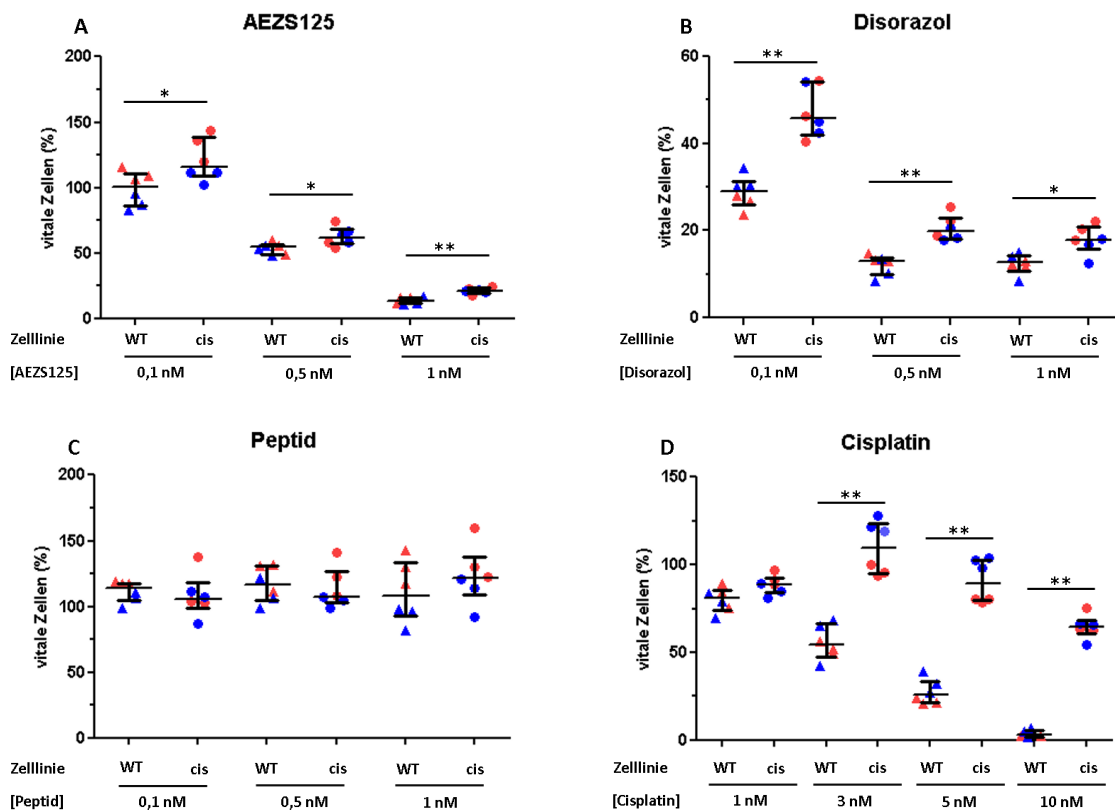


Abbildung 12: Spezifitätsanalyse anhand des Kristallviolett-Versuchs in humaner Ovarialkarzinom-Zelllinie A2780: Anteil überlebender Zellen in Prozent relativ zu den unbehandelten Zellen der jeweiligen Linie (A2780 und A2780 cis (Cisplatin-resistent)). Zellen der jeweiligen Zelllinie wurden in 96 well-Platten in Triplikaten kultiviert und entweder unbehandelt belassen oder mit Cisplatin (D), Disorazol (B), AEZS125 (A) oder dem GnRH-Peptid (C) behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 48h wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und die relative Zelldichte wurde anhand der Absorption bei 540 nm gemessen. Die Ergebnisse als Anteil der überlebenden Zellen von zwei unabhängigen Experimenten sind unterschiedlich farbig dargestellt zusammen mit Median und Interquartilsabstand. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-Test ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Weitere ovariäre Karzinomzelllinien wurden ebenfalls getestet und dabei zeigten alle Typen eine deutlich reduzierte Zelldichte unter Behandlung mit Disorazol (vgl. Abbildung 13). AEZS125 reduzierte ebenfalls die adhärenenten Zellen, allerdings zeigten HepG2-Zellen deutlich höhere Werte bzgl. des Anteils überlebender Zellen ($76,9 \pm 14,2\%$) als beispielweise OVCAR3G ($18,9 \pm 14,5\%$).

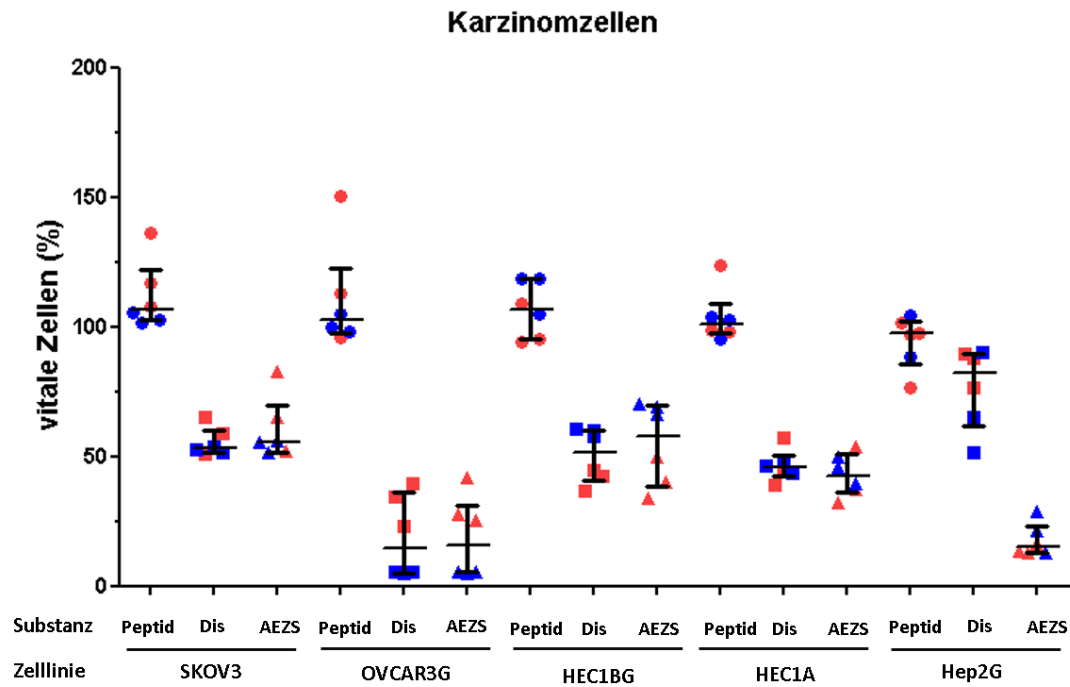


Abbildung 13: Spezifitätsanalyse anhand des Kristallviolett-Versuchs in weiteren humanen Ovarialkarzinom-Zelllinien: Anteil überlebender Zellen in Prozent normalisiert zu unbehandelten Zellen verschiedener humaner Ovarialkarzinom-Zelllinien. Zellen der jeweiligen Zelllinie wurden in 96 well-Platten in Triplikaten kultiviert und entweder unbehandelt belassen oder mit Disorazol Z (Dis), AEZS125 oder dem GnRH-Peptid (je 10nM) behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 48h wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und die relative Zelldichte wurde anhand der Absorption bei 540 nm gemessen. Die Ergebnisse als Anteil der überlebenden Zellen von zwei unabhängigen Experimenten sind unterschiedlich farbig dargestellt zusammen mit Median und Interquartilsabstand.

3.4 Zelltodmechanismen von Disorazol

In früheren Untersuchungen wurde postuliert, dass Disorazol in Krebszellen Apoptose induziert. Aus diesem Grund wurden Tests mit zVAD-fmk durchgeführt, einer Substanz, die durch Hemmung von Caspasen die Effektormechanismen der Apoptose inhibiert und somit gegen proapoptotische Signale (wie beispielsweise Fas-Ligand) protektiv wirkt. Der Kristallviolett-Versuch zeigte, dass A2780 cis-Zellen durch zVAD-fmk in der Tat gegen FasL geschützt wurden, während bei Disorazol oder AEZS125 kein entsprechender Schutz auftrat (vgl. Abbildung 14).

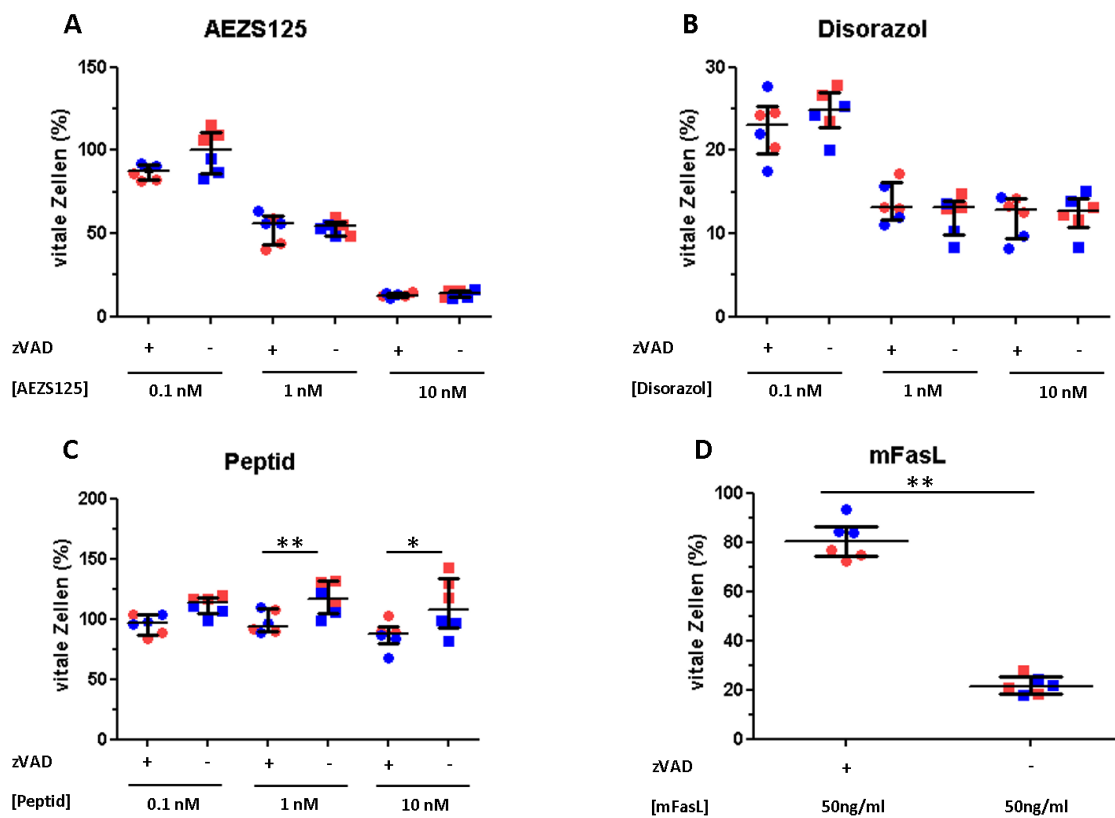


Abbildung 14: Kristallviolett-Versuch mit zVAD-fmk: Anteil überlebender Zellen in Prozent normalisiert zu unbehandelten Zellen der Linie A2780. Zellen wurden in 96 well-Platten in Triplikaten kultiviert und entweder unbehandelt belassen oder mit Disorazol (B), AEZS125 (A) oder dem GnRH-Peptid (C) bzw. mFasL (D) als Kontrolle behandelt. Die Versuchsreihe wurde mit und ohne Zugabe von zVAD-fmk durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 48h wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und die relative Zelldichte wurde anhand der Absorption bei 540nm gemessen. Die Ergebnisse als Anteil der überlebenden Zellen von zwei unabhängigen Experimenten sind unterschiedlich farbig dargestellt zusammen mit Median und Interquartilsabstand. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-Test ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Ebenso wurde eine Annexin-V-Färbung durchgeführt, um den Anteil apoptotischer (das heißt Annexin-V-positive) Zellen zu beurteilen (vgl. Abbildung 15 und 16). Hierzu wurden Zellen zweier unterschiedlicher ovarialer Karzinomzelllinien verwendet.

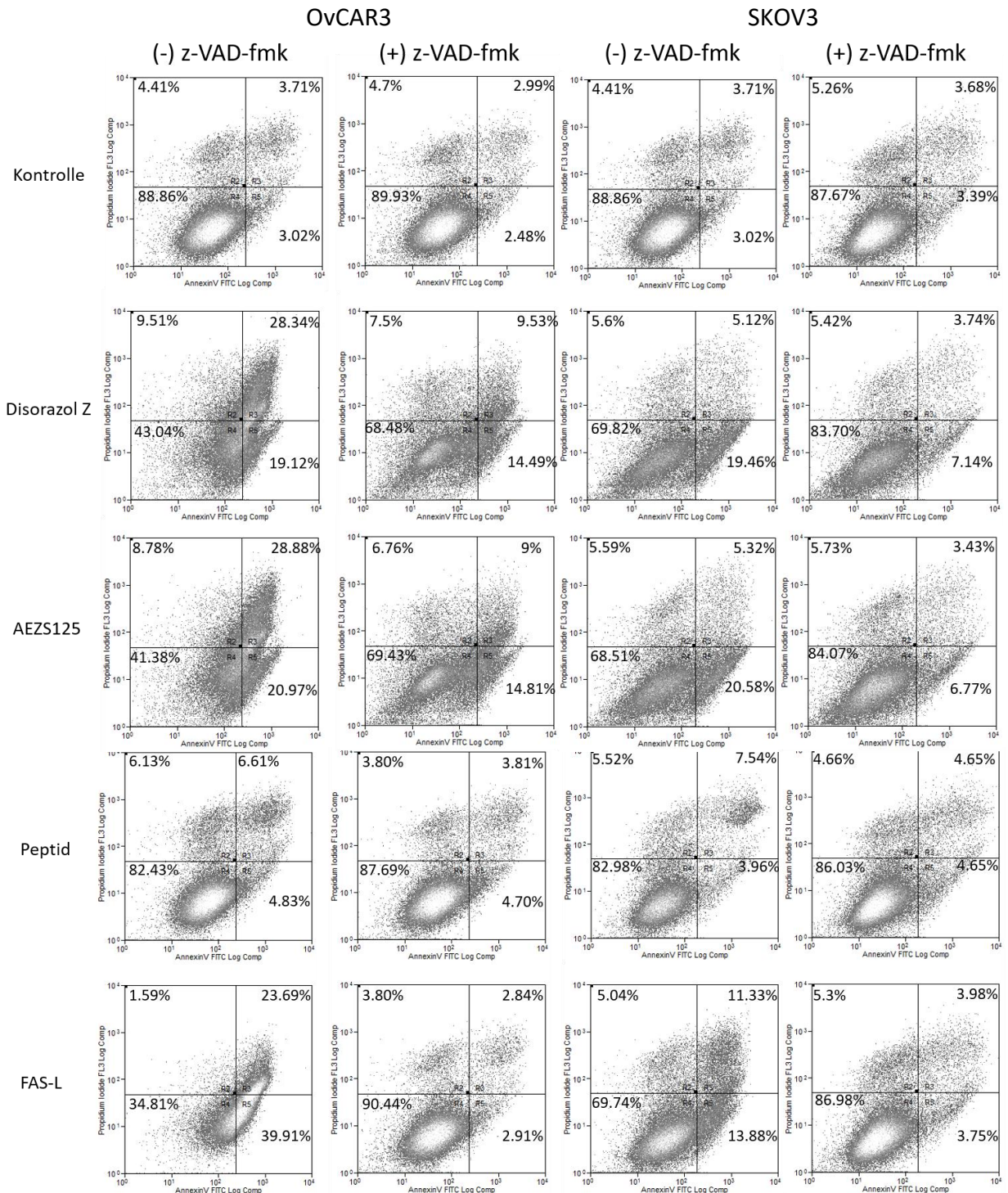


Abbildung 15: Annexin-V-Färbung von SKOV3- und OvCAR3-Zellen. Nach Behandlung mit Disorazol Z und Konjugaten über 48h wurden die Zellen mobilisiert und mit FITC-Annexin V und Propidiumiodid (PI) gefärbt. Anschließend wurde der Anteil der Annexin-V bzw. PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer gemessen.

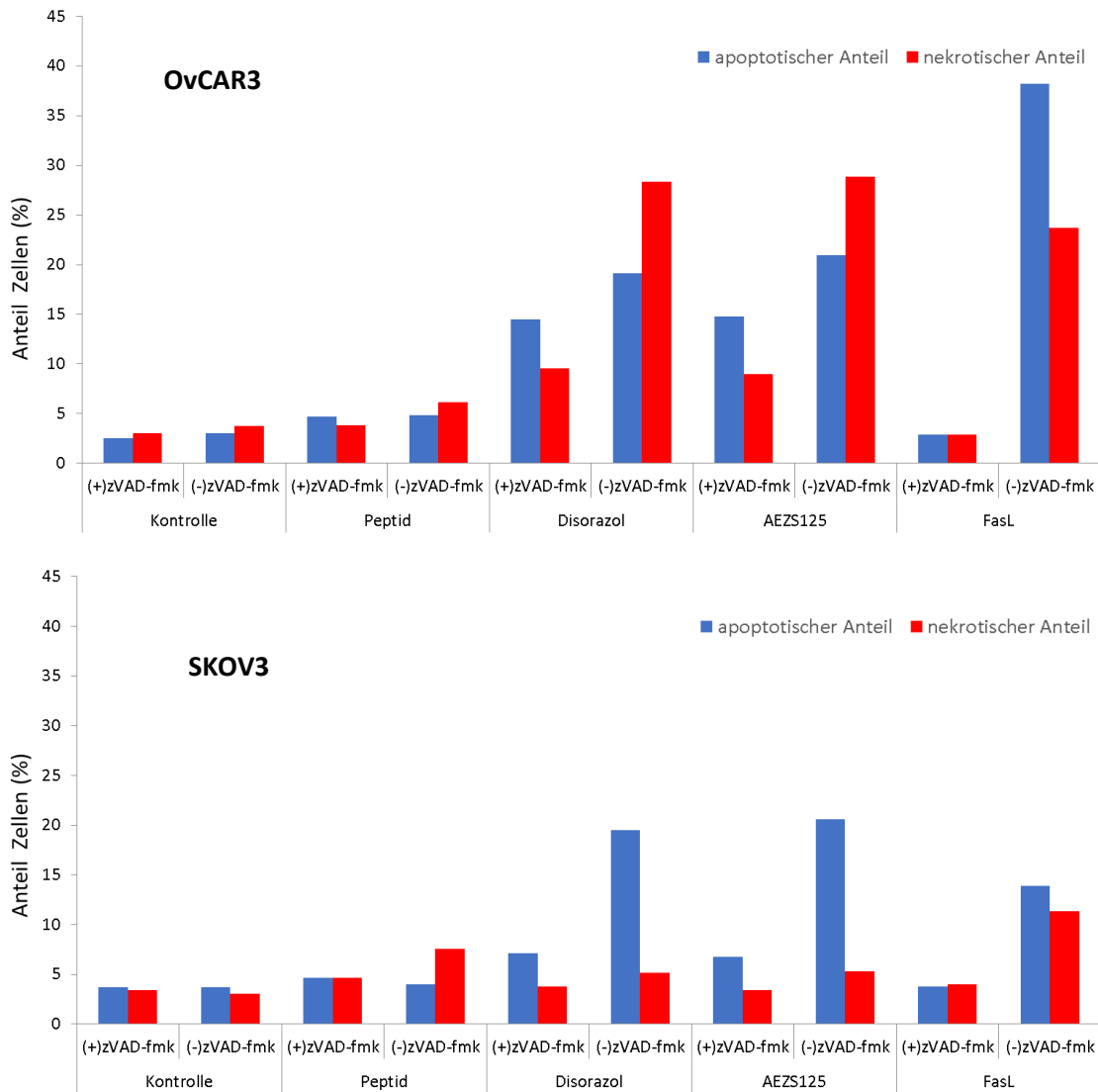


Abbildung 16: Annexin-V-Färbung von SKOV3- und OvCAR3-Zellen in anderer grafischer Darstellung. Nach Behandlung mit Disorazol und Konjugaten über 48h wurden die Zellen mobilisiert und mit FITC-Annexin-V und PI gefärbt. Anschließend wurde der Anteil der Annexin- bzw. PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Zellen, die sich positiv für Annexin V zeigten, wurden als apoptotisch gewertet. Zellen, die sich zusätzlich auch noch mit PI anfärbten, als nekrotisch.

Unter Disorazol und AEZS125 zeigt sich ein höherer Anteil Annexin-positiver und somit apoptotischer Zellen als unter Kontrollbedingungen. Wenn zusätzlich zVAD-fmk vorhanden war, fiel der Annexin-V-positive Anteil geringer aus als ohne (beispielsweise SKOV3 unter AEZS125: 6,77% mit und 20,58% ohne zVAD-fmk). Besonders in SKOV3-Zellen scheint sowohl das Konjugat als auch Disorazol Apoptose-abhängige Zelltodmechanismen anzustoßen. In der OvCAR3-Linie ergab sich zusätzlich ein hoher

Anteil an nekrotischen Zellen. Möglicherweise zeigen sich in unterschiedlichen Zelllinien vielfältige Toxizitätsmechanismen. Da der Zelltod auch durch Zugabe von Necrostatin in Kombination mit zVAD-fmk (Daten nicht gezeigt) nicht wirksam aufgehalten werden konnte, sind nekroptotische Vorgänge wahrscheinlich weniger bedeutsam.

3.5 Disorazol-Resistenz

Ein häufiges Problem in der Behandlung von Karzinomen ist eine Resistenzentwicklung der Tumorzellen gegen verfügbare Therapeutika. Dabei spielen unter anderem Mechanismen eine Rolle, die dafür sorgen, dass die Konzentration des Wirkstoffs in den Zellen sinkt, was beispielsweise durch sogenannte MDR-Transporter geschieht, die zur ABC-Transporter-Familie gehören. Um zu untersuchen, ob dieser Aspekt bei Disorazol eine entscheidende Rolle spielt, wurde Verapamil eingesetzt, eine Substanz die ABC-Transporter blockiert. Im Kristallviolett-Versuch wurden Zellen der Linien HCC1806 und A2780 mit Verapamil vorbehandelt oder unbehandelt belassen und dann verschiedenen Konzentrationen von Disorazol ausgesetzt (vgl. Abbildung 17). Ohne Verapamil zeigten sich deutlich mehr adhärente (und somit überlebende) Zellen der Mammakarzinom-Zelllinie als mit Verapamil-Vorbehandlung (überlebende/adhärente Zellen mit Verapamil: $30,2 \pm 13,5$ %; ohne Verapamil: $91,3 \pm 7,8$ % bei 1 nM Disorazol). Hier war die Divergenz am größten. Ein solcher Effekt konnte in A2780-Zellen nicht nachgewiesen werden. Auch in anderen getesteten Zelllinien war dies nicht darstellbar.

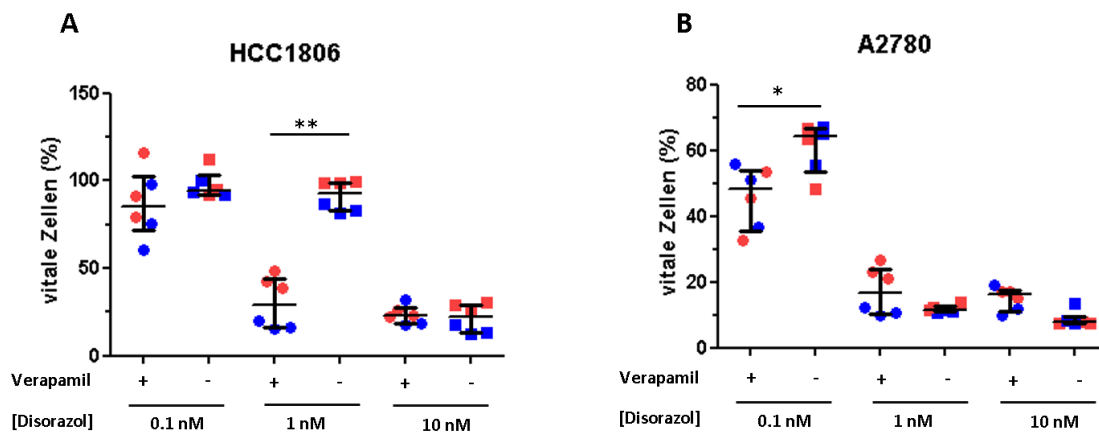


Abbildung 17: Kristallviolett-Versuch mit Verapamil: Anteil überlebender in Prozent normalisiert zu unbehandelten Zellen der Linien HCC1806 (A) und A2780 (B). Zellen der jeweiligen Zelllinie wurden in 96 well-Platten in Triplikaten kultiviert und entweder unbehandelt belassen (-) oder mit Verapamil (+) in einer Konzentration von 10µg/ml behandelt. Nach 1h Inkubationszeit wurde Disorazol in der jeweiligen Konzentration hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 48h wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und die relative Zelldichte wurde anhand der Absorption bei 540nm gemessen. Die Ergebnisse als Anteil der überlebenden Zellen von zwei unabhängigen Experimenten sind unterschiedlich farbig dargestellt zusammen mit Median und Interquartilsabstand. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-Test ermittelt (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

3.6 Hämatotoxizität

Bei systemisch applizierten Substanzen stellt sich ebenfalls die Frage nach unerwünschten Effekten auf körpereigene Zellen. Eine häufige Nebenwirkung bei in der Onkologie eingesetzten Chemotherapeutika ist ein toxischer Effekt auf Blutzellen. Zudem konnte in quantitativen Analysen die Expression des GnRH-Rezeptors auf mRNA-Ebene auch in Lymphozyten nachgewiesen werden, weswegen sie einen potenziellen Angriffspunkt für GnRH-gekoppelte Substanzen darstellen. Um diese Aspekte der Hämatotoxizität bei Disorazol und seinen Konjugaten zu untersuchen, wurden Lymphozyten (PBL) isoliert, stimuliert mittels Phythämagglutinin oder nativ belassen und verschiedenen Konzentrationen der Substanzen ausgesetzt. Danach wurden Viabilität der Zellen anhand der metabolischen Aktivität im WST-Versuch und des Anteils an apoptotischen Zellen in der Annexin-V-Färbung bestimmt (vgl. Abbildung 18 und 19).

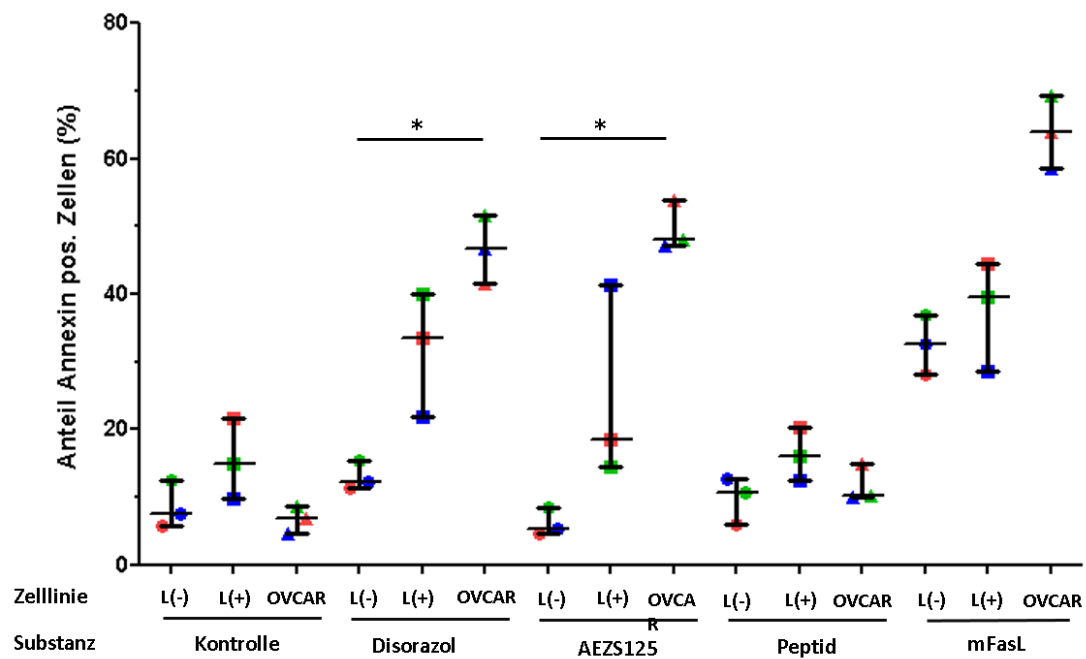


Abbildung 18: Annexin-V-Färbung von Lymphozyten: Anteil Annexin-V-positiver Zellen angegeben in Prozent der gesamten gemessenen Zellmenge. Lymphozyten wurden aus einer Blutprobe gesunder Spender isoliert und entweder nativ belassen (L-) oder mit PHA (Phytohämagglutinin, 2,4 µg/ml, L+) stimuliert. Als Vergleich wurden Zellen der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR3G (OVCAR) verwendet. Nach Behandlung mit Disorazol, Konjugat sowie Peptid (je 10 nM) oder mFas Ligand (50 ng/ml) über 24h wurden die Zellen mobilisiert und mit FITC-Annexin-V und PI gefärbt. Anschließend wurde der Anteil der Annexin-V-positiven Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Die Ergebnisse als Anteil der toten Zellen von drei unabhängigen Experimenten sind unterschiedlich farbig dargestellt zusammen mit Median und Interquartilsabstand. P-Werte wurden mittels Friedman-Test ermittelt (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

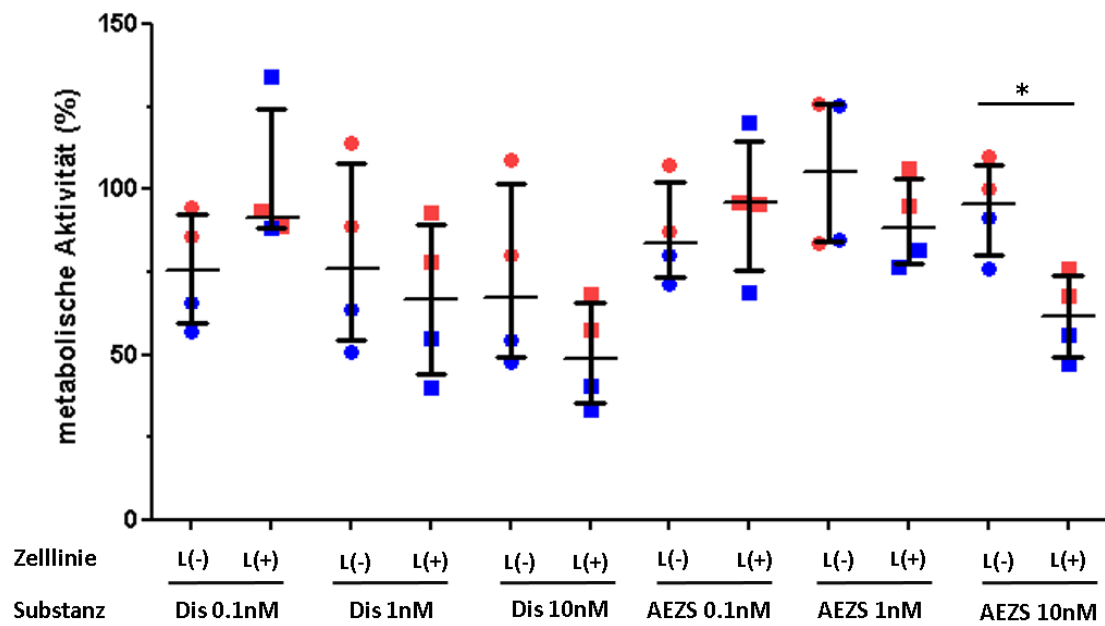


Abbildung 19: WST-Versuch mit Lymphozyten: Relative metabolische Aktivität in Prozent normalisiert zu unbehandelten PBL im WST Versuch. PBL wurden isoliert, auf 96 well-Platten in Duplikaten kultiviert, teilweise mit PHA aktiviert (+) oder nativ belassen (-) und mit Disorazol bzw. AEZS125 in der angegebenen Dosierung behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 72h wurde WST-1-Reagenz hinzugefügt und nach 4h die Absorption bei 450 nm. Die Ergebnisse als relative metabolische Aktivität von zwei unabhängigen Experimenten sind unterschiedlich farbig dargestellt zusammen mit Median und Interquartilsabstand. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-Test ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4. Diskussion

Aufgrund der steigenden Zahlen an Krankheitsfällen und nicht immer ausreichend vorhandenen Behandlungsmöglichkeiten sind Neuentwicklungen in der Onkologie von großer Bedeutung. Durch die häufig erst späte Diagnosestellung und eingeschränkte Therapiemöglichkeiten spielt dies besonders beim Ovarialkarzinom eine tragende Rolle. In der Gynäkologie bieten sich als Ansatzpunkt für neue Therapieversuche vor allem endokrine Systeme an, da sie hier eine wichtige Stellung in der Wachstumserhaltung und Signalgebung der Zellen einnehmen. Die Idee eines ganz speziellen Angriffspunkts in pathogenen Agenzien, der gleichsam eines gezielten Schusses mit einer magischen Kugel genau getroffen werden kann, lässt sich schon auf die Entwicklungen und Ideen von Paul Ehrlich und seines Konzepts der „Chemotherapia specifica“ zurückführen [77]. Doch erst in jüngster Zeit widmet man sich Neuentwicklungen auf dieser Basis. In dieser Arbeit sollten der spezielle Nutzen von GnRH-Disorazol-Konjugaten in ovariellen Karzinomzellen untersucht werden.

4.1 GnRH-Rezeptor-Expression und -Funktion in ovariellen Karzinom-Zellen

Wie bereits auch in vorherigen Studien ([36, 57, 60]) konnte die Expression des GnRH-Rezeptors auf DNA-Ebene in verschiedenen Karzinom-Zelllinien nachgewiesen werden. Von besonderer Bedeutung ist hier, dass auch bei frisch aufgereinigten Karzinomzellen aus Aszites von Patientinnen die Rezeptorexpression gezeigt werden konnte. Somit kann die Anwendbarkeit des Therapieansatzes als Grundlage des Verfahrens bestätigt werden. Ebenfalls konnte die Expression auf Proteinebene mittels Western Blot-Verfahren gezeigt werden. Am besten geeignet zeigte sich hier der Antikörper von Novus. Der Nachweis von Rezeptor-exprimierenden Zellen bei Karzinom-Patienten ist bei der an GnRH-gekoppelten Therapie essenziell, da die Expression dieses Rezeptors die Grundlage des Wirkungsmechanismus darstellt. Bei vielen ovariellen aber auch mammären Karzinomzellen konnte hier und auch in anderen Untersuchungen der Rezeptor nachgewiesen werden. Zur weiteren genauen Darstellung wäre die Entwicklung eines noch spezifischer bindenden Antikörpers denkbar, um auch beispielsweise mittels Immunhistochemie oder Durchflusszytometrie das Vorhandensein des Rezeptors auf der Zelloberfläche nachzuweisen.

Um die Funktionsfähigkeit des Rezeptors zu testen, wurden Versuche mit dem Reporter-gen Luciferase durchgeführt. Dabei zeigten die mit dem entsprechenden Gen transfizierten Zellen eine deutliche Lumineszenz und somit eine eindeutige Funktionsfähigkeit des Rezeptors. Dies ist unter mehreren Gesichtspunkten von entscheidender Bedeutung. Durch die Funktionsfähigkeit und die Aktivierung des Reporter-gens auch mit dem Konjugat kann davon ausgegangen werden, dass sowohl das Peptid als auch das Konjugat wie unter *in vivo* Bedingungen an den Rezeptor binden und anschließend die biologisch korrekten Signalwege in Gang setzen. In der Vergangenheit konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass selbst Hormonagonisten mittels des GnRH-I-Rezeptors antiproliferativ wirken [78]. Da beide GnRH-Verbindungen der Rezeptoraktivierung nachgeschaltete physiologische Signale triggern kann davon ausgegangen werden, dass auch die inhibitorischen Signalwege in Karzinomzellen angestoßen werden. Somit könnte die Kombination von GnRH und Disorazol synergistisch wirken, selbst wenn das Konjugat trotz nachgewiesener ausgeprägter Stabilität [79] dissoziieren sollte. Weiterhin wird der GnRH-Rezeptor entsprechend eines typischen Peptidhormon-Rezeptors durch Endozytose in die Zelle internalisiert. Dies ist mittlerweile auch für den GnRH-II-Subtyp nachgewiesen [49]. Somit könnte dieser Untertyp eine weitere Angriffsmöglichkeit für eine gezielte Therapie sein, da eine Kopplung von GnRH-II und Disorazol einfacher in die Zelle aufgenommen werden würde. Andererseits darf hierbei nicht vergessen werden, dass dadurch auch in kürzerer Zeit weniger Rezeptoren zur Verfügung stünden. Deswegen wäre eine Kombinationstherapie denkbar, die beide Wege nutzt.

4.2 Toxizität von Disorazol und seiner Konjugate

Mittels einfacher Grundlagenversuche konnte hier eindeutig die Toxizität von Disorazol und von GnRH-gekoppeltem Disorazol und somit die hohe Effektivität gegenüber verschiedenster Krebszelllinien gezeigt werden. Um die Wirksamkeit und Spezifität des Therapiekonzeptes nachweisen zu können, dienten zunächst die murinen Zellen, die mit der humanen GnRH-I-Rezeptor-Sequenz transfiziert wurden wie LTK L3.5/78 und LTK Ze037.1, als Testsystem. Das Konjugat zeigte eine hohe Aktivität gegenüber den Rezeptor-exprimierenden Zellen. Eine milde Wirksamkeit auch auf Wildtyp-Zellen ließe

sich mit geringfügiger Dissoziation bei langer Inkubationsdauer erklären. Wichtig erscheint in diesem Kontext, dass parallel vom Kooperationspartner Æterna Zentaris durchgeführte *in vivo* Versuche keinerlei Hinweise auf eine unspezifische Toxizität lieferten. Mit den transfizierten LTK-Zellen konnte auch hier erneut eine wenn auch geringfügige Reduktion der Zelldichte unter Inkubation mit dem reinen Hormon gezeigt werden. Dies bestätigt die Voruntersuchungen, dass auch das Peptid-Analogon eine antiproliferative Wirkung besitzt [25, 59]. Insgesamt konnten so die murinen Fibroblast-Zellen als suffizientes Modellsystem verifiziert werden.

Auch mit humanen Zelllinien wurden Toxizitätsversuche durchgeführt. Hier zeigte sich Disorazol in allen Zelllinien effektiv, das Konjugat erreichte besondere Effektivität vor allem in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie A2780. Somit bot sich diese Linie zu weiteren Versuchen an. A2780-Zellen wurden auch in ersten Versuchen in murinen Xenograft-Modellen erprobt [79]. Erste Resultate zeigen sich erfolgsversprechend. Ebenso konnten in der Untergruppe der Cisplatin-resistenten Zellen eine gute Effektivität erzielt werden, wohingegen Cisplatin wie zu erwarten nur bei dem sensiblen Untertyp eine ausreichende Wirksamkeit erreichte. Dies kann als Hinweis dafür gesehen werden, dass die Resistenzmechanismen, die die Zellen gegenüber Cisplatin unempfindlich machen, bei Disorazol nicht greifen. Das ist einerseits sehr positiv im Hinblick auf den Therapieeinsatz zu sehen. Andererseits bedeutet es auch, dass weitere Untersuchungen nötig sind, um mögliche Resistenzwege aufzuklären. Zudem ist auffällig, dass das Peptid selbst hier nicht proliferationshemmend wirkt. Denkbar wäre hier neben anderen möglichen Mechanismen die konstitutive Aktivierung interferierender Signalwege oder auch eine verändernde Mutation im Signalweg des Rezeptors. Unterschiedliche Wirkweisen von GnRH und seiner Analoga sind bereits mehrfach beschrieben worden. Durch die hohe Teilungs- und Mutationsrate von Karzinomzellen sind Veränderungen in pathophysiologischen Abläufen sehr häufig.

Neben der Effektivität gegen Krebszellen sind die Wirkungsweise und die dadurch resultierende Beeinflussbarkeit von Interaktionen ausschlaggebend für die Einsetzbarkeit therapeutischer Substanzen. Um die bereits früher postulierte These,

Disorazol-induzierte Apoptose in Zelle, weiter zu untersuchen, wurden Versuche mit zVAD-fmk durchgeführt. Diese Substanz inhibiert die Haupteffektoren der Apoptose, die Caspasen, sodass von diesem Mechanismus abhängige Zytotoxine ihre Wirkung verlieren. In einfachen Toxizitätsexperimenten konnte ein direkter Effekt nicht nachgewiesen werden. In der Färbung mittels Durchflusszytometrie war jedoch nach der Behandlung mit dem Inhibitor durchaus der Anteil apoptotischer Zellen verringert. Verschiedene ovariale Karzinom-Zelllinien unterscheiden sich in ihrem Gen- und Proteinpool. Die Wirkung von Disorazol sowie seine Auswirkung auf den Zelltod könnten demnach je nach Zelllinie differieren. Zusätzlich wäre ein Wirken von Disorazol auf verschiedenen Ebenen möglich, sodass teilweise apoptotische Wege involviert sind, zusätzlich aber weitere Faktoren eine Rolle in der Toxizität dieser Substanz spielen wie unter anderem die Störung der Mikrotubuli-Polymerisation und weitere Zellfunktionen [70]. Ein weiterer möglicher Mechanismus wäre die Initiierung eines nekroptotischen Zelltods, welcher nicht durch zVAD-fmk, jedoch durch Necrostatin inhibierbar ist [80]. Eine Reversion des zytotoxischen Effektes von Disorazol ließ sich in ersten Experimenten nicht eindeutig nachweisen, weitergehende Untersuchungen wären hier notwendig zur genaueren Evaluation dieses Effekts.

4.3 Mögliche Resistenzen

Resistenzen gegen verschiedenste Medikamente sind nicht nur in onkologisch transformierten Zellen ein schwerwiegendes Problem. Gerade schnell wachsende Tumore sind hiervon betroffen. Durch die hohe Teilungsrate und genomische Instabilität von Krebszellen wird es ihnen ebenso wie beispielsweise auch pathogenen Prokaryonten möglich mit verschiedenen molekularen Mechanismen unempfindlich auch gegen vorher gut wirksame Zytotoxine zu werden. Wie bereits beschrieben spielen Transporter, die therapeutisch wirksame Agentien aus der Zelle herausbringen, dabei eine wichtige Rolle. Eines der bekanntesten Beispiele hierfür ist die Hochregulation verschiedenster Transportergene wie des Multi Drug Resistance-Transporters (MDR). Durch dieses zur Gruppe der ABC-Transporter gehörende Protein erhält die Zelle die Möglichkeit, intrazellulär toxische Substanzen sofort wieder aus der Zelle herauszubringen, womit diese ihre therapeutische Wirkung verlieren. Um diesen Aspekt

in der Interaktion zwischen Disorazol bzw. seiner Konjugate näher zu untersuchen, wurden Versuche mit Verapamil, welches diesen Transporter inhibiert, durchgeführt. Die Ergebnisse gaben einen Hinweis darauf, dass zelllinienabhängig durch den Einsatz von Verapamil eine noch bessere Effektivität erzielt werden könnte, was insbesondere bei einer potenziellen Resistenzentwicklung relevant werden könnte. In den experimentellen Untersuchungen in dieser Studie konnte in der Zelllinie HCC1806 mammären Ursprungs ein deutlicher Effekt durch Hemmung dieser Transporter mittels Verapamil gezeigt werden. Dies spricht hier deutlich für eine Beteiligung dieses Mechanismus an der geringeren Empfindlichkeit verschiedenster Zellen gegenüber dem Zytotoxin. In ähnlichen Resistenzuntersuchungen wurde ein noch ausgeprägterer Effekt für Phenothiazine beschrieben [81]. Auch diese Substanzen greifen hemmend in den Zelltransport ein und haben per se eine antikarzinogene Wirksamkeit. Takacs et al. untersuchten die Auswirkung von Phenothiazinen auf MDR-Kolonkarzinom-Zellen und konnten hohe toxische Effekte erreichen. Um die Auswirkung auf die Resistenz noch zu verstärken, wäre der Einsatz dieser Substanzklasse ebenso denkbar.

4.4 Hämatotoxizität

Neben der erwünschten Wirkung auf Tumorzellen sind in der Onkologie die unerwünschten Wirkungen einer Therapie von besonderer Bedeutung. Gängige Chemotherapeutika sind stark nebenwirkungsbehaftet und dies betrifft häufig hämatopoetische Zellen. Bisher gibt es keine genaueren Kenntnisse über mögliche Auswirkungen eines therapeutischen Einsatzes von Disorazol auf das hämatopoetische System. Diese Arbeit untersuchte deshalb auch die toxischen Effekte von Disorazol bzw. seines Konjugats auf Lymphozyten. Es ließ sich hier eine deutliche Differenz zwischen der Sensibilität der Lymphozyten bzw. ovariellen Karzinomzelllinien zeigen. Erstere waren weniger anfällig für Disorazol. Das Peptid zeigte hier keinen Unterschied im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Auch im WST-Versuch reduzierte sich die metabolische Aktivität erst in einem Dosisbereich von 10 nM. Einen therapeutischen Effekt hatte das Konjugat bereits in niedrigeren Dosen gezeigt. Dies könnte Hinweis geben auf eine potenziell gute Verträglichkeit bei spezifischer Wirksamkeit des Therapieansatzes.

4.5 Ausblick

Hormone und Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren zeigen meist eine ausgeprägte Pluralität mit verschiedensten Unterformen. So hat auch das GnRH-Peptid eine Isoform, GnRH-II, die sich geringfügig in der Sequenz vom Isotyp I unterscheidet und über einen eigenen Rezeptor verfügt (s. oben). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass GnRH-II ebenso einen antiproliferativen Effekt auf Karzinomzellen hat [60], der den vom ersten Subtyp zum Teil sogar übersteigt. Dies wäre eventuell auch therapeutisch nutzbar, indem Disorazol als Konjugat an GnRH-II gekoppelt würde. Hier könnte somit potenziell ein noch größerer, hemmender Effekt erzielt werden. Dabei wäre aber ebenfalls weiter abzuklären, ob und in welchem Maße der GnRH-II-Rezeptor auf ovarialen oder anderen gynäkologischen Tumorzellen exprimiert wird. In dieser Arbeit konnte bisher nur eine eher geringe Expression dieser Unterform nachgewiesen werden mit der höchsten Rate in SKOV3-Zellen. Weitere Tests dazu wären nötig, um ein mögliches Potenzial dieses therapeutischen Ansatzes zu ermitteln.

Neben dem Ovarialkarzinom spielt das Mammakarzinom eine große Rolle in der gynäkologischen Endokrinologie. Es ist immer noch das häufigste Karzinom bei Frauen mit annähernd 75.200 Neuerkrankungen im Jahr. Viele der davon betroffenen Patientinnen sind jünger als 50 Jahre (Robert-Koch-Institut, Prognose 2014, Statistisches Bundesamt). Bereits Emmons et al. konnten zeigen, dass in den verschiedensten malignen Zellen verschiedensten Ursprungs GnRH-Rezeptoren exprimiert werden, darunter auch das Mamma-, Prostata- und Endometriumkarzinom [25, 36, 58]. Auch hier konnte die Expression von GnRH auf MCF7-Zellen, einer Zelllinie mammären Ursprungs, nachgewiesen werden. In der Therapie des Mammakarzinoms wird häufig auf bewährte Rezeptoren als Angriffspunkt zurückgegriffen wie beispielsweise Östrogen-, Progesteron- oder Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie den Her2neu [82]. Sind die Karzinomzellen für alle diese Rezeptoren negativ (d.h. triple-negatives Mammakarzinom), kann bisher lediglich auf konventionelle Chemotherapie zurückgegriffen werden. Auch Seitz et al. zeigten 2014 die Expression von GnRH-Rezeptoren auf triple-negativen Zellen [83]. In der Hälfte von triple-negativen Mammakarzinom-Proben, die hier getestet wurden, wurde GnRH exprimiert. Auch in

Zelllinien wie HCC 1806 ließ sich dies nachweisen. Diese Zellen zeigten sich in den hier durchgeführten Experimenten ebenfalls sensibel (vgl. Abbildung 17) auf AEZS125, was gut vereinbar mit den Ergebnissen von Seitz et al. ist. Sowohl Konjugate aus GnRH und Disorazol und sowie GnRH und Doxorubicin zeigten sich in xenotransplantierten Mäusen wirksam. Aufgrund der häufigen Expression von GnRH würden sich Patientinnen mit diesem Subtyp für eine Therapie mit dem Konjugat eignen. Somit könnten solche Substanzen eine neue Therapiemöglichkeit bei einer Entität mit ansonsten sehr begrenzten Behandlungsstrategien darstellen. Durch das Vorhandensein des Rezeptors auch auf anderen malignen Zellen könnte GnRH und seine Rezeptoren auch dort als spezifisches Angriffsziel genutzt werden, zum Beispiel bei Patienten mit Prostata- oder Endometriumkarzinom. Ein solches Therapeutikum wäre also vielseitig einsetzbar und keinesfalls auf das Ovarialkarzinom beschränkt.

5. Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom stellt einen häufigen malignen Tumor der Frau dar, der meist spät diagnostiziert wird. Therapeutische Optionen sind nur eingeschränkt verfügbar und nebenwirkungsbehaftet. In der modernen Tumorthherapie sind zielgerichtete medikamentöse Ansätze von immer größer Bedeutung und sind bei verschiedenen Entitäten bereits zugelassen. Da Ovarialkarzinome häufig GnRH-Rezeptoren exprimieren, stellt dies einen guten Angriffspunkt für mögliche Therapeutika dar.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Disorazol, einem potenten Zytotoxin, in Kopplung an GnRH auf Ovarialkarzinom-Zellen untersucht. Unter anderem wurden hierbei RT-PCR, Kristallviolettversuche, WST-Versuche und FACS-Analysen durchgeführt.

Molekularbiologisch war eine deutliche Expression von GnRH-Rezeptoren auf ovariellen Karzinomzellen zu sehen. Es zeigte sich eine spezifische Toxizität von GnRH-Disorazol-Konjugaten auf Ovarialkarzinom-Zelllinien und andere GnRH-tragende Zellen. Lymphozyten aus dem peripheren Blut waren nicht im besonderen Maße anfällig für Disorazol. Verapamil konnte in einzelnen Zelllinien die Toxizität des Konjugats verstärken, eine Cisplatin-Resistenz hatte jedoch keinen Einfluss darauf. Apoptose-inhibierende Substanzen wie zVAD verminderten den Anteil an toten Zellen, Necrostatin war dazu nicht in der Lage.

Die spezifische Wirksamkeit von GnRH gekoppeltem Disorazol auf Ovarialkarzinomzellen bestätigt das ursprüngliche Therapiekonzept. Eine ausgeprägtere Hämatotoxizität konnte nicht nachgewiesen werden, was im Hinblick auf den klinischen Einsatz eine bedeutende Rolle spielt. Da einige weitere Entitäten wie das triple-negative Mammakarzinom GnRH-Rezeptor-exprimierende Zellen aufweisen, ist ein Einsatz auch in diesen Krankheitsbildern denkbar.

6. Literatur

1. Boyle, P. and J. Ferlay, *Cancer incidence and mortality in Europe, 2004*. Ann Oncol, 2005. 16(3): p. 481-8.
2. Howlader N, N.A., Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, *SEER Cancer Statistics Review, 1975–2010*. 2013, National Institut of Health: Bethesda.
3. Hunn, J. and G.C. Rodriguez, *Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology*. Clin Obstet Gynecol, 2012. 55(1): p. 3-23.
4. Baltzer, J.M., Hans-Gerd; Bahnsen, Jens, *Praxis der gynäkologischen Onkologie. Konzepte für das differenzierte Vorgehen in Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Praxis der Frauenheilkunde, Band III. Vol. 2. Auflage. 2000: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 434.
5. Qin, B., et al., *Dairy, calcium, vitamin D and ovarian cancer risk in African-American women*. Br J Cancer, 2016. 115(9): p. 1122-1130.
6. Schmalefeldt B, P.J., Beckmann M, Kaufmann M, Emos G., *Interdisziplinäre Leitlinie für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumor*. 2010, München, Wien, New York: Zuckerschwerdt Verlag.
7. O'Donovan, P.J. and D.M. Livingston, *BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair*. Carcinogenesis, 2010. 31(6): p. 961-7.
8. Ganten, D.R., K.; Hahn, S.A.; Schmiegel, W. , *Molekularmedizinische Grundlagen von hereditären Tumorerkrankungen*. Vol. 1. Ausgabe. 2001, Berlin, Heidelberg: Springer.
9. Prat, J. and F.C.o.G. Oncology, *Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum*. Int J Gynaecol Obstet, 2014. 124(1): p. 1-5.
10. Jänicke, F., *Das fortgeschrittene Ovariakarzinom* Deutsches Ärzteblatt, 1999. 96 (5): p. 281-288.
11. Cormio, G., et al., *Distant metastases in ovarian carcinoma*. Int J Gynecol Cancer, 2003. 13(2): p. 125-9.
12. Dietl, J. and J. Wischhusen, *The forgotten fallopian tube*. Nat Rev Cancer, 2011. 11(3): p. 227; author reply 227.
13. Lukanova, A. and R. Kaaks, *Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. 14(1): p. 98-107.
14. Scully, R.E., et al., *Protocol for the examination of specimens from patients with carcinoma of the fallopian tube: a basis for checklists*. Cancer Committee, College of American Pathologists. Arch Pathol Lab Med, 1999. 123(1): p. 33-8.
15. Dubeau, L., *The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: does the emperor have no clothes?* Gynecol Oncol, 1999. 72(3): p. 437-42.
16. Goff, B.A., et al., *Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics*. JAMA, 2004. 291(22): p. 2705-12.
17. Langmar, Z., et al., *HE4--a novel promising serum marker in the diagnosis of ovarian carcinoma*. Eur J Gynaecol Oncol, 2011. 32(6): p. 605-10.
18. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF), *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 1.0.*. 2013. AWMF Registrierungsnummer: 032-035OL.
19. Abstract 5500 Abstract 5500. Presented June 3, 2017,) [cited 2017 June 3].

20. Burger, R.A., et al., *Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer*. N Engl J Med, 2011. 365(26): p. 2473-83.
21. Brahmer, J.R., et al., *Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer*. N Engl J Med, 2012. 366(26): p. 2455-65.
22. Gore, A., *GnRH: The Master Molecule of Reproduction*. 2002, New York: Springer.
23. Chedrese, P.J., *Reproductive endocrinology – a molecular approach*. 2009, New York: Springer.
24. Keck, C.N., J.; Behre, H.; Breckwoldt, M., *Endokrinologie, Reproduktionsmedizin, Andrologie; Praxis der Frauenheilkunde – Band 1*. Vol. 2. Auflage. 2002, Stuttgart, New York: Thieme Verlag.
25. Cheng, C.K. and P.C. Leung, *Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans*. Endocr Rev, 2005. 26(2): p. 283-306.
26. Millar, R.P., *GnRH II and type II GnRH receptors*. Trends Endocrinol Metab, 2003. 14(1): p. 35-43.
27. Temple, J.L., R.P. Millar, and E.F. Rissman, *An evolutionarily conserved form of gonadotropin-releasing hormone coordinates energy and reproductive behavior*. Endocrinology, 2003. 144(1): p. 13-9.
28. Kauppila, A., et al., *Cytosol estrogen and progesterone receptor concentrations and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities in the endometrium and endometrial tissue. Effects of hormonal treatment*. Acta Obstet Gynecol Scand Suppl, 1984. 123: p. 45-9.
29. Haisenleder, D.J., et al., *Gonadotropin-releasing hormone pulses are required to maintain activation of mitogen-activated protein kinase: role in stimulation of gonadotropin gene expression*. Endocrinology, 1998. 139(7): p. 3104-11.
30. Fink, G., *Gonadotropin secretion and its control*. The physiology of reproduction., ed. E.N. Knobil, J.D. 1988, New York: Raven Press.
31. Henriot, P., H.P. Gaide Chevronnay, and E. Marbaix, *The endocrine and paracrine control of menstruation*. Mol Cell Endocrinol, 2012. 358(2): p. 197-207.
32. Mihm, M., S. Gangooly, and S. Muttukrishna, *The normal menstrual cycle in women*. Anim Reprod Sci, 2011. 124(3-4): p. 229-36.
33. Guerrero, H.E., et al., *Effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist on luteinizing hormone receptors and steroidogenesis in ovarian cells*. Fertil Steril, 1993. 59(4): p. 803-8.
34. Kang, S.K., et al., *Differential regulation of two forms of gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in human granulosa-luteal cells*. Endocrinology, 2001. 142(1): p. 182-92.
35. Kang, S.K., et al., *Potential role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I and GnRH-II in the ovary and ovarian cancer*. Endocr Relat Cancer, 2003. 10(2): p. 169-77.
36. Grundker, C., et al., *Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers*. Eur J Endocrinol, 2002. 146(1): p. 1-14.
37. Kim, J.W., et al., *Cell cycle arrest in endometrial carcinoma cells exposed to gonadotropin-releasing hormone analog*. Gynecol Oncol, 1999. 73(3): p. 368-71.
38. Gunthert, A.R., et al., *Luteinizing hormone-releasing hormone induces JunD-DNA binding and extends cell cycle in human ovarian cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. 294(1): p. 11-5.
39. Conn, P.M. and W.F. Crowley, Jr., *Gonadotropin-releasing hormone and its analogs*. Annu Rev Med, 1994. 45: p. 391-405.
40. Billig, H., I. Furuta, and A.J. Hsueh, *Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells*. Endocrinology, 1994. 134(1): p. 245-52.

41. Yano, T., et al., *Effect of luteinizing hormone-releasing hormone analogs on the rat ovarian follicle development*. Horm Res, 1997. 48 Suppl 3: p. 35-41.
42. Papadopoulos, V., et al., *Mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor expression. Correlation with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist-induced apoptosis in the corpus luteum*. Biochem Pharmacol, 1999. 58(9): p. 1389-93.
43. Chou, C.S., et al., *Dose-dependent effects of gonadotropin releasing hormone on matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 and tissue specific inhibitor of metalloproteinases-1 messenger ribonucleic acid levels in human decidual Stromal cells in vitro*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. 88(2): p. 680-8.
44. Chou, C.S., C.D. MacCalman, and P.C. Leung, *Differential effects of gonadotropin-releasing hormone I and II on the urokinase-type plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor system in human decidual stromal cells in vitro*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. 88(8): p. 3806-15.
45. Chen, A., et al., *The neuropeptides GnRH-II and GnRH-I are produced by human T cells and trigger laminin receptor gene expression, adhesion, chemotaxis and homing to specific organs*. Nat Med, 2002. 8(12): p. 1421-6.
46. Romanelli, R.G., et al., *Expression and function of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor in human olfactory GnRH-secreting neurons: an autocrine GnRH loop underlies neuronal migration*. J Biol Chem, 2004. 279(1): p. 117-26.
47. Chi, L., et al., *Cloning and characterization of the human GnRH receptor*. Mol Cell Endocrinol, 1993. 91(1-2): p. R1-6.
48. Krsmanovic, L.Z., et al., *An agonist-induced switch in G protein coupling of the gonadotropin-releasing hormone receptor regulates pulsatile neuropeptide secretion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(5): p. 2969-74.
49. McArdle, C.A., et al., *Signalling, cycling and desensitisation of gonadotrophin-releasing hormone receptors*. J Endocrinol, 2002. 173(1): p. 1-11.
50. Kraus, S., Z. Naor, and R. Seger, *Intracellular signaling pathways mediated by the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor*. Arch Med Res, 2001. 32(6): p. 499-509.
51. Naor, Z., O. Benard, and R. Seger, *Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor*. Trends Endocrinol Metab, 2000. 11(3): p. 91-9.
52. Limonta, P., et al., *GnRH receptors in cancer: from cell biology to novel targeted therapeutic strategies*. Endocr Rev, 2012. 33(5): p. 784-811.
53. Ferguson, S.S., *Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling*. Pharmacol Rev, 2001. 53(1): p. 1-24.
54. Willars, G.B., et al., *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, 1999. 274(42): p. 30146-53.
55. Vrecl, M., et al., *Agonist-induced endocytosis and recycling of the gonadotropin-releasing hormone receptor: effect of beta-arrestin on internalization kinetics*. Mol Endocrinol, 1998. 12(12): p. 1818-29.
56. Emons, G., et al., *Gonadotropin releasing hormone binding sites in human epithelial ovarian carcinomata*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1989. 25(2): p. 215-21.
57. Emons, G., et al., *Growth-inhibitory actions of analogues of Luteinizing Hormone Releasing Hormone on tumor cells*. Trends Endocrinol Metab, 1997. 8(9): p. 355-62.
58. Volker, P., et al., *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, 2002. 186(2): p. 171-9.

59. Emons, G., et al., *LHRH might act as a negative autocrine regulator of proliferation of human ovarian cancer*. Eur J Endocrinol, 2000. 142(6): p. 665-70.
60. Grundker, C. and G. Emons, *Role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ovarian cancer*. Reprod Biol Endocrinol, 2003. 1: p. 65.
61. Arencibia, J.M. and A.V. Schally, *Luteinizing hormone-releasing hormone as an autocrine growth factor in ES-2 ovarian cancer cell line*. Int J Oncol, 2000. 16(5): p. 1009-13.
62. Meyer, C., et al., *Transcript and protein profiling identifies signaling, growth arrest, apoptosis, and NF-kappaB survival signatures following GNRH receptor activation*. Endocr Relat Cancer, 2013. 20(1): p. 123-36.
63. Zhuang, S. and R.G. Schnellmann, *A death-promoting role for extracellular signal-regulated kinase*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. 319(3): p. 991-7.
64. Mebratu, Y. and Y. Tesfaigzi, *How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer?* Cell Cycle, 2009. 8(8): p. 1168-75.
65. Grundker, C., P. Volker, and G. Emons, *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, 2001. 142(6): p. 2369-80.
66. Jansen R, I.H., Reichenbach H, Wray V, Hofle G, *Antibiotics from gliding bacteria, LIX. Disorazoles, highly cytotoxic metabolites from the sorangicin producing bacterium Sorangium cellulosum, strain So ce12*. European Journal of Organic Chemistry, 1994(8): p. 759-773.
67. Irschik, H., et al., *Disorazol A, an efficient inhibitor of eukaryotic organisms isolated from myxobacteria*. J Antibiot (Tokyo), 1995. 48(1): p. 31-5.
68. Hopkins, C.D. and P. Wipf, *Isolation, biology and chemistry of the disorazoles: new anti-cancer macrodiolides*. Nat Prod Rep, 2009. 26(5): p. 585-601.
69. Gunther, E.S., Olaf; Teifel, Michael, *Conjugates of disorazoles and their derivatives with cell-binding molecules, novel disorazole derivatives, processes of manufacturing and uses thereof in WorldIntellectualPropertyOrganization*. 2008, Aeterna Zentaris: Germany.
70. B. Aicher, K.H., R. Jansen, H. Irschik, P. Schmidt, J. Engel, E. Guenther, R. Mueller, M. Teifel. *Disorazol Z - A highly cytotoxic natural compound with antitumor properties*. in *AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics*. 2011. San Francisco, CA.
71. Lee, G. and Ge, B., *Growth inhibition of tumor cells in vitro by using monoclonal antibodies against gonadotropin-releasing hormone receptor*. Cancer Immunol Immunother, 2010. 59(7): p. 1011-9.
72. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. J Immunol Methods, 1995. 184(1): p. 39-51.
73. Schmid, I., et al., *Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry*. Cytometry, 1992. 13(2): p. 204-8.
74. Flick, D.A. and G.E. Gifford, *Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor*. J Immunol Methods, 1984. 68(1-2): p. 167-75.
75. Ngamwongsatit, P., et al., *WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic Bacillus species using CHO cell line*. J Microbiol Methods, 2008. 73(3): p. 211-5.
76. Kakar, S.S., W.E. Grizzle, and J.D. Neill, *The nucleotide sequences of human GnRH receptors in breast and ovarian tumors are identical with that found in pituitary*. Mol Cell Endocrinol, 1994. 106(1-2): p. 145-9.

77. Shukla, S.K., et al., *Cancer 'chemotherapia specifica' ninety years after Paul Ehrlich*. *Chemotherapy*, 2007. 53(5): p. 309-12.
78. Emons, G., et al., *High affinity binding and direct antiproliferative effects of LHRH analogues in human ovarian cancer cell lines*. *Cancer Res*, 1993. 53(22): p. 5439-46.
79. Aicher B, H.K., Jansen R, Irschick H, Engel J, Schmidt P, Günther E, Müller R, Teifel M, *Highly Potent Cytotoxic Conjugates of Disorazol Z Linked to a LHRH-Receptor Targeting Peptide such as AEZS-125, Interfere with Cell Cycle Progression in Human Cancer Cell Lines and Suppress Tumor Growth in a LHRH-Receptor Positive Ovarian Cancer Xenograft Model*. *European Journal of Cancer*, 2012. 48: p. 101.
80. Christofferson, D.E. and J. Yuan, *Necroptosis as an alternative form of programmed cell death*. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. 22(2): p. 263-8.
81. Takacs, D., et al., *Reversal of ABCB1-related Multidrug Resistance of Colonic Adenocarcinoma Cells by Phenothiazines*. *Anticancer Res*, 2015. 35(6): p. 3245-51.
82. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF), *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Konsultationsfassung 0.4.0*. AWMF Registernummer: 032-045OL, 2017.
83. Seitz, S., et al., *Triple negative breast cancers express receptors for LHRH and are potential therapeutic targets for cytotoxic LHRH-analogs, AEZS 108 and AEZS 125*. *BMC Cancer*, 2014. 14: p. 847.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen danke ich herzlichst für die Möglichkeit dieses spannende Thema zu bearbeiten, die fachkundige und geduldige Beratung und Förderung in allen Lagen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Anoop Chandran für seine freundliche und konstruktive Mitbetreuung der gesamten Arbeit - sowohl technisch als auch wissenschaftlich konnte ich sehr viel lernen.

Ich bedanke mich weiter bei den Mitgliedern (aktuell und ehemalig, Birgitt Fischer, Itsaso Montalban, Ahmed Adel Seida, Valentin Bruttel) der Forschungsgruppe „Experimentelle Tumorummunologie“ geleitet von Prof. Wischhusen für ihre freundliche Unterstützung sowie handwerkliche Tipps und Tricks.

Herzlichen Dank auch an die Firma Æterna Zentaris für die Bereitstellung von Materialien und den wissenschaftlichen Austausch.

Großer Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden für geduldige, materielle und emotionale Unterstützung während dieser Arbeit und des gesamten Studiums.