

Aus der Frauenklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Johannes Dietl

Die Wirkung von AKT-Inhibitoren auf humane Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Tanja Schönhals (geb. Papenfot)

aus Würzburg
Würzburg, September 2010

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. L. Rieger

Koreferent: Prof. Dr. med. J. Dietl

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung :
09.12.2010

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Endometriumkarzinom	1
1.1.1. Allgemeines	1
1.1.2. Pathologie	2
1.1.3. Therapie und Prognosefaktoren	3
1.1.3.1. Operative Therapie	3
1.1.3.2. Strahlentherapie	3
1.1.3.3. Systemische Therapie	4
1.1.4. Rezidive	5
1.2. Ovarialkarzinom	6
1.2.1. Allgemeines	6
1.2.2. Pathologie	7
1.2.3. Therapie	7
1.2.3.1. Operative Therapie	7
1.2.3.2. Chemotherapie	8
1.2.4. Nachsorge	9
1.2.5. Therapie des Ovarialkarzinomrezidivs	9
1.3. Wachstumsfaktoren als attraktive therapeutische Angriffspunkte	10
1.3.1. Molekulare Mechanismen der Tumorgenese und Progression	10
1.3.1.1. Der PI3K/AKT-Signalweg	12
1.3.2. Wirkung von Perifosin	14
Zielsetzung der Arbeit	17
2. Materialien und Methoden	18
2.1. Materialien	18
2.1.1. Zelllinien	18
2.1.2. Präparat (Substanz)	18
2.1.3. Zellkultur-Medium	18

2.2. Methoden	19
2.2.1. Zellkultur	19
2.2.2. Behandlung von Zellen mit Perifosin	19
2.2.3. Kristallviolett-Färbung	20
2.2.4. Serumentzug	20
2.2.5. DNA/Zellzyklus-Analyse (Propidiumjodid-staining) im Durchflusszytometer	20
2.2.5.1. Analyse des DNA-Gehaltes in vitalen und apoptotischen Zellen	21
2.2.6. Präparation von PBLs (peripheren Blutlymphozyten)	22
2.2.7. Methoden zur Analyse von Proteinen (Western-Blot)	23
2.2.7.1. Herstellung von Proteinlysaten	23
2.2.7.2. Proteinbestimmung nach Bradford	24
2.2.7.3. Trennung der Proteine mit SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese	24
2.2.7.4. Westernblot (Immunblot)	25
2.2.7.5. Strippen von Western-Blot-Membranen	25
3. Ergebnisse	27
3.1. Wirkung von Perifosin auf das Wachstum von Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien	27
3.2. Wirkung von Perifosin auf metabolisch-inaktive Zellen	34
3.3. Kombinationsbehandlung von Endometriumkarzinomzellen Ishikawa und HEC-1A und Ovarialkarzinomzelllinien OAW-42 und SKOV-3 mit Perifosin und multi-caspase-Inhibitor zVAD-fmk	36
3.4. Einfluss von Perifosin auf AKT-Phosphorylierung	39
3.5. Zellzyklusanalyse im Durchflusszytometer	41
3.6. Additive Effekte von Perifosin und Cisplatin auf Endometrium- und Ovarialkarzinomzellen	44
4. Diskussion	48
5. Zusammenfassung	54

6. Literaturverzeichnis	57
7. Abbildungsverzeichnis	67
Danksagung	68

1 Einleitung

1.1 Endometriumkarzinom

1.1.1 Allgemeines

Das Endometriumkarzinom wird in den letzten Jahrzehnten häufiger beobachtet. Weltweit nimmt es in der Inzidenz unter allen Malignomerkrankungen der Frau mit jährlich 142.000 Neuerkrankungen die 7. Stelle ein. In der Häufigkeit des Auftretens spielen regionale Unterschiede eine wichtige Rolle, wobei Nordamerika und die westeuropäischen Länder an der Spitze stehen. In diesen Ländern liegt die Inzidenz zwischen 9,9 und 15,0 pro 100.000 [1]. In den Entwicklungsländern und auch in asiatischen Ländern wird das Endometriumkarzinom seltener beobachtet. Die Ursache hierfür ist letztlich unklar [2].

Die Neuerkrankungsrate wird in Deutschland jährlich mit ca. 11.300 Fällen angegeben (vierthäufigstes Malignom der Frau). Mit 2,7% aller krebsbedingten Todesfälle des weiblichen Geschlechts nimmt das Endometriumkarzinom in Deutschland die neunte Stelle ein.

Weltweit zählt man jährlich etwa 42.000 an Endometriumkarzinom verstorbene Frauen; dies sind 1,9% aller krebsbedingten Todesfälle des weiblichen Geschlechts [10]. In Deutschland sind es ca. 1.300 Fälle [1,10].

Die Erkrankungshäufigkeit nimmt mit steigendem Alter kontinuierlich zu und erreicht ihren Gipfel zwischen dem 75 und 80 Lebensjahr. Das Endometriumkarzinom ist somit überwiegend eine Erkrankung der Postmenopause (2/3 der betroffenen Patientinnen); ein Drittel befindet sich im Klimakterium, nur 5% sind jünger als 40 Jahre [2]. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt damit in den Ländern mit der höchsten Inzidenz zwischen 72% in Europa und 84% in den USA [1].

Als gesicherte Risikomerkmale in der Kanzerogenese gelten: Nulligravidität, insbesondere Sterilität, metabolisches Syndrom mit Adipositas (Body mass Index von mehr als 25 kg/m²), ein PCO-Syndrom (Polyzystisches Ovarialsyndrom= Stein-Leventhal-Syndrom), Diabetes mellitus, Verlängerung der Geschlechtsreife bei früher Menarche, später Menopause und häufigen Zyklusanomalien, Mammakarzinom in der Eigenanamnese, Tamoxifen-Therapie, langjährige Applikation hoher Östrogendosen ohne Gestagenschutz, das HNPCC-Syndrom als autosomal-dominant vererbte Erkrankung sowie ethnische Faktoren. Als statistisch wichtigster Risikofaktor ist

zunehmendes Alter zu bewerten. So ist z.B. die altersspezifische Inzidenzrate für eine Frau zwischen 70 und 74 Jahren im Vergleich zu einer Frau zwischen 50 und 54 Jahren um den Faktor 3 erhöht [3,11].

Das Entstehungsrisiko eines Endometriumkarzinoms kann gesenkt werden durch hormonelle Kontrazeptiva-Einnahme, eine lebenslange sojareiche Ernährung, körperliche Belastung und Multiparität [1].

Die häufigsten Symptome sind Blutungsstörungen. Meno-Metrorrhagien in der Prämenopause und jede Blutung in der Postmenopause sind Hinweise auf das mögliche Vorhandensein eines Endometriumkarzinoms [22]. Bei postmenopausalen Blutungen liegt in ca. 10% der Fälle ein Endometriumkarzinom vor, bei Frauen über 70 Jahren sogar in 30%.

1.1.2 Pathologie

Es werden 2 Typen von Endometriumkarzinomen unterschieden: ein östrogenabhängiges und ein östrogenunabhängiges Endometriumkarzinom. Die östrogenabhängigen Endometriumkarzinome (sog. TypI-Karzinome), weisen i. allg. eine gute Differenzierung des Gewebes auf und gehen mit einer guten Prognose einher. Überwiegend östrogenabhängig sind die endometrioiden Adenokarzinome, die man mit einem Anteil von 80% zu den häufigsten Endometriumkarzinomen zählt, die unterschiedliche histomorphologische Erscheinungen aufweisen und mit einer unterschiedlichen Prognose einhergehen [21]. Als Vorstufe der Adenokarzinome gilt die atypische adenomatöse Endometriumhyperplasie, mit einem Entartungsrisiko von 5-10% (einfache Form) bzw. 30% (komplexe Form). In 5-15% kommen Mischformen vor, die neben glandulären auch plattenepitheliale Anteile aufweisen [1,2].

Bei einem östrogenunabhängigen Endometriumkarzinom (TypII-Karzinom), muss eine spontane Krebsentstehung auf dem Boden eines atrophischen Endometriums angenommen werden, was mit schlechter klinischer Prognose assoziiert wird.

Prototypen des östrogenunabhängigen TypII-Karzinoms sind das seröse und das klarzellige Karzinom, die häufig erst in fortgeschrittenem Stadium bei älteren Frauen diagnostiziert werden. Als weitere Tumortypen unterscheidet man histologisch das muzinöse Adenokarzinom, das undifferenzierte Karzinom sowie das primäre Plattenepithelkarzinom.

Die Endometriumkarzinome werden nach ihrem Differenzierungsgrad in gut

differenzierte (G1), mittelgradig differenzierte (G2) und gering differenzierte (G3) Formen eingestuft. Je weniger differenziert ein Endometriumkarzinom ist, desto häufiger liegen eine ausgedehnte Myometriuminfiltration, Gefäßeinbrüche und ein paraaortaler oder pelviner Lymphknotenbefall vor [23,24,25]. Zu den weniger differenzierten Formen zählen die Klarzellkarzinome, mit einer Häufigkeit von ca. 6% und einer Überlebensrate von 35% und die serös-papillären Karzinome, mit einer Überlebensrate von 30% [2]. Diese beide Endometriumkarzinom Typen gehen mit einer schlechten Prognose einher [26,27].

1.1.3 Therapie und Prognosefaktoren

1.1.3.1 Operative Therapie

Zur Behandlung des Endometriumkarzinoms ist die operative Intervention ohne vorausgegangene Strahlen- oder Chemotherapie heute i. allg. die Methode der Wahl. Eine Operabilität ist bei ca. 90% der Patientinnen gegeben [6].

Die entscheidende Basistherapie für die meisten Frauen mit Endometriumkarzinom ist ein systematisches operatives Staging bestehend aus Hysterektomie mit Adnexektomie sowie ggf. einer paraaortalen und pelvinen Lymphonodektomie (Entfernung von mindestens 15 pelvinen und 10 paraaortalen Lymphknoten) [1,15].

Der operative Zugang besteht in einem Unterbauchlängsschnitt, der erweitert werden kann bei der Notwendigkeit einer Lymphonodektomie.

Bei Fällen mit erhöhtem Risiko ist eine retroperitoneale Lymphonodektomie als Staging-Maßnahme indiziert, die als systematische Lymphonodektomie erfolgen und die pelvinen sowie die paraaortalen Lymphknoten bis zum Nierenstiel einbeziehen sollte [7].

Bei den histologischen Sonderformen der Klarzellkarzinome und der serös-papillären Karzinome ist zusätzlich Omenektomie, und die Entnahme multipler Peritonealbiopsien notwendig [2,13].

1.1.3.2 Strahlentherapie

Primäre Strahlentherapie besteht in der Regel aus einer kombinierten Tele-Brachytherapie und ist nur gerechtfertigt, sofern Einwände gegen eine Operation von anästhesiologischer, internistischer oder Patienten-Seite bestehen [16]. Bei Patientinnen mit schwerwiegenden Zweiterkrankungen, bei kleinen Tumoren oder bei sehr alten Frauen kann eine alleinige Brachytherapie durchgeführt werden. Nach

ausschließlicher strahlentherapeutischer Behandlung sollte nach 3 und 12 Monaten eine Kontrollabstrasio erfolgen [1,1].

Eine adjuvante stadien- und risikoadaptierte Strahlentherapie nach einer Hysterektomie mit bilateraler Adnexexstription senkt signifikant das lokalregionäre Rezidivrisiko[1,2].

Die Strahlentherapie sollte innerhalb von 6 Wochen nach Operation beginnen. I.allg. wird als adjuvante postoperative Therapie eine Kombination aus perkutaner Strahlentherapie und vaginaler Kontaktbestrahlung gewählt. Die Morbidität wächst mit Zunahme des bestrahlten Feldes.

1.1.3.3 Systemische Therapie

Zu der systemischen Therapie gehört die Hormon- (Gestagentherapie) und Chemotherapie.

Eine Metaanalyse von mehreren prospektiv randomisierten Studien zum adjuvanten Einsatz von Gestagenen zeigte zwar einen nicht signifikanten Trend für eine leichte Reduktion der Rezidivfälle und der endometriumkarzinomassoziierten Todesfälle, konnte aber keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben nachweisen [1,9,17,18].

Durch eine adjuvante Chemotherapie (Adriamycin plus Cisplatin) konnte für Patientinnen mit optimal operiertem Endometriumkarzinom ein Vorteil gegenüber einer Ganzabdomenbestrahlung mit Becken- und paraaortalem Boost nachgewiesen werden [19,20]. Mit verschiedenen Mono- und Kombinationstherapien besteht die Möglichkeit, objektive Remissionen bei metastasiertem Karzinom zu erreichen. Die bekannten Chemotherapien sind allesamt palliativ, und die beobachtete Wirkung ist meist von kurzer Dauer und partiell [2].

Ebenso wird die Kombination von Chemotherapie mit einer eingeschränkten gezielten Bestrahlungsbehandlung diskutiert.

Eine besondere Situation stellt das besonders aggressive serös-papilläre Endometriumkarzinom dar. Für die Frühstadien dieses Tumors sollte eine umfassende Staging-Operation und für die fortgeschrittenen Stadien eine maximale Tumorreduktion angestrebt werden [2]. Eine Kombination aus Doxorubicin und Cisplatin wird als adjuvante Therapie empfohlen.

Bei inoperablen oder metastasierten progesteronrezeptorpositiven Karzinomen ist die endokrine Gestagentherapie indiziert. Eine palliative Chemotherapie kann bei

lebensbedrohlichen Tumormanifestationen, rezeptornegativen bzw. symptomatischen Tumoren sinnvoll sein. Wirksame Medikamente sind Cisplatin, Adriamycin, Carboplatin, Paclitaxel, Docetaxel [1]. Durch die Kombinationsbehandlung werden höhere Ansprechraten erreicht. So weist die Kombination von Adriamycin/Cisplatin eine signifikante Erhöhung der Responserate auf, beeinflusste aber das Gesamtüberleben kaum. Andere Wirkung zeigte die Kombination von Adriamycin/Cisplatin mit Paclitaxel (plus Filgrastin), die eine wesentliche Verbesserung der Responserate und des Gesamtüberlebens erbrachte, allerdings auf Kosten einer deutlichen Zunahme der Toxizität [1].

Die Heilungserwartung und Überlebensrate sind beim Endometriumkarzinom weitgehend identisch und hängen im Wesentlichen vom histologischen Tumortyp, Differenzierungsgrad, der Lymph- und Gefäßinvasion [4], der Invasionstiefe in das Myometrium, einer Zervixinfiltration sowie vom Lymphknotenbefall ab [4,5,28,29]. Ebenso hat die Art der Primärtherapie entscheidenden Einfluss auf die Prognose: Bei primär operativem Vorgehen sind die Heilungsaussichten etwa 10% besser als nach primärer Strahlentherapie.

1.1.4 Rezidive

Bei etwa 25% der Patientinnen mit Endometriumkarzinom treten im Verlauf ihrer Erkrankung Rezidive bzw. Fernmetastasen auf. Dabei lokalisieren sich 32% im Bereich des Beckens, 17% entfallen auf die Vagina und 51% manifestieren sich als Fernmetastasen, die mit abnehmender Häufigkeit in folgenden Lokalisationen auftreten: Lunge, Lymphknoten verschiedener Lokalisation, Skelett, Peritoneum, Leber und Gehirn [1]. 70% der Rezidive treten innerhalb der ersten zwei Jahre nach Behandlung auf. Die Prognose verschlechtert sich zunehmend mit kleiner werdendem rezidivfreien Intervall. Differenzierungsgrad und Infiltrationstiefe des Tumors stellen die wichtigsten Faktoren für die Rezidiventstehung dar.

Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei früher Erkennung bei 40-50%, beim Beckenwandrezidiv können nach Radiotherapie 68-88% erreicht werden.

Um die Therapieziele festzulegen ist eine sorgfältige Diagnostik bezüglich der Ausdehnung des Rezidivs und Fernmetastasen unter Berücksichtigung der vorausgegangenen Therapien erforderlich. In Frage kommen: Perkutane Strahlentherapie und Brachytherapie (Mono- und Kombinationstherapie) bei nicht

operablen lokalen Scheidenstumpfrezidiven, Radiotherapie beim Beckenwandrezidiv, operative Resektion, ggf. gefolgt von einer Nachbestrahlung bei umschriebenen Befunden am Scheidenende. Nach einer gelungenen R0-Resektion sind 5-Jahres-Überlebensraten von 40% beschrieben worden.

1.2 Ovarialkarzinom

1.2.1 Allgemeines

Der Anteil der Ovarialkarzinome an allen malignen Tumoren der Frau beträgt 4,5%. Im Jahr 2000 betrug die Inzidenz der malignen Ovarialtumoren in Deutschland 23,0 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen, damit erkrankten jährlich in Deutschland ca. 10.000 Frauen am Ovarialkarzinom [30]. Die Häufigkeit der Neuerkrankungen änderte sich in den letzten Jahrzehnten kaum. Die Mortalität liegt bei 14,5 Fällen pro 100.000 Frauen. Von den Frauen, die an einem Karzinom der Genitalorgane erkrankt sind, stirbt fast die Hälfte an einem Ovarialkarzinom, was zum Teil dadurch erklärt wird, dass in ca. 75% der Fälle der Krankheitsprozess zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schon im fortgeschrittenen Stadium war.

Als gesicherte Risikofaktoren in der Kanzerogenese gelten das zunehmende Lebensalter, familiäre Disposition, endokrine Faktoren (frühe Menarche, späte Menopause, polyzystische Ovarien, langjährige Hormonsubstitution, primäre Sterilität) [31,32]. Ebenso wurden gleiche Mutationen an bestimmten Genorten bei an Ovarialkarzinom erkrankten Frauen entdeckt. Bei 5% liegen BRCA1- und BRCA2-Mutationen vor, davon 80% im ersten und 15% im zweiten Kollektiv. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass das kumulative Risiko für BRCA1-Mutationsträgerinnen bis zum 50. Lebensjahr am Ovarialkarzinom zu erkranken bei 14% und im Alter von 70 Jahren bei 43% liegt. Für BRCA2-Mutationsträgerinnen betragen die Erkrankungsrisiken 3% bis zum Alter von 50 Jahren und 15% im Alter von 70 Jahren [33].

Protektive Wirkung weisen Ovulationshemmer, die das Erkrankungsrisiko um etwa 60% senken bei einer Einnahmedauer von 6 Jahren [34], Parität, Hysterektomie und Tubenligatur auf. Die prophylaktische Salpingo-Oophorektomie reduziert das Ovarialkarzinomrisiko um 96% [35].

Vor- und Frühformen werden bei den Ovarialkarzinomen selten diagnostiziert, weil

die frühen Stadien der Erkrankung meist klinisch unauffällig verlaufen. Die Ovarialtumoren sind zunächst im kleinen Becken frei beweglich und es findet keine Beeinträchtigung der Nachbarorgane statt. Eine Zunahme des Bauchumfangs ist häufig das erste Symptom, das die Patientin zum Arzt führt. In 25% der Fälle treten bei Ovarialkarzinomen vaginale Blutungen durch Metastasen oder simulante Karzinome im Bereich der Uterusschleimhaut und/oder die Wirkung vermehrt gebildeter Östrogene auf. Durch verdrängendes oder infiltratives Größenwachstum des Tumors kommt es erst sehr spät zu Behinderung der Nachbarorgane mit Miktionsstörungen, Defäkationsschmerzen, Harnleiterstauungen, Uterusverdrängung und gastrointestinalen Beschwerden. In mehr als der Hälfte der Fälle liegt bei Diagnosestellung eines Ovarialkarzinoms eine Peritonealkarzinose, häufig in Verbindung mit einem Ascites und mit dem Bild einer Tumorkachexie vor [2].

1.2.2 Pathologie

Die Ovarialkarzinome werden nach der WHO-Klassifikation entsprechend dem Zelltyp in seröse, muzinöse (endozervix-ähnlich und intestinal), endometroide, klarzellige, übergangszellige sowie gemischte Typen eingeteilt [50].

1.2.3 Therapie

Die Primärtherapie des Ovarialkarzinoms besteht in der Operation und der nachfolgender Chemotherapie.

1.2.3.1 Operative Therapie

Im Fall des Ovarialkarzinoms im Stadium FIGO I-IIA handelt es sich um ein Erkrankungsstadium, bei dem gute Aussichten auf eine dauerhafte Heilung vorliegen. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 65-90% [39].

Zu den obligaten operativen Maßnahmen beim frühen Ovarialkarzinom zum Staging und Tumorresektion gehören die Durchführung einer Längsschnittdlaparotomie (ist essentiell, da ein endoskopisches Vorgehen experimentell und mit dem Risiko eines unzureichenden Stagings behaftet ist), Entnahme von Aszites/Peritonealflüssigkeit zur zytologischen Bewertung, Biopsientnahmen aus allen auffälligen Stellen und Verwachsungen und Peritonealbiopsien aus unauffälligen Regionen, Durchführung der Adnexektomie beidseits, Hysterektomie, Omentektomie, pelvine und paraaortale Lymphonodektomie beidseits.

Der postoperative Tumorrest ist nach dem Stadium stärkster unabhängiger Prognosefaktor, deswegen ist die Bedeutung der radikalen Tumorresektion bei den fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen sehr groß. Es sollte, wenn immer möglich die komplette Tumorentfernung und nicht die so genannte optimale Tumorresektion mit Tumorrest kleiner als 1 cm angestrebt werden, da ein eindeutiger Überlebensvorteil nur für die tumorfrei Operierten gezeigt werden konnte [41-43]. Zu den hierzu erforderlichen operativen Maßnahmen gehört die infragastrische Netzresektion: unter Mitnahme der milznahen Anteile unter Erhalt der Magengefäßkarkade abgesetzt, was die Exploration der Bursa omentalis ermöglicht; Adnexektomie beidseits nach weiträumiger Eröffnung des Retroperitoneums, Hysterektomie, hohes Absetzen der Ovarialgefäßbündel; befallenes Zwerchfellperitoneum sollte reseziert werden, wenn hierdurch die gesamte Tumorlast reduziert werden kann; Resektion infiltrierter Dünn- und Dickdarmanteile und Appendektomie bei makroskopischem Befall; die systematische pelvine und paraaortale Lymphonodektomie, als obligates Vorgehen bei kompletter Tumorresektion.

1.2.3.2 Chemotherapie

Die systematische Therapie bei den Patientinnen mit frühem Ovarialkarzinom ist differenzierungsgrad- und stadienabhängig, so benötigen die Frauen mit frühem Ovarialkarzinom im Stadium IA, Grad I und einem adäquaten chirurgischen Staging keine adjuvante Chemotherapie, dagegen wird bei den Patientinnen mit Stadium I-II, außer Stadium IA, IB Grad I eine platin-haltige adjuvante Chemotherapie eingesetzt, da die Patientinnen von dieser Therapie profitieren bezüglich des Gesamt- und krankheitsfreien Überlebens [51,52].

Im Anschluss an die Operation wird in der Regel die platin- und taxanhaltige Chemotherapie über 6 Zyklen eingesetzt, da davon auszugehen ist, dass mit großer Wahrscheinlichkeit noch proliferationsfähige Tumorzellverbände verblieben sind [44,45].

Der derzeitige Goldstandard ist die Gabe von Paclitaxel (175 mg/m² über 3h i.v.) und Carboplatin, weil für diese Kombination die beste Datenlage bezüglich Applikationsform, Wirkung und Nebenwirkung existiert. Bei der Behandlung mit anderen Zytostatika ist mit erheblichen Nebenwirkungen wie z.B. Hämatotoxizität unter Docetaxel, Neurotoxizität, Nausea und Emesis unter der Behandlung mit

Cisplatin zu rechnen [53-55].

Bisher konnte weder durch die Addition weiterer Zytostatika als Triplet oder als Erhaltungstherapie noch durch Dosisescalation oder Verlängerung der Therapie ein Vorteil gegenüber der konventionellen Kombinationstherapie aus Platin und Taxan über 6 Zyklen nachgewiesen werden. Für biologische Ansätze gilt das gleiche. Im Rahmen von zahlreichen Studien wird derzeit die Effektivität dieser Therapien in der Primärtherapie des Ovarialkarzinoms untersucht.

Als signifikante prognostische Parameter für das Überleben von Patientinnen mit Ovarialkarzinom gelten Alter, Tumorstadium, Allgemeinzustand und postoperativer Tumorrest, wobei der postoperative Tumorrest nach dem Stadium der stärkste unabhängige und einzige effektiv beeinflussbare Prognosefaktor ist, der über den weiteren Erfolg der Therapie entscheidet [38]. Die Genomanalyse hat derzeit keine wichtige Bedeutung für die Vorhersage der Prognose oder des Therapieansprechens.

1.2.4 Nachsorge

Nach Abschluss der Primärbehandlung erleiden über 2/3 der Patientinnen ein Rezidiv, deshalb ist es sehr wichtig, dass die Nachsorgeuntersuchungen in den ersten drei Jahren dreimonatlich durchgeführt werden. Diese umfassen die Anamneseerhebung, gynäkologische Tast- und Spiegeluntersuchung, Vaginalsonographie, sowie die jährliche Mammographie.

Bei gezielten Fragestellungen werden zusätzlich apparative Untersuchungen wie Computertomographie und Kernspintomographie eingesetzt [60,61].

1.2.5 Therapie des Ovarialkarzinomrezidivs

Bei der Rezidivtherapie unterscheidet man die prognostisch ungünstige primäre Progression, bei der der Resttumor trotz der Primärtherapie weiter progredient ist, das Frührezidiv, innerhalb eines Jahres nach Abschluss der Ersttherapie und das Spätrezidiv [2].

Beim platinrefraktären Rezidiv (innerhalb von 6 Monaten nach Abschluss der Primärtherapie) wird eine nicht platinhaltige Monotherapie mit Topotecan, pegyliertem liposomalen Doxorubicin und Paclitaxel durchgeführt, wobei der Erhalt der Lebensqualität in erster Linie berücksichtigt werden sollte [56-59].

1.3 Wachstumsfaktoren als attraktive therapeutische

Angriffspunkte

Während die klassischen Therapieformen wie Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie ausschließlich die Eliminierung der Tumorzelle zum Ziel haben, sind die neuen Ansätze der modernen Tumorforschung darauf gerichtet, eine Wachstumsinhibition zu erreichen und die tumor-assoziierte Blockade der Apoptose aufzuheben, die es einem gesunden Organismus ermöglicht, fehlerhafte Zellen schonend entfernen.

Die konventionelle Chemotherapie ist nur wenig spezifisch für Tumorzellen und verbunden mit einer Vielzahl an Nebenwirkungen auf gesunde Zellen.

In den letzten Jahren entwickelte sich das Verständnis über die Mechanismen und Grundlagen der Tumorerkrankungen rapide. Darauf basierend konnten erstmals molekularbiologische Werkzeuge entwickelt werden, die Tumorzellen gezielt abtöten oder deren weiteres Wachstum unterdrücken. Das Arsenal dieser Medikamente ist jedoch noch nicht ausreichend, um Krebserkrankungen effektiv behandeln zu können. Daher ist die Entwicklung neuer Medikamente mit spezifischen Wirkungsmechanismen von großer Bedeutung.

1.3.1 Molekulare Mechanismen der Tumorgenese und Progression

Maligne Transformation wird durch genetische und epigenetische Veränderungen ermöglicht, die eine Störung der allgemeinen Kontrollmechanismen von zellulärer Proliferation und programmiertem Zelltod hervorrufen [62]. Diese zellulären Störungen resultieren aus einer genetischen Prädisposition sowie aus exogenen Faktoren, die physikalischer, chemischer oder biologischer Natur sind. Sie sind häufig mit Veränderungen assoziiert, welche die Aktivierung von Protoonkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bewirken, was eine Deregulation zellulärer Signaltransduktionsmechanismen in Tumorzellen verursacht [63]. Diese Fehler können, anders als in gesunden Zellen, nicht mehr erkannt oder behoben werden. Dies führt zur Störung des zellulären Gleichgewichts, was sich im Falle von Krebszellen in einer verstärkten Zellproliferation ohne Kontrolle äußert.

Im normalen Gewebe existiert eine Vielzahl wachstumshemmender Mechanismen, die in Tumoren oft nicht mehr funktionieren. Von großer Bedeutung hierbei ist die Regulation der Wachstumssignale, deren stärkstes Signal über die EGFR-Familie weitergeleitet wird. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass ein

Zusammenspiel verschiedener Mechanismen eine angemessene Dauer und Stärke des Signals von Rezeptoren garantiert. Im Falle des EGFRs konnten mehrere Wege der Rezeptorregulation identifiziert werden [64].

Die EGFR-Familie besteht aus vier Mitgliedern, dem EGFR (Her1, ErbB1), Her2 (human EGFR2, ErbB2/neu), Her3 (ErbB3) und Her4 (ErbB4) [65].

Die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) der EGFR-Familie findet in der Regel durch die Dimerisierung von zwei Rezeptormonomeren statt, die durch die Bindung eines spezifischen Liganden an den Rezeptor (oder im Fall von Her2 ligandenunabhängig) ausgelöst wird [66].

Zu den Liganden der EGFR-Familie zählen EGF, TGF α , HB-EGF, Epi- und Amphiregulin, Betacellulin sowie verschiedene Liganden der Heregulin/NDF-Untergruppe.

Die Bindung eines Liganden kann sowohl zur Bildung von Rezeptorhomodimeren als auch zur Dimerisierung zweier verschiedenen Rezeptoren und somit zur Bildung von Heterodimeren führen [67]. Die in beiden Fällen folgende Aktivierung der intrinsischen Proteintyrosinkinase leitet die Autophosphorylierung spezifischer zytoplasmatischer Tyrosinreste ein. Diese Phosphorylierungsstellen dienen dann als Andockstation für Adaptermoleküle wie Grb2, Shc oder Gab1 und bilden den Ausgangspunkt für eine Reihe von Signalkaskaden [68]. Zu den wichtigsten gehören die Ras-Raf-mitogen-activated protein kinase (MAPK) und die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Proteinkinase P (PKB)/Akt-Kaskaden (Abb.1) [73].

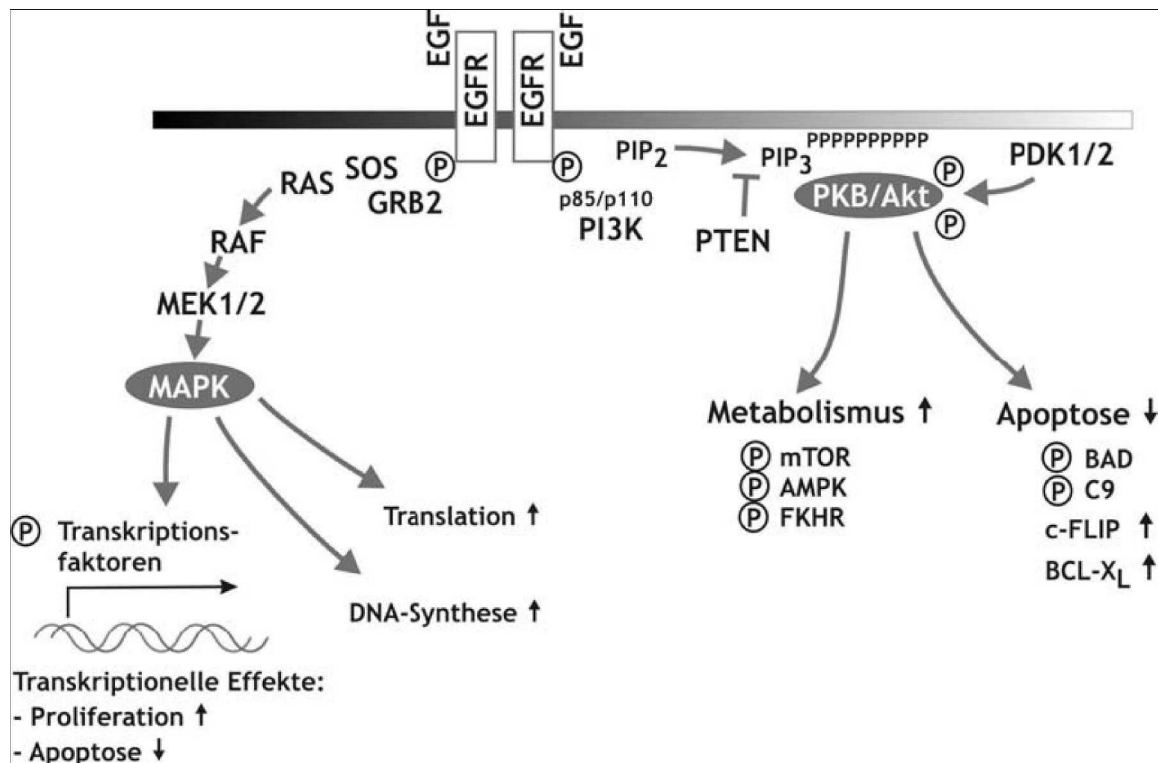


Abb.1: Modell der EGFR-abhängigen Signaltransduktion (Schlessinger, J., Cell 2002 (114)). Liganden-induzierte Dimerisierung führt über Autophosphorylierung zur Aktivierung des EGFR. Über die Adaptorproteine GRB2 und SOS und das GTP-bindende Protein RAS wird die **MAPK-Kaskade** aktiviert. Über pleiotrope Effektoren induziert diese vor allem proliferative Effekte. Die **PI3K-PKB/Akt-Kaskade** stellt einen zweiten Hauptsignalweg dar. Durch Aktivierung der PI3K und Bildung von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PIP₃) wird PKB/Akt an die Zellmembran rekrutiert und phosphoryliert. PKB/Akt moduliert dann die Aktivität einer Vielzahl von Proteinen. Dabei können antiapoptotische und metabolisch aktivierende Funktionsgruppen unterschieden werden. C9, Caspase 9; ppp, *pleckstrin-homology domaine*.

1.3.1.1 Der PI3K/PKB/AKT-Signalweg

Der PI3K/PKB/AKT-Familie steht in Zusammenhang mit der malignen Transformation, die zu einer gesteigerten Proliferation, Wachstum, Invasivität, Metastasierung, Angiogenese und Zellüberleben führt. PI3K wird durch G-Proteingekoppelte Rezeptoren, kleine G-Proteine (z.B. RAS) und Rezeptortyrosinkinasen aktiviert. Der EGFR führt im Vergleich zu anderen Mitgliedern der HER-Familie zu einer schwächeren Aktivierung, da er keine intrazelluläre Bindungsstelle für PI3K besitzt. Die Aktivität der PI3-Kinasen besteht darin, Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositoltriphosphat (PIP₃) zu phosphorylieren. PIP₃ dient als membranverankerte Plattform für die Bindung weiterer Proteine, vermittelt über die Wechselwirkung des 5'-Phosphats mit einer PH-Domäne (Pleckstrin Homologie

Domäne). Die Kinasen der Akt-Familie (Akt1, 2 und 3) sind mit einer PH-Domäne ausgestattet und werden durch PIP3 an der Zellmembran lokalisiert. Dort wird Akt über die 3-phosphoinositol-abhängige Proteinkinasen 1 und 2 (PDPK1 und PDPK2) an Serin 473 und Threonin 308 phosphoryliert [69]. Aktiviertes Akt phosphoryliert und inhibiert proapoptotische Proteine wie BAD, das dadurch das apoptotische Protein BCL-X nicht mehr binden kann, die Caspase 9, Forkhead-Transkriptionsfaktoren und die glycogen synthase kinase (GSK), um das Überleben der Zelle zu fördern [70-72].

Auch andere Signalwege interagieren mit dem PI3K-Signalweg auf der Ebene von Akt. RAS aktiviert den PI3K-Signalweg, während Akt auch die Aktivität von RAS/RAF/MAPK reguliert, indem es RAF phosphoryliert und inaktiviert [73].

Ein weiterer Bestandteil des PKB/Akt-Signalwegs ist *mammalian target of rapamycin* (mTOR). mTor, eine Serin/Threoninkinase ist ein Mitglied der PIKK-Familie (*phosphoinositide 3-kinase-related-kinase*). mTOR integriert Hungersignale, wie Glukose- und Aminosäuredepletion und von Wachstumsfaktoren gesteuerte Signale, und reguliert metabolische und proliferative Programme vor allem über translationelle Mechanismen [74].

mTOR vermittelt seine translationelle Kontrolle über zwei Effektoren. Die S6-Kinase 1/2 ist für die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 (RPS6) verantwortlich. Die Translation von einigen hundert mRNAs wird von der S6-Kinase kontrolliert. Diese mRNAs kodieren für wichtige Funktionsproteine der Translation. Außerdem spielt die S6-Kinase eine Rolle bei der Kontrolle der Zellgröße, des Zellwachstums und der Proliferation [75]. Der zweite Effektor von mTOR ist der eukariotische Initiationsfaktor 4E-BP1, der die Translation bestimmter mRNAs reguliert (Abb.2) [109].

PI3K kann durch Proteinphosphatasen, wie das Produkt des Tumorsuppressorgens *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosom 10* (PTEN) inhibiert werden. Das PTEN-Tumorsuppressorgen ist ein zentraler negativer Regulator der AKT-Signalkaskade und die am häufigsten veränderte Komponente des AKT-Synthesewegs in humanen malignen Tumoren [76]. Es inhibiert die Aktivität von Akt, indem es die Konversion von PIP3 in PIP2 fördert, weshalb es bei einem Verlust dieses Tumorsuppressorgens auf Chromosom 10 häufig zu Malignomen kommt, was z.B. für Gliome, Mamma- und Prostatakarzinome sowie für das Cowden-Syndrom

beschrieben wurde. Mutationen im PTEN-Gen resultieren in einer signifikant-erhöhten AKT-Aktivität [77]. PTEN-Mutationen treten in 50% der Endometriumkarzinome auf [78]. Die Patienten mit dem Verlust der PTEN-Expression gefolgt von AKT-Phosphorylierung sind mit einer schlechten Prognose belastet [79].

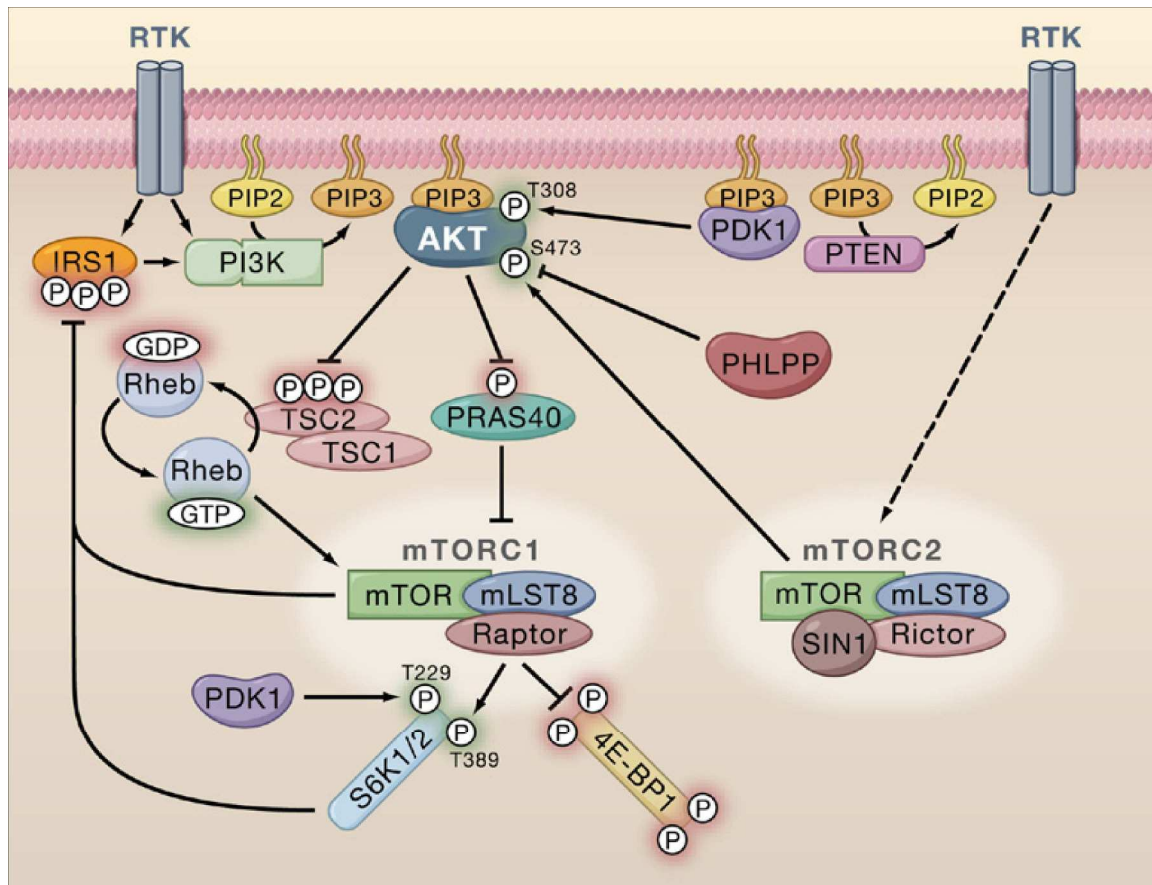


Abb.2 (Mannig, B. D., Lewis,C.; Cell 129, 2007)

Der PI3K/PKB/AKT-Signalweg zeigt sich als vielversprechendes neues Ziel für molekulare Therapeutika, da er sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre onkogene Signale vereint.

1.3.2 Wirkung von Perifosin

Niedermolekulare synthetische Moleküle werden in der Regel als gezielte Inhibitoren von Schlüsselfaktoren wichtiger Stoffwechselprozesse entwickelt. Aktuell richten sich diese Substanzen gegen die Rezeptoren der Signaltransduktionsketten: EGFR; HER2; PDGF-Rezeptor und VEGF-Rezeptor.

Perifosin ist ein oral wirkendes Äther-Alkylphospholipid, das die AKT-Phosphorylierung inhibiert. Seine Anwendung wird derzeit bei verschiedenen Krebsarten in mehreren klinischen Phase-II-Studien geprüft [88]. Bis jetzt wurde Perifosin in klinischen Phase-II-Studien bei Patienten mit Brust-, Kopf und Hals-, Prostata-, Pankreastumoren, multiplem Myelom und Weichteilgewebssarkomen untersucht, wo es *in vitro* und *in vivo* antiproliferative Aktivität zeigte [80-87]. Die Ergebnisse der Zytotoxizitätssays demonstrieren eine behandlungsdauer- und dosisabhängige antikanzerogene Aktivität dieser Substanz in mehreren Zelllinien. So kam es z.B. bei allen untersuchten Kopf- und Halstumorzelllinien zur dosisabhängigen Wachstumshemmung unter der Perifosin-Behandlung, mit IC50-Werten zwischen 0,6-8,9 μ M [84]. Die Prostatakarzinom-Zellen waren noch empfindlicher und die IC50-Werte betragen für manche Zelllinien bei 24h-Behandlungsdauer ca. 5 μ M. 48h Behandlung mit 5 μ M Perifosin ruft 100%-Zelltod hervor [85]. Die wachstumshemmende Wirkung von Perifosin auf Multiples Myelom-Zelllinien wurde mit zunehmender Behandlungsdauer und Konzentration immer ausgeprägter und die IC50-Werte lagen bei 12,5 μ M nach 48h-Behandlung. Die Zellzyklus-Analyse der MM-Zellen zeigte eine Zunahme der Zellpopulation in der sub-G0-Phase des Zellzyklus, was auch bedeutet die Zunahme der Fraktion von apoptotischen Zellen [82]. Die antiproliferative Aktivität von Perifosin wurde auch *in vivo* Versuchen untersucht. Die Test-Mäuse (murines MM Modell) haben die Perifosin-Behandlung gut vertragen [tägliche Dosis-36mg/kg oder wöchentliche Dosis 250mg/kg) und es wurde signifikante wachstumshemmende Wirkung von Perifosin auf MM-Zellen nachgewiesen [82]. Alle oben genannten Tumorzellen wurden auch mittels Western-Blot untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine dosis- und behandlungsdauer-abhängige Inhibition der AKT-Phosphorylierung unter der Perifosin-Behandlung [80-87]. So rief z.B. die Behandlung von Prostatakarzinomzellen mit 5 μ M Perifosin schon nach 30 min eine komplette Hemmung der AKT-Phosphorylierung (Ser473 und Thr308) hervor [85]. Bei den Zelllinien des multiplen Myeloms, die für 0,5 bis 6 h mit 10 μ M Perifosin behandelt wurden, kam es ebenso zur signifikanten Inhibition der AKT-Phosphorylierung [82], die mit zunehmender Behandlungsdauer immer ausgeprägter wurde.

Perifosin ist in der Lage verschiedene Schlüsselsignalübertragungswege, die im Zusammenhang mit dem Wachstum, der Ausbreitung und dem Überleben von

Tumorzellen stehen, zu regulieren. Neue Studien weisen jedoch darauf hin, dass Perifosin den Phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K)/AKT-Signalweg hemmt, indem es die Rekrutierung der AKT-Pleckstrin Homologie-Domäne an die Zellmembran verhindert [88]. Viele Effekte des Perifosins können durch gezieltes Angreifen der AKT auf der Membran überbrückt werden, wodurch eine Inhibition der AKT-Aktivität erreicht wird. Der PI3K/AKT-Signalweg wird häufiger durch genomische Anomalien aktiviert als andere Signalwege bei Tumoren, was es zu einem potentiellen therapeutischen Angriffspunkt macht [89-91].

Zielsetzung der Arbeit

Nach längerer Behandlung von Tumoren mit zytotoxischen Substanzen treten häufig Probleme in Form von Therapieresistenz auf. Durch Blockade der Apoptose kann bei Zellschädigung der programmierte Zelltod nicht mehr ausgelöst werden. Dies ermöglicht den Tumorzellen das Überleben einer Chemotherapie und somit eine weitere Tumorprogression. In diesem Zusammenhang spielt die Blockade des PI3K/AKT-Signalwegs, die in Apoptose und Wachstumsinhibition der Tumorzellen mit erhöhtem AKT resultiert, eine sehr wichtige Rolle, wodurch dieser Signalweg zum vielversprechenden medikamentösen Ziel in der Tumorthherapie geworden ist.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Wirkung des Perifosins in *in vitro* Modellen von humanen Endometrium- und Ovarialkarzinomzellen zu untersuchen. Es sollte eine potentielle antiproliferative Aktivität des Perifosins untersucht werden, bei der Perifosin sowohl alleine als auch in Kombination mit anderen etablierten Chemotherapeutika verwendet wurde.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

In den Versuchen wurden folgende etablierte Zelllinien verwendet.

<u>Zelllinie</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Quelle</u>
OAW-42	Ovarialkarzinom	ATCC, Manassas, VA, USA
SKOV-3	Ovarialkarzinom	ATCC, Manassas, VA, USA
Ishikawa Deutschland	Endometriumkarzinom	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
HEC-1a	Endometriumkarzinom	ATCC, Manassas, USA

2.1.2 Präparat (Substanz)

<u>Substanz</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Quelle</u>
Perifosin Frankfurt,	Akt-Inhibitor	AeternaZentaris GmbH, Deutschland

2.1.3 Zellkultur-Medium

Für die Kultivierung von OAW-42, SKOV-3 und HEC-1a wurde RPMI-1640 (PAA, Cölbe, Deutschland) verwendet.

Ishikawa-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (PAA, Cölbe Deutschland) kultiviert. Den beiden Medien, sowohl RPMI-1640 als auch DMEM wurden 10% fötales Kälberserum (FCS) (Biochrom, Berlin, Deutschland), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (PAA, Cölbe, Deutschland) und 0,5% Natrium-Pyruvat (PAA, Cölbe, Deutschland) zugegeben.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit den erwähnten Zelllinien wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

Die Kultivierung der in beschichteten Zellkulturflaschen adhärent wachsenden Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien erfolgte bei 37°C und 5% CO² in einem Brutschrank (Heraeus, Langenselbold, Deutschland) bei > 98% Luftfeuchtigkeit.

In Abhängigkeit von der Generationszeit wurden die Zellen ca. 2-3 Mal pro Woche kurz vor Erreichen von Konfluenz in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 gesplittet. Die restlichen Zellen wurden zentrifugiert (Biocoll, Biochrom), das Pellet in 1-1,5ml Einfriermedium (70% FCS, 20% RPMI-1640 (DMEM), 10% DMSO (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)) resuspendiert. Nach langsamem Abkühlen auf -80°C (8-12h) wurden sie in flüssigem Stickstoff gelagert.

Durch Auftauen im 37° C warmen Wasserbad, Waschen und nachfolgendes Ausplattieren in DMSO-freiem Medium wurden sie wieder in Kultur genommen.

2.2.2 Behandlung von Zellen mit Perifosin

Perifosin wurde als Stammlösung (Konzentration 10 mM) bei -20°C gelagert.

Für die Behandlung von Zellen wurden Vorverdünnungen des Perifosins in RPMI-1640 bzw. DMEM (Ishikawa-Zellen), je nach Bedarf mit oder ohne FCS, hergestellt.

Zur Behandlung der Zellen in 96-Well-Platten wurden die Zellen in 100µl Vollmedium (RPMI-1640/DMEM mit 10% FCS, 1% PIS, 0,5 % PYR)/Well ausgesät. Für Vitalitätsassays mit 24h, 48h oder 72h Behandlungsdauer mit unmittelbar folgender Bestimmung der Vitalität sowie für die Experimente zur Bestimmung der Synergie von Perifosin mit anderen Präparaten (Cisplatin, Paclitaxel, Rapamycin) (Sigma, St Louis, MO, USA), Versuche mit Serumentzug und zVAD-fmk wurde eine Zelldichte von 10 000 Zellen/Well verwendet.

Nach dem Aussäen wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert, um ein Anwachsen der Zellen an die Plattenoberfläche zu ermöglichen. Zur Behandlung wurde eine dreifach konzentrierte Vorverdünnung der Substanzen in

einem Volumen von 50µl hinzugegeben.

2.2.3 Kristallviolett-Färbung

Mit Hilfe der Kristallviolett-Färbung lassen sich sowohl lebende als auch tote Zellen anfärben. Da sich tote Ovarial- bzw. Endometriumkarzinomzellen von der Matrix der Zellkulturflasche ablösen und abgewaschen werden, ist die nach Färben und Waschen der Zellen noch vorhandene Menge Kristallviolett ein Maß für die Dichte der adhären (und somit vitalen) Zellen. Die Messungen wurden in 96-Well-Platten durchgeführt. Zur Färbung der Zellen wurde das Medium vorsichtig abgekippt und die Platte ausgeklopft; 50µl Kristallviolettlösung (0,5% Kristallviolett in 20% Methanol) wurde je Well hinzupipettiert und für 5-20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Kristallviolettlösung dekantiert und die Platte zur Entfernung abgelöster Zellen sowie nicht zellgebundenen Farbstoffes gründlich mit Wasser gewaschen und über Nacht getrocknet. Anschließend wurden 50µl Natriumcitrat-Lösung (0,1 M Natriumcitrat in 50% Ethanol)/Well hinzugegeben um den Farbstoff erneut zu lösen und die jeweilige Absorption aller Wells im Tecan sunrise multi-purpose-Reader (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 560nm bestimmt.

(Leerwert: 50µl Natriumcitrat in Kristallviolett-gefärbtem Well ohne Zellen).

2.2.4 Serumentzug

Wenn dem Kulturmedium kein Wachstumsfaktoren enthaltendes Kälberserum zugesetzt wird, hören die meisten Zellen auf, sich zu teilen und gehen in einen als G₀-Phase des Zellzyklus bezeichneten Zustand über. Zur serumfreien Behandlung wurden die Zellen in 96-Well-Platten vor der Behandlung zweimal mit PBS gewaschen, und 100µl serumfreies Medium wurden hinzugegeben, über Nacht inkubiert und anschließend behandelt.

2.2.5 DNA/Zellzyklus-Analyse (Propidiumjodid-staining) im Durchflussszytometer

Die Zellen wurden durch Behandlung mit Accutase von dem Boden der Zellkulturflasche abgelöst (dabei beachten, dass apoptotische Zellen nicht abgesaugt, sondern mit adhären Zellen gepoolt werden). Ca. 5×10^5 Zellen je

Probe wurden in FACS- Röhren pipettiert, abzentrifugiert (1200rpm, 5min, 4°C), einmal mit kaltem PBS gewaschen und in ca. 1 ml eiskaltem 75% Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) für mindestens 20 min fixiert. Anschließend wurde Ethanol mit ca. 2 ml kaltem PBS aufgefüllt, die Zellen wurden abzentrifugiert (1800 rpm, 5-10 min, 4°C) und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die Zellen wurden dann noch mal mit kaltem PBS gewaschen, resuspendiert, abzentrifugiert (1800 rpm, 5-10 min, 4°C) und der Überstand wurde vorsichtig abgekippt. Anschließend wurden sie mit Propidiumjodid/RNaseA-Lösung (50 µg/ml Propidiumjodid (Sigma, Schnelldorf, Deutschland) (Stock-Sol. 1:100 verdünnen) + 100 µg/ml RNase (Gibco Life Technologies, Paisley, UK) (Stock 1:100 in PBS verdünnen) gefärbt und mindestens 20 min lichtgeschützt bei 4°C inkubiert.

Die Messung wurde mit dem Durchflusszytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) innerhalb von 24 h durchgeführt.

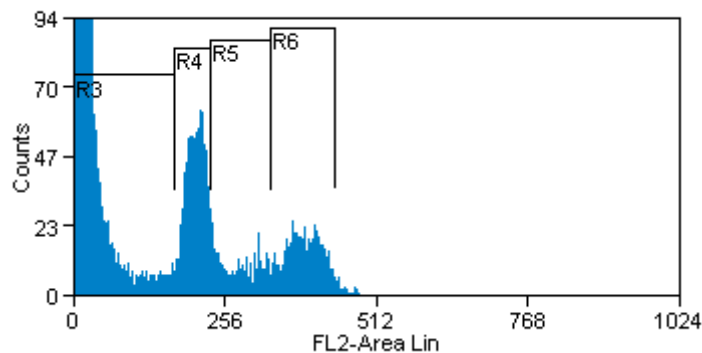
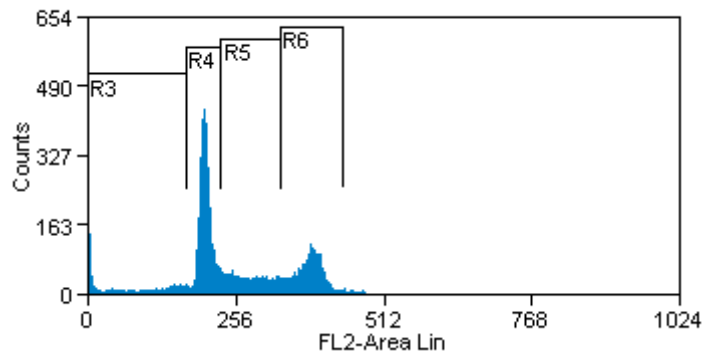
2.2.5.1 Analyse des DNA-Gehaltes in vitalen und apoptotischen Zellen.

Die nukleäre DNA kann mittels spezieller Farbstoffe, wie in unserem Fall Propidiumjodid, angefärbt werden. Dieser Farbstoff ist fluoreszierend und kann mit einem geeigneten Laser angeregt werden. Da die Propidiumjodid-Aufnahmekapazität einer Zelle proportional zu ihrem DNA-Gehalt ist, kann diese Färbung ausgenutzt werden um den DNA-Gehalt und den Zellzyklusstatus einer einzelnen Zelle oder Zellpopulation im Durchflusszytometer zu analysieren.

Auf der X-Achse ist die Intensität der Anfärbung mit dem Propidiumjodid aufgetragen. Diese verhält sich proportional zur DNA-Menge. Die Höhe der Kurve stellt die Anzahl der Zellen dar. Die meisten Zellen befinden sich in Ruhe, sie haben einen einfachen Chromosomensatz (G0/G1-Gipfel/Peak)(R4).

In proliferierenden Zellen verdoppelt sich die chromosomale DNA in der S-Phase des Zellzyklus (R5). Aus diesem Grunde ist der DNA-Gehalt der Zellen, die sich in der G2-Phase (R6) befinden, doppelt so hoch wie derjenige von ruhenden oder postmitotischen Zellen. Eines der typischen Merkmale vom Zelltod ist die Fragmentierung von chromosomaler DNA in kleine Bruchstücke. Zudem wird oft

der Zellkern fragmentiert. Die kleineren und grösseren Stücke werden oft von der Zelle freigesetzt, sodass bei einer DNA-Färbung von apoptotischen Zellen ein DNA-Gehalt beobachtet wird, der niedriger ist als bei einer normalen Zelle in der G0/G1-Phase. Man spricht von sub-G0 Zellen (R3).



2.2.6 Präparation von PBLs (peripheren Blutlymphozyten)

Das Blut wurde ca. 1:1 mit sterilem PBS verdünnt, im Anschluss daran erfolgte die Aufbau des Dichte-Gradienten: Je 50ml Falcon-Tube wurden 15ml Lymphozytenseparationsmedium (PAA J15-004) vorgelegt und mit 35ml Blut-PBS-Gemisch überschichtet. Anschließend wurden die Blutzellen abzentrifugiert (600rpm, 20min, ohne Bremse, RT). Ca. 10-15ml der oberste Fraktion (Serum, PBS und Thrombozyten) wurden abgenommen und verworfen.

Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (1400rpm, 30min, ohne Bremse, RT). In

diesem Schritt wurde die Trennung von Lymphozyten und Erythrozyten erreicht. Die Falcons wurden sehr vorsichtig aus den Zentrifugenbechern entnommen, aufgrund der unterschiedlichen Dichte der einzelnen Fraktionen befanden sich die Erythrozyten (rot) unten, die gelbliche Serumfraktion ganz oben. Oberhalb der Erythrozytenschicht befand sich das Trennmedium, darauf schwamm der weißliche Ring aus Lymphozyten. Diese Lymphozytenschicht wurde vorsichtig mit einer 2ml Pipette abgenommen, in ein 50ml Falcon überführt, das mit PBS abgefüllt wurde. Die Zellsuspension wurde dann 8min bei 1200rpm zentrifugiert (RT, mit Bremse). Anschließend wurde das Pellet in PBS resuspendiert und nochmals 8min bei 1000rpm abzentrifugiert (RT, mit Bremse). Die abzentrifugierte Lymphozyten wurden in RPMI-1640 Medium mit 10% FCS, 0,5% Pyruvat und Antibiotika (Penicillin, Streptomycin) resuspendiert und gezählt.

2.2.7 Methoden zur Analyse von Proteinen (Western-Blot)

2.2.7.1 Herstellung von Proteinlysaten

Lysate behandelter Zellen wurden erhalten, indem zunächst in einer 6cm Schale 600 000 Zellen/Schale in einem Volumen von 3ml Vollmedium/Schale ausgesät wurden. 24h nach Aussäen wurden die Wachstumsfaktoren durch Verwendung von serumfreiem Medium entzogen. Dies erfolgte durch Absaugen des serumhaltigen Mediums, Waschen mit PBS und Hinzufügen des serumfreien Mediums. Nach 48-stündiger Inkubation erfolgte die Behandlung mit dem Akt-Inhibitor (Perifosin) für 1h und anschließend die Restimulation mit FCS (10%) für 1h.

Dann wurde das Medium abgesaugt, die Zellen unter Verwendung von Accutase abgelöst, abzentrifugiert (1500rpm, 20°C, 4min), mit 500µl kaltem PBS resuspendiert und in Eppendorf-cups überführt. Anschließend wurde wieder abzentrifugiert (1800rpm, 10min, 4°C), der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 100µl Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 120 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% NP-40, 2µg/ml Aprotinin, 10µg/ml Leupeptin, 100 µg/ml PMSF, 50 mM NaF und 200 µM NaVO₅) aufgenommen und 15min lang auf Eis inkubiert. Vor Einsatz des Lysepuffers wurden Aprotinin-, Leupeptin-, und PMSF-Stammlösung zu einer Endkonzentration von 2µg/ml, 10µg/ml bzw. 100µg/ml

sowie NaF (50mM) und Na₃VO₄ (200µM] zugegeben. Anschließend wurden die Lysate zentrifugiert (13000g, 15min, 4°C), der Überstand vom Pellet getrennt und bei -20°C gelagert.

Bei behandelten Zellen wurden die abgelösten/apoptotischen Zellen vor der Lyse mit dem Zellpellet vereinigt.

2.2.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford

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

Zur Messung wurde auf einer 96-Well-Plate zunächst 50µl Wasser /Well vorgelegt. In die ersten 8 Wells wurde mit Hilfe einer BSA-Stammlösung (1mg/ml) als Standard ein Bereich von 0 bis 12 µl BSA als Eichkurve aufgetragen. Von den Lysaten wurde je Well 1 µl aufgetragen. Die Farbreaktion wurde schließlich durch Zugabe von 200µl 1:4 mit Aqua dest. verdünntem Bradford-Reagenz (Roti-Quant, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gestartet. Die Absorption wurde bei 595nm mit dem Tecan sunrise multi-purpose-Reader gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden als Mittelwerte von Triplets der gleichen Probe bestimmt.

2.2.7.3 Trennung der Proteine mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteintrennung wurde nach dem System von U.K. Lämmli durchgeführt. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels wurde der Größe des zu untersuchenden Proteins angepasst und betrug zwischen 8 und 12%.

Zusammensetzung der Polyacrylamidgele:

Acrylamidkonzentration (%)	8	10	12
Aqua dest. (ml)	2,3	2,0	1,7
30% acrylamid/Bisacrylamid	1,3	1,7	2,0
1,5M Tris-HCl pH=8,8 (ml)	1,3	1,3	1,3
10% SDS (ml)	0,05	0,05	0,05
10% APS (ml)	0,05	0,05	0,05
TEMED (ml)	0,004	0,004	0,004

Für alle Proben wurde eine Proteinmenge von 10µg je Spur verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 3µl 6x Lämmli-Puffer (300 mM Tris-HCl pH=6.8, 12% SDS, 0.6% Bromphenolblau, 60% glycerol) mit 10% 2-

Mercaptoethanol versetzt und 5 min lang bei 95°C denaturiert.

2.2.7.4 Westernblot (Immunblot)

Die Immobilisierung der im Gel aufgetrennten Proteine auf einer Nitrozellulosemembran erfolgte durch Elektrotransfer in Transferpuffer in einer Transferkammer (150V, 500mA, 75min). Die Nitrozellulosemembran wurde vor dem Proteintransfer für ca.10min in Transferpuffer aktiviert. Der Transfer wurde durch reversible Färbung mit Ponceau-Rot-S-Färbelösung überprüft. Die Entfärbung der Membran erfolgte mit Wasser (10min) und mit TBS-Tween (10min). Anschließend wurde die Membran im Blockierungspuffer (TBS mit 5% Milchpulver und 0,05% Tween-20) 120min lang abgesättigt. Nach viermaligem Waschen mit TBS-Tween (jeweils 8min) wurde mit Primärantikörper Anti-Phospho-Akt (Ser 473) 1:1000; (No. 9275, Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland) und Anti-Akt (No.9272) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut viermal mit TBS-Tween gewaschen und dann 60min lang mit dem Sekundärantikörper HRP-konjugierte Anti-Rabbit und Anti-Mouse Immunglobuline (Ig)G (Kpl, Gaithersburg, USA, Vertrieb durch Medac, Wedel, Deutschland) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach vier weiteren Waschschritten wurde die Membran mit einem luminol-basierten Detektionsreagenz (1 ml Lösung A: 0,1M TRIS-HCl (pH 8,6) mit 0,25 mg/ml Luminol + 0,6µl H₂O₂+ 100 µl Lösung B: 1,1 mg/ml para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO) 2min lang inkubiert und im Dunkeln einem Film exponiert.

2.2.7.5 Strippen von Western-Blot-Membranen

Nach der ersten Entwicklung der Membran wurde diese viermal 8 min lang mit TBS-Tween gewaschen, anschließend 10min in Stripping-Puffer (200 mM Glycin, 0,5 M NaCl, pH 2,8) inkubiert und mit 1M Tris/HCl-Lösung neutralisiert. Danach wurde die Membran viermal mit TBS-Tween gewaschen. Nach erneuter Blockierung mit 5% Milch-TBS-Tween-0,05% wurde die Membran mit einem neuen Antikörper (Akt-Antikörper; 1:1000; Cell Signaling Technology) inkubiert.

Statistik: Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Bei der Auswertung der Daten wurden Mittelwert und Standardabweichung als

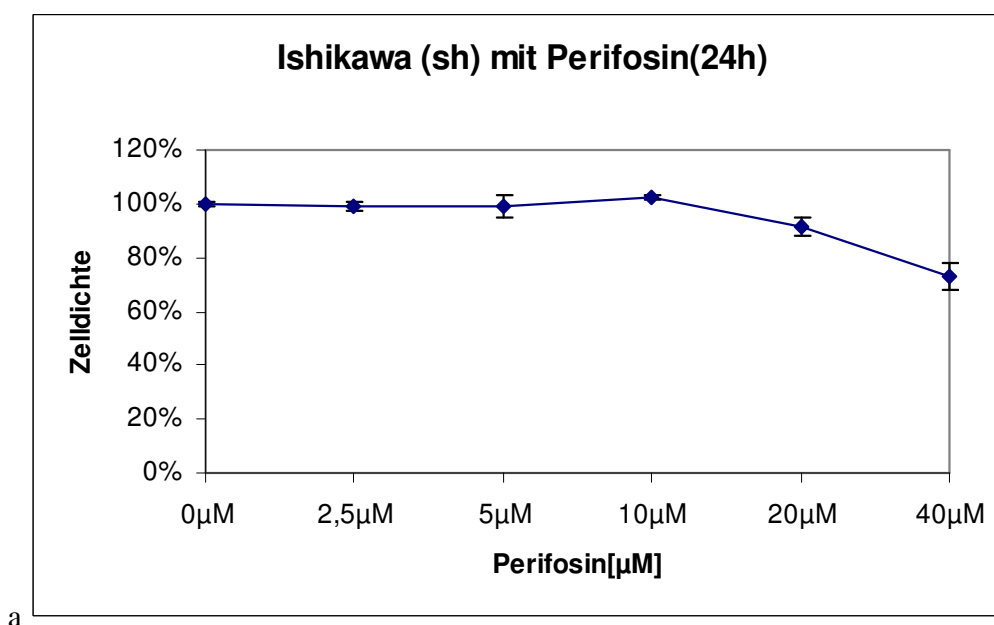
Fehlerbalken mit Exel ermittelt.

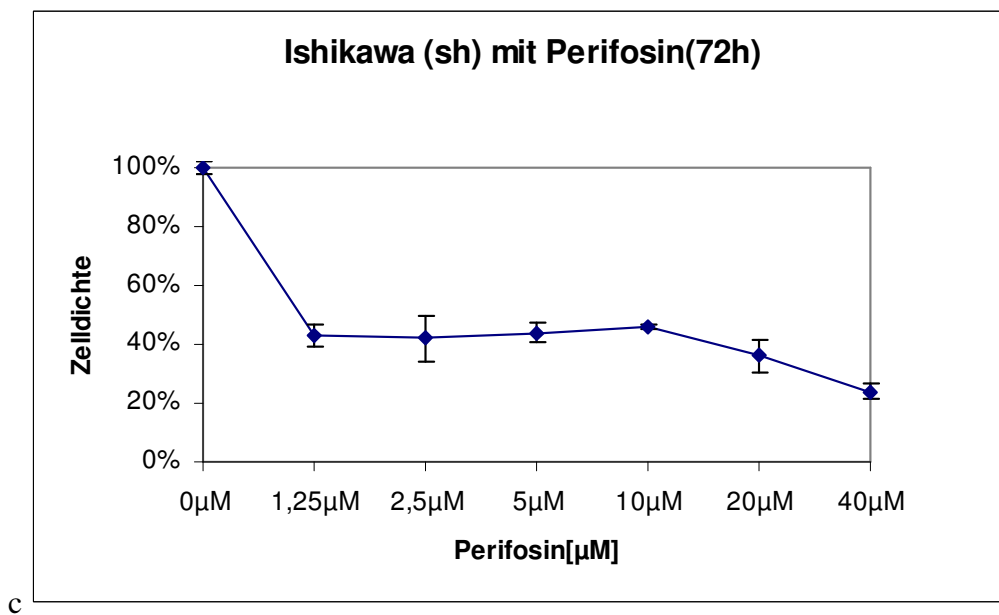
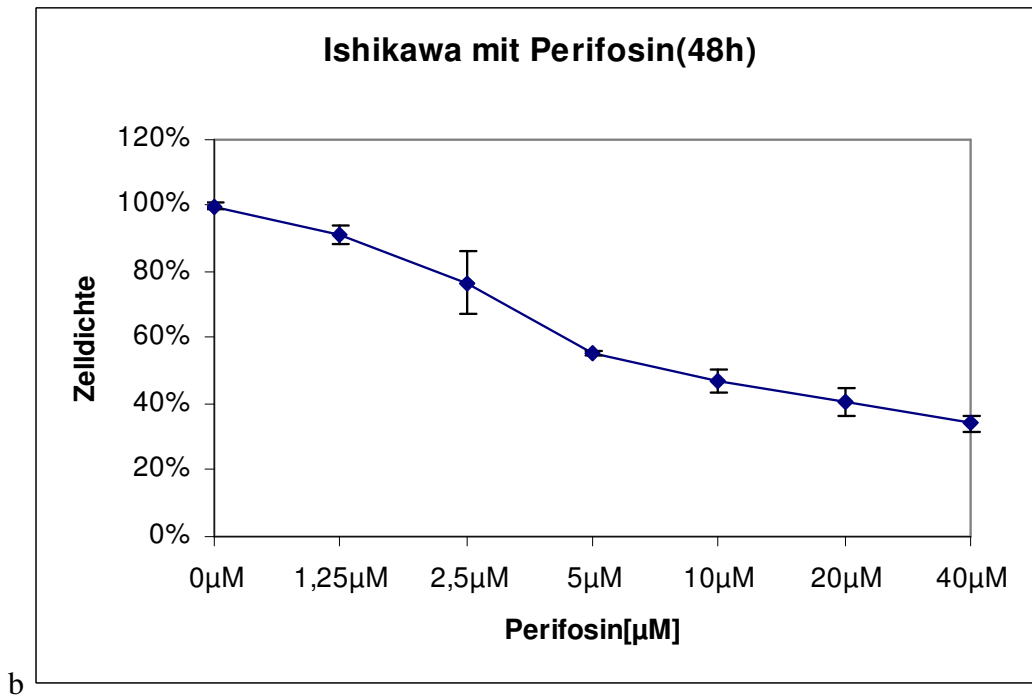
3 Ergebnisse

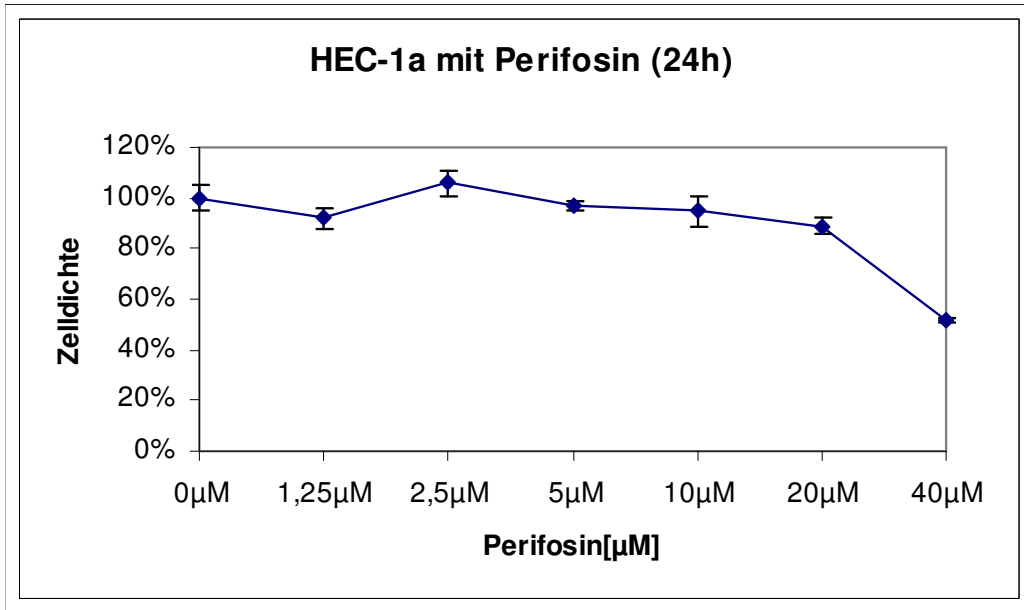
3.1 Wirkung von Perifosin auf das Wachstum von Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien

Um herauszufinden, ob die Einschränkung der Akt-Phosphorylierung zu vermindertem Wachstum oder zum Zelltod in den menschlichen Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen führt, wurden Ishikawa, sowie HEC1A-Zelllinien mit ansteigenden Konzentrationen von Perifosin oder mit Lösungsmittel (DMSO) behandelt und über 24h, 48h und 72h im Brutschrank inkubiert. Während das Lösungsmittel das Zellwachstum nicht beeinflusste, zeigte Perifosin starke wachstumshemmende Effekte, die mit zunehmender Behandlungszeit ausgeprägter wurden. Während die IC 50 Werte (**IC 50**- mittlere inhibitorische Konzentration. Die Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird) bei 24h-Behandlungsdauer $>40\mu\text{M}$ waren, betrug die IC 50-Werte nach 48h etwa $7\mu\text{M}$ für Ishikawa und $25\mu\text{M}$ für HEC1A-Zellen. Nach 72h-Behandlungsdauer lagen die IC 50-Werte unter $1,25\mu\text{M}$ für Ishikawa; ungefähr bei $6\mu\text{M}$ für HEC1A-Zellen; (Abb.3 a-f).

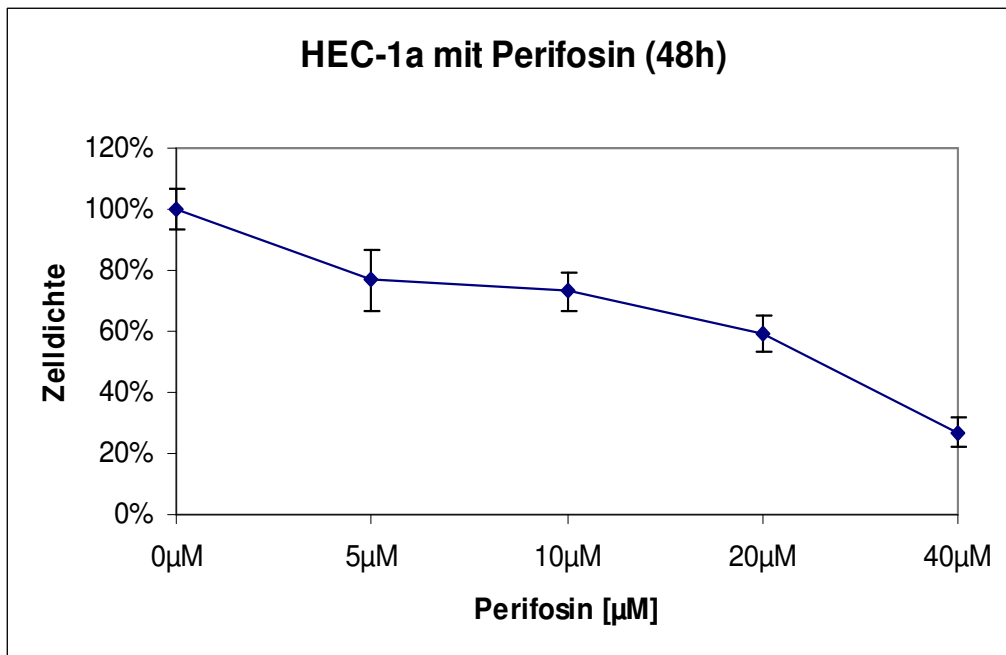
Für die OAW-42 und SKOV-3 waren die IC50-Werte bei 24h-Behandlungsdauer ebenso $>40\mu\text{M}$, bei 48h-Behandlung lagen sie bei ca. $11\mu\text{M}$ für OAW-42 und bei ca. $40\mu\text{M}$ für SKOV-3. Nach 72h- Behandlungsdauer betrug die mittlere inhibitorische Konzentrationen $10\mu\text{M}$ für OAW-42 und ca. $30\mu\text{M}$ für SKOV-3 (Abb.3 g-l)



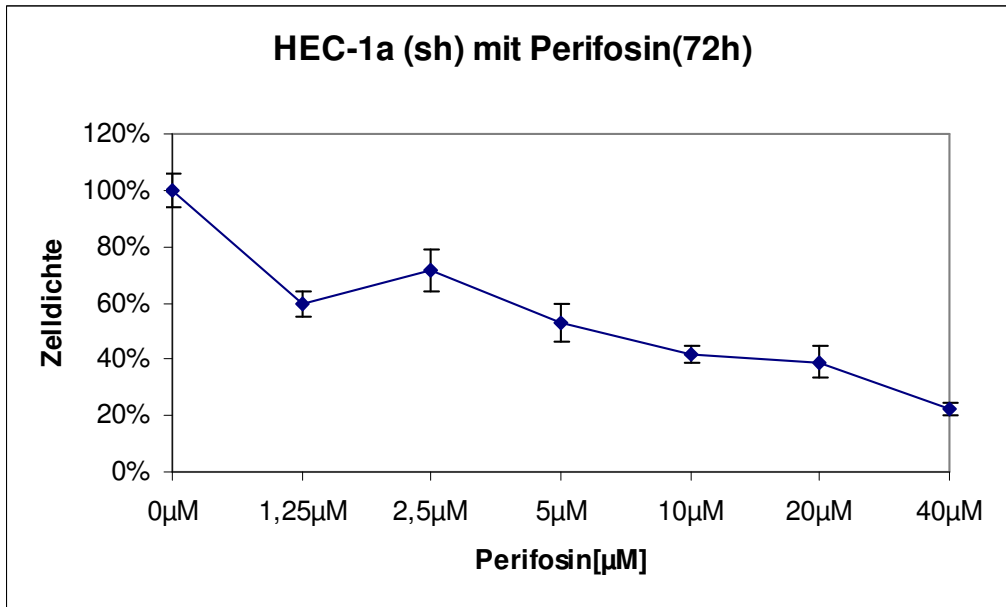




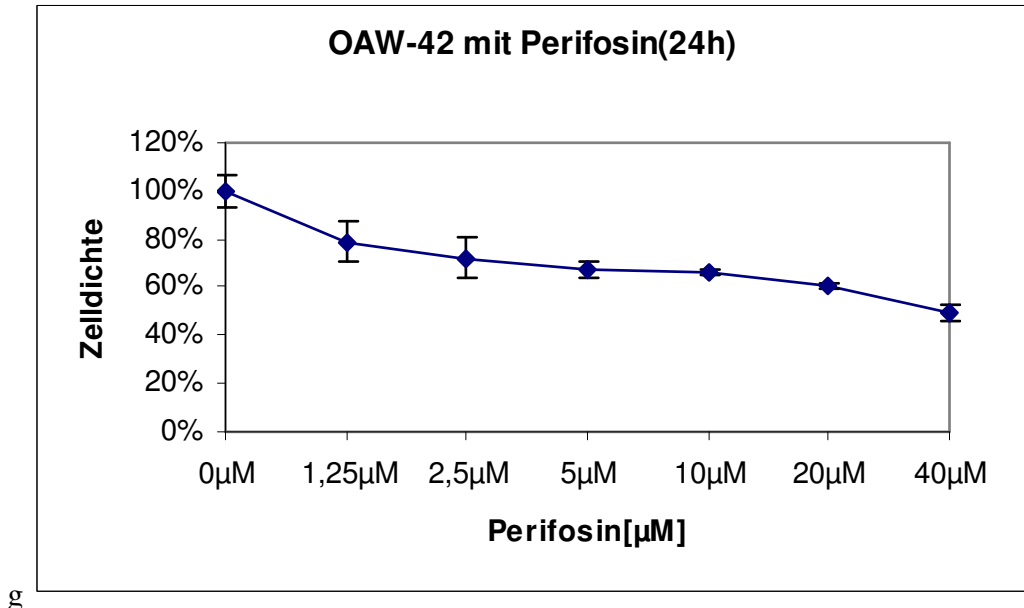
d



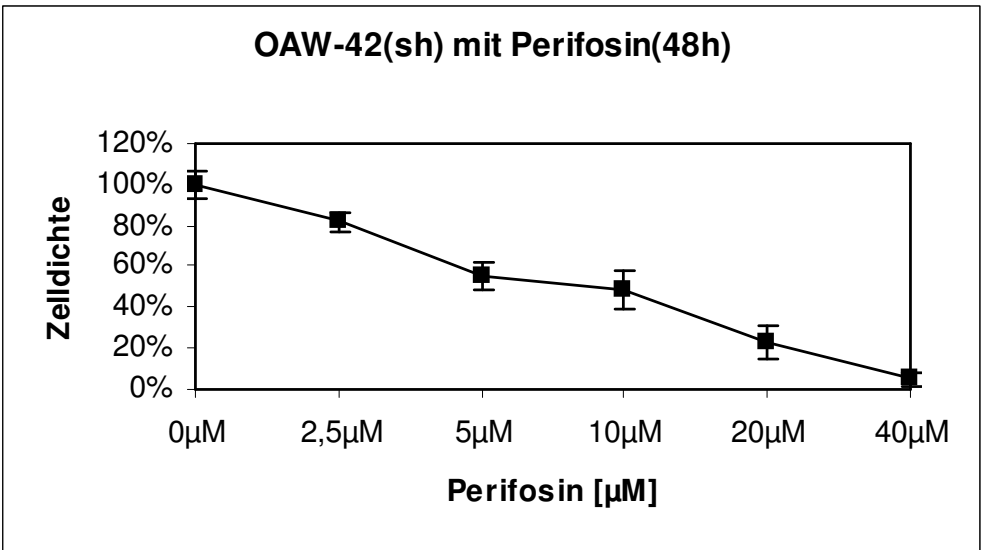
e



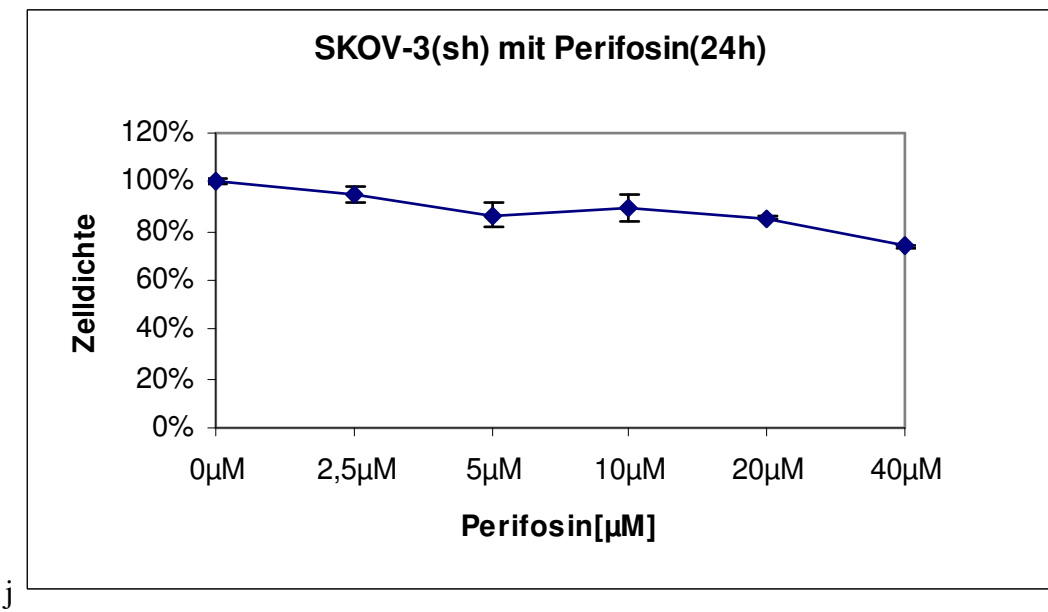
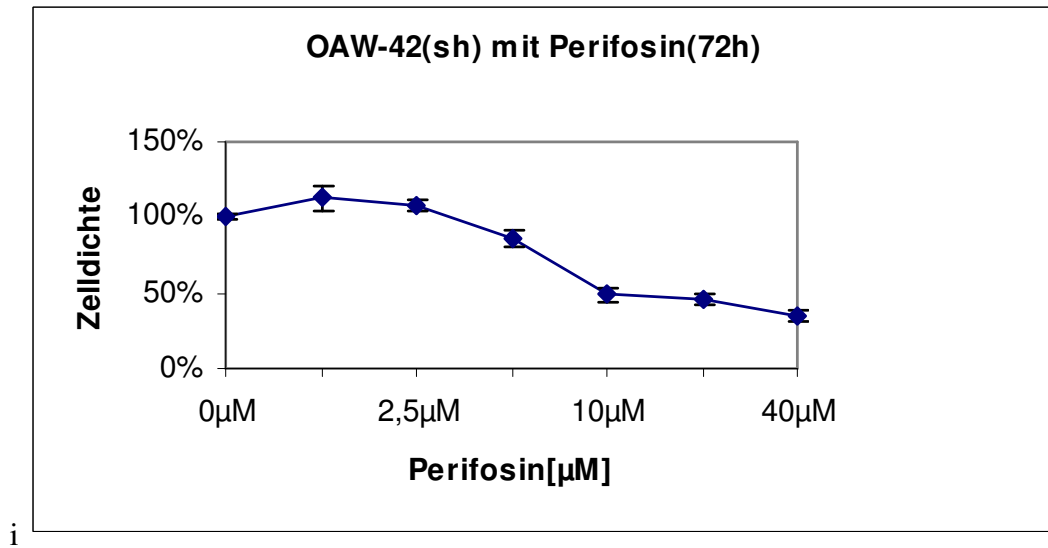
f



ca



h



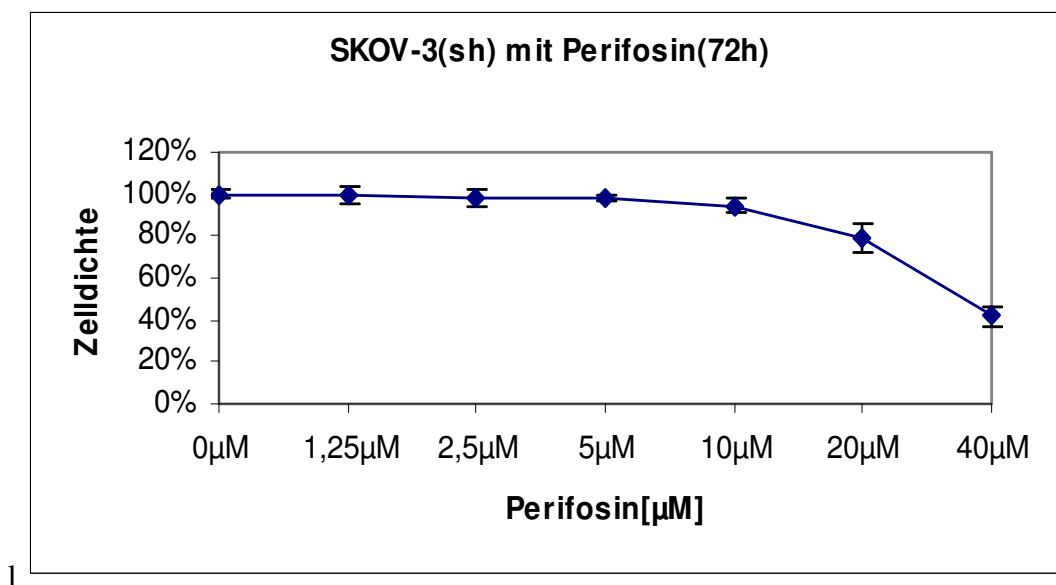
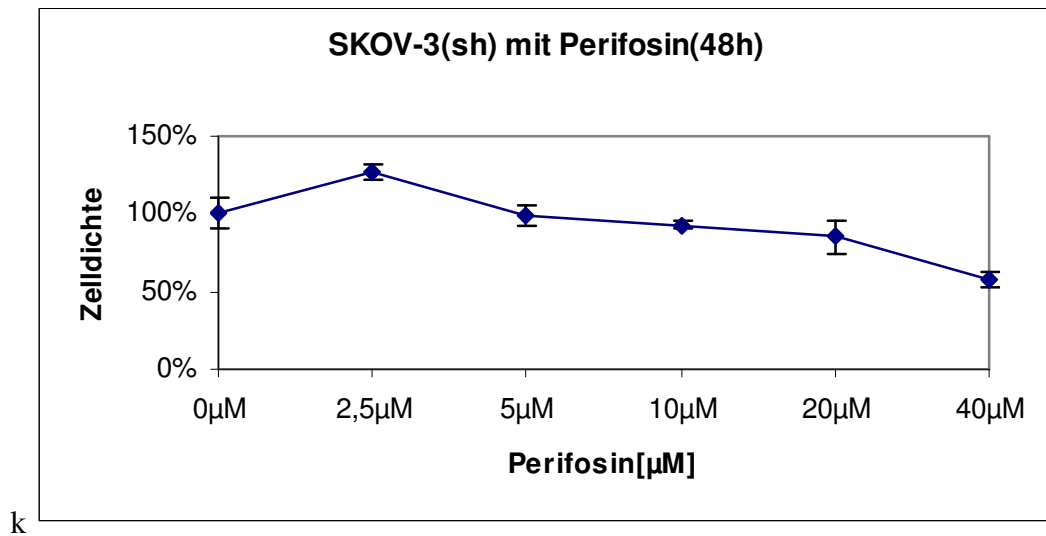
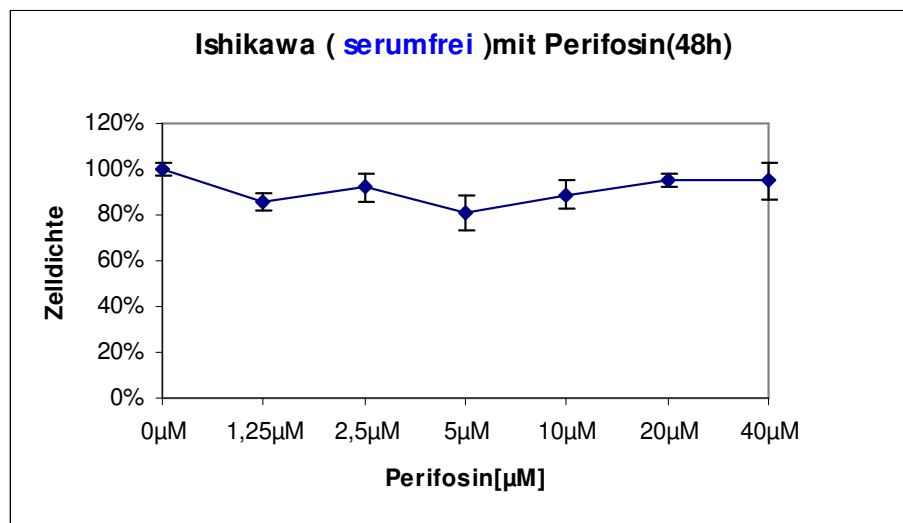


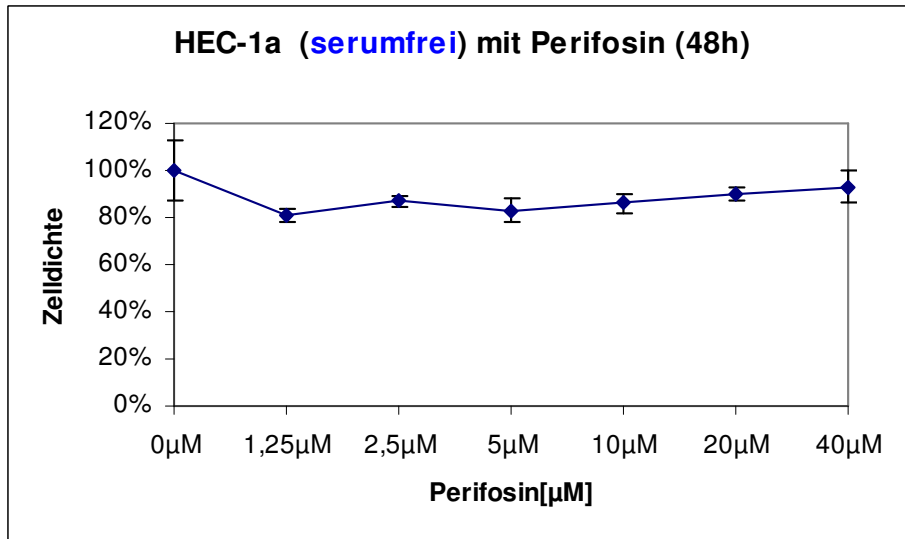
Abb.3 a-l: Zytotoxische Effekt des Perifosins auf die Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa (a-c), HEC1A (d-f), Ovarialkarzinomzellen OAW-42 (g-i), und SKOV-3 (j-l) nach 24h, 48h und 72h Behandlung. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten in RPMI-1640 und DMEM (Ishikawa) mit 10% FCS, Penicillin und Streptomycin 24, 48 und 72 h behandelt. Der Anzahl der adhärenenten Zellen wurde mittels Kristallviolett färbung bestimmt und auf eine Kontrolle mit der höchsten Lösungsmittelkonzentration bezogen.

3.2 Wirkung von Perifosin auf metabolisch-inaktive Zellen

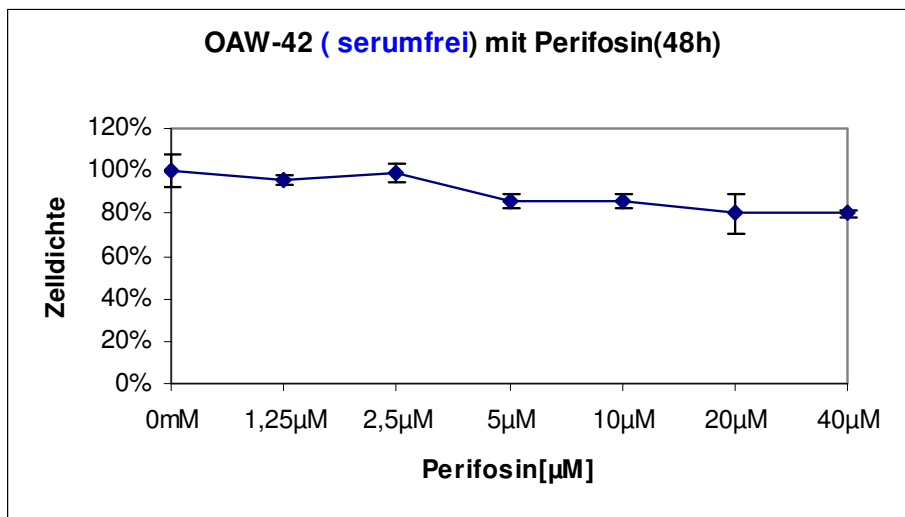
Zur Ermittlung Perifosin-induzierter Effekte auf metabolisch-inaktive Zellen wurden im serumfreien Medium kultivierte Zelllinien mit Perifosin behandelt. Wenn dem Kulturmedium kein Wachstumsfaktoren enthaltendes Kälberserum zugesetzt wird, kommt es zur Erzeugung eines künstlichen Proliferationsstops und die meisten Zellen gehen in einen als subG₀-Phase des Zellzyklus bezeichneten Zustand über. Wie in Abbildung 4 (a-d) gezeigt, verursachen die ansteigende Konzentrationen von Perifosin, die sich zwischen 1,25µM und 40µM erstreckte, kaum oder nicht-signifikante Zytotoxizität. Somit ist es wahrscheinlich, dass der Zellzyklusarrest durch Serumentzug eine protektive Wirkung aufweist. Dieser Effekt wurde sowohl bei Endometrium- als auch bei den Ovarialkarzinomzelllinien beobachtet.



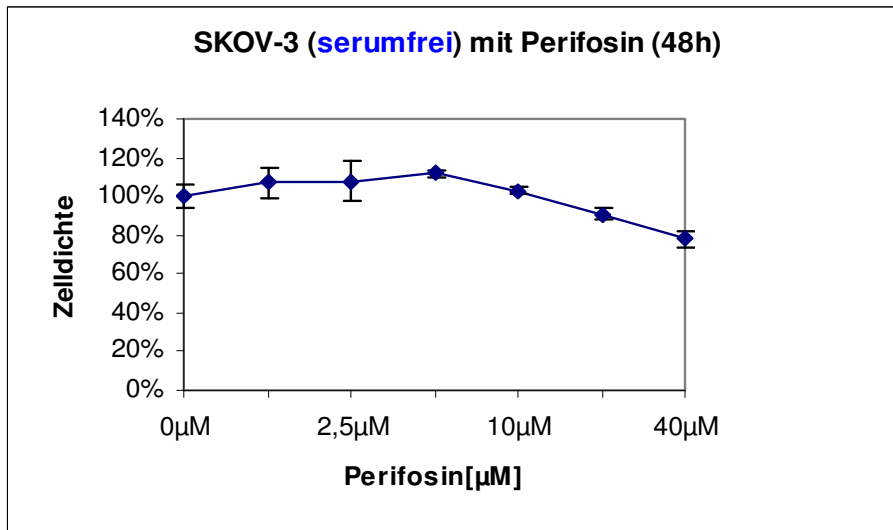
a



b



c



d

Abb.4 a-d: Antiproliferative Wirkung von Perifosin auf metabolisch-inaktive Zellen. Die Zelllinien wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit Perifosin behandelt und 48h lang im serumfreien Medium inkubiert. Auswertung mit Kristallviolettassay.

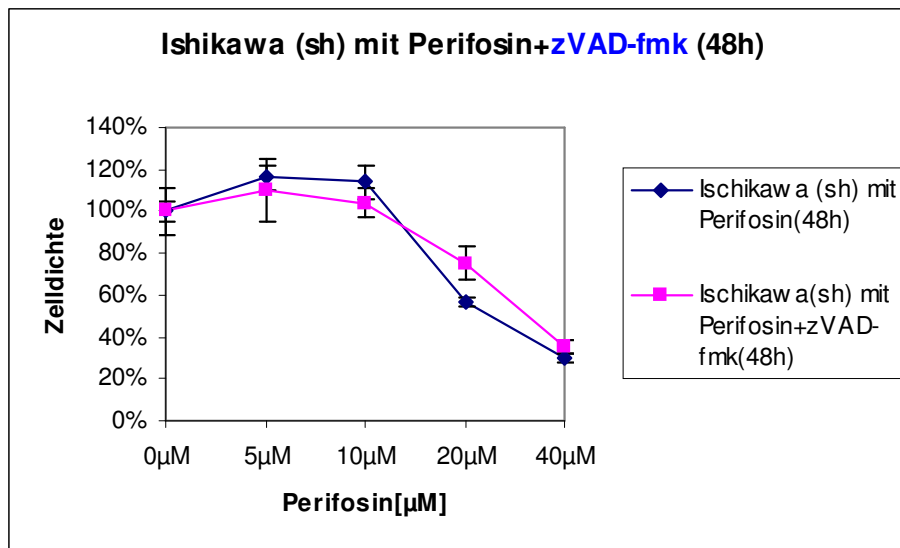
3.3 Kombinationsbehandlung von Endometriumkarzinomzellen Ishikawa und HEC-1A und Ovarialkarzinomzelllinien OAW-42 und SKOV-3 mit Perifosin und multi-caspase-Inhibitor zVAD-fmk

Da die kaskadenartige Aktivierung von Caspasen die gesamte Endstrecke verschiedener Apoptosewege darstellt, bietet die Hemmung der Caspasen auf molekularer Ebene einen Ansatz zur Apoptosehemmung.

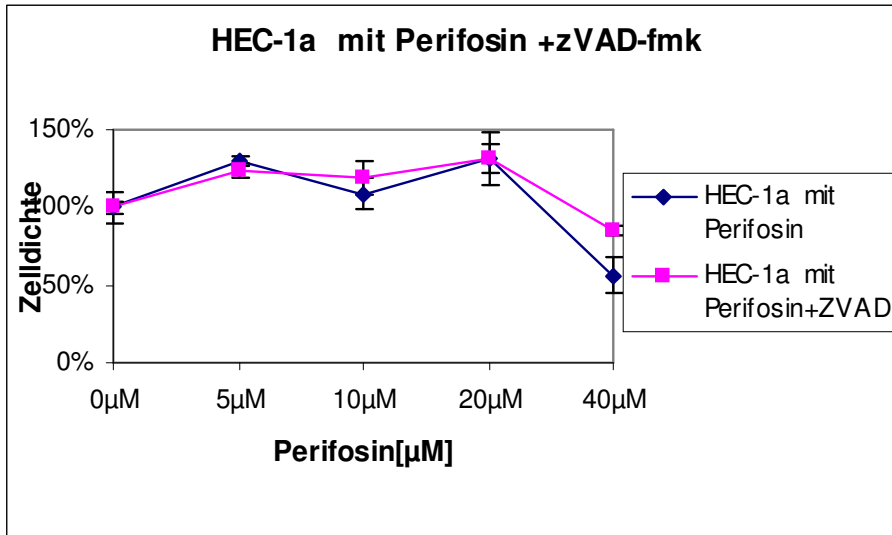
In dieser Arbeit wurde der zellgängige Breitspektrum-Caspasen-Inhibitor zVAD-fmk (Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon) verwendet. In vitro konnte in menschlichen wie tierischen Zellversuchen sowohl die spontane als auch unterschiedlich induzierte Apoptose durch zVAD-fmk verhindert oder zumindest vermindert werden.

Nach Zugabe von zVAD-fmk (50μM) wurden die Zellen im Brutschrank für eine Stunde vorinkubiert, um der Substanz ausreichend Zeit zu geben, in die Zellen zu diffundieren. Danach folgte die Behandlung mit 10μM, 20μM und 40μM Perifosin mit anschließender Inkubation für weitere 48 Stunden. Bei einem Vergleich der

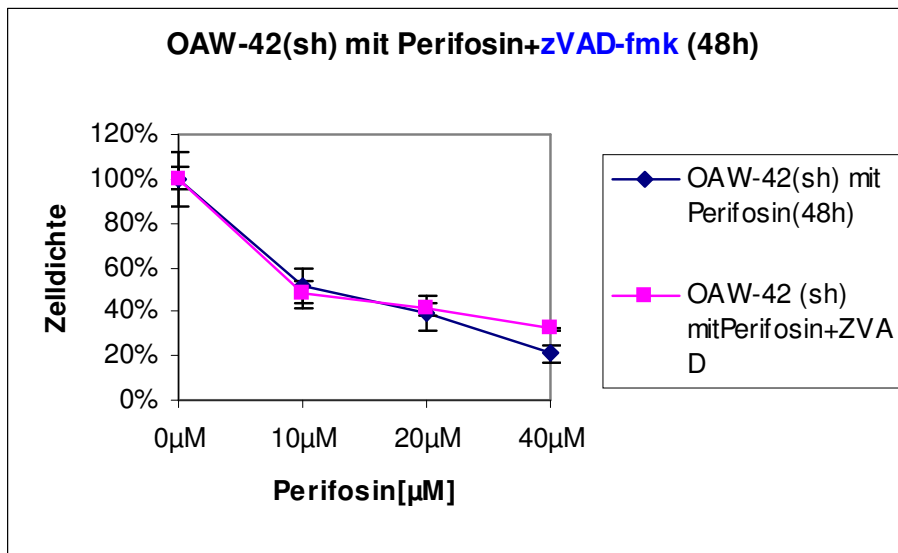
Zelldichte der behandelten und unbehandelten Zellen sieht wurde beobachtet, dass unabhängig von der Caspasen-Inhibition durch zVAD-fmk kein Unterschied bezüglich der Perifosin-induzierten Zytotoxizität vorliegt (Abb.5 a-d).



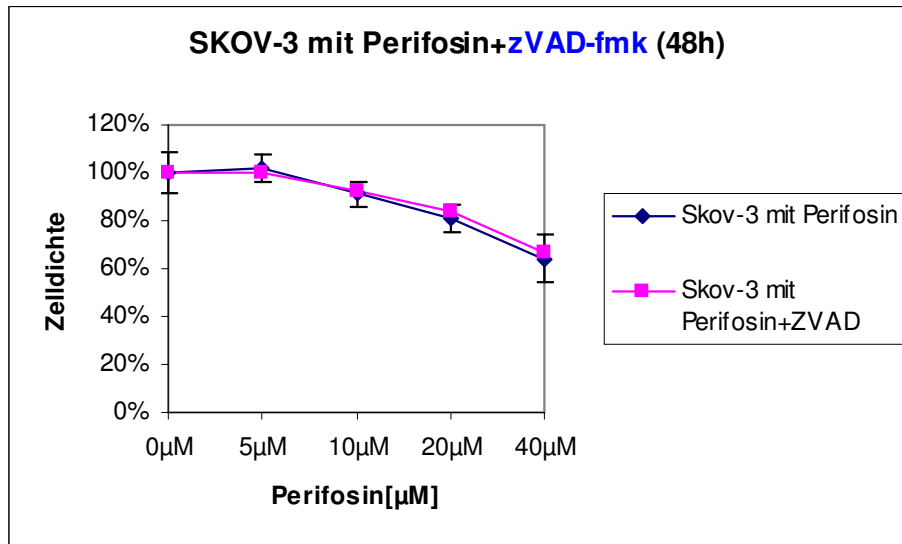
a



b



c



d

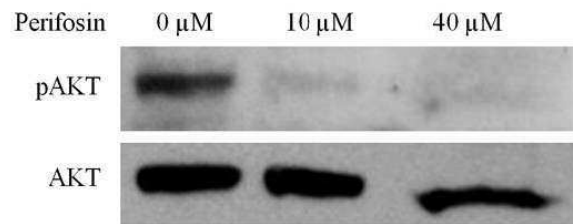
Abb.5 a-d: Darstellung der Kombinationsbehandlung der Zelllinien mit Perifosin und dem multi-Caspasen-Inhibitor zVAD-fmk über 48h. Auswertung mittels Kristallviolettassay.

3.4 Einfluss von Perifosin auf AKT-Phosphorylierung

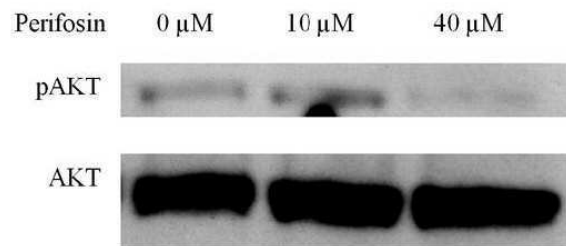
Das Vorhandensein von phosphoryliertem und Gesamt-AKT in Ishikawa-Zellen, die mit 0; 10 und 40μM Perifosin behandelt worden waren, wurde mittels Western-Blot nachgewiesen. Die spezifische AKT-Reaktivität wurde als Mr= 60 kDA für phosphoryliertes und Gesamt-AKT ermittelt. Phosphoryliertes AKT wurde dosisabhängig verringert durch Behandlung mit Perifosin (Abb.6 a-c).

Fig. 4

a)



b)



c)

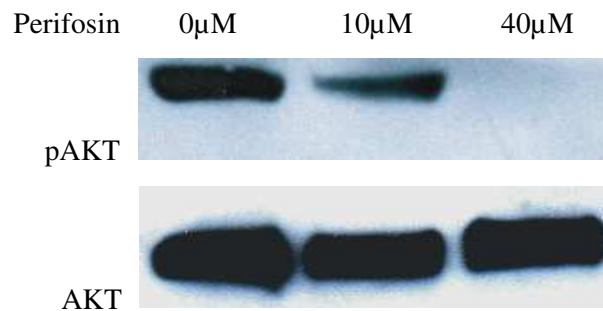
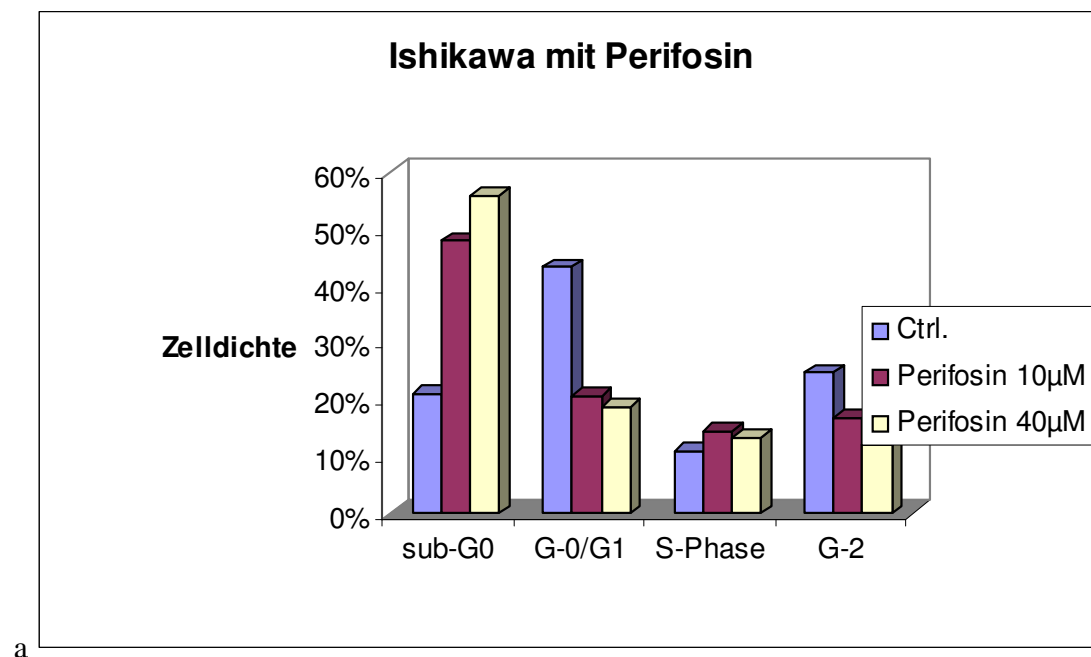


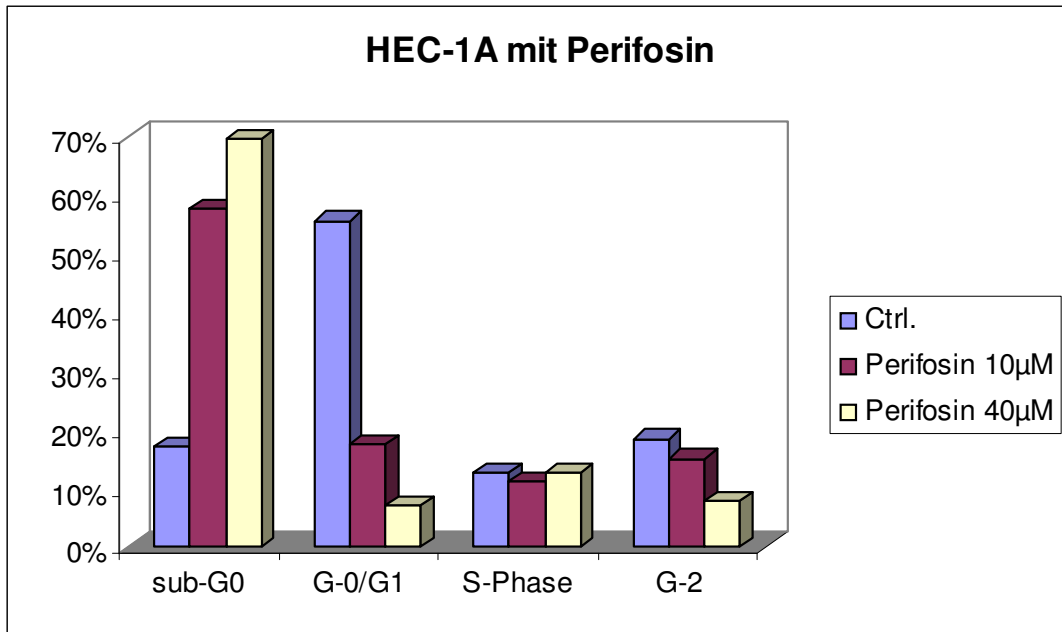
Abb.6 a-c: Effekt von Perifosin auf die Expression von phosphoryliertem AKT in OAW-42- (a), SKOV-3- (b) und Ishikawa-Zellen (c).

Die Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen über 48h kultiviert, danach für 1h mit dem AKT-Inhibitor Perifosin behandelt und anschließend mit 10% FCS restimuliert über 1h. Nach den angegebenen Zeitspannen wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Expressionsintensität von phosphoryliertem und Gesamt-AKT wurde mittels Immunoblotting dargestellt.

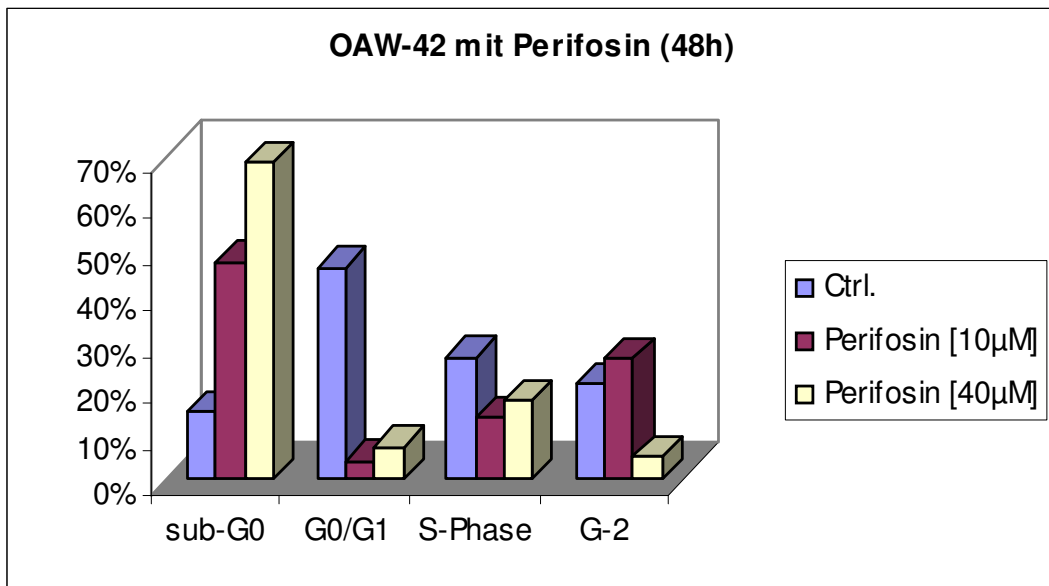
3.5 Zellzyklusanalyse im Durchflusszytometer

Um festzustellen, ob Perifosin das Zellwachstum in einer spezifischen Phase des Zellzyklus blockiert oder eher Zelltod verursacht, wurde eine Durchflusszytometrie-DNA-Zellzyklus-Analyse von Perifosin-behandelten und unbehandelten Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden 48h lang mit Perifosin (10 μ M, 40 μ M) behandelt, in eiskaltem Ethanol für mindestens 20 min fixiert, permeabilisiert, mit Propidiumjodid-RNase A-Lösung gefärbt und innerhalb von 24h mittels Durchflusszytometrie analysiert. Im Rahmen dieses Versuches wurde eine dosis-abhängige Abnahme der Zellzahl in den G₀/G₁, S und G₂ Phasen des Zellzyklus festgestellt, während die Fraktion von hypodiploiden Zellen, die links von der G₀-Zellpopulation (in der subG₀-Phase) erscheinen, begleitend erhöht wurde (Abb.7). Da diese subG₀-Population apoptotische (und nekrotische) Zellen darstellt, kann gefolgert werden, dass Perifosin nicht nur das Wachstum von Endometrium- und Ovarialkarzinomzellen blockiert, sondern auch Karzinomzellen tötet, unabhängig von ihrer gegenwärtigen Position im Zellzyklus. Demgegenüber hatte Perifosin kein Einfluss auf die Zellzyklus-Verteilung von primären humanen peripheren Blutlymphozyten (Abb.7). Daher könnten die zytotoxischen Effekte von Perifosin spezifisch für Tumorzellen sein, während die unerwünschte hämatotoxische Wirkung unwahrscheinlich erscheint.

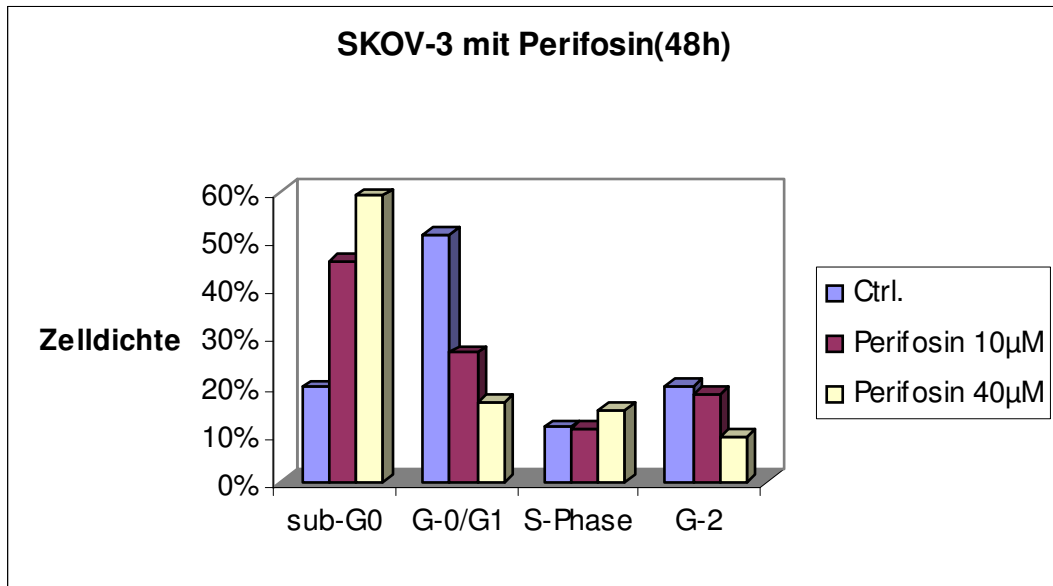




b

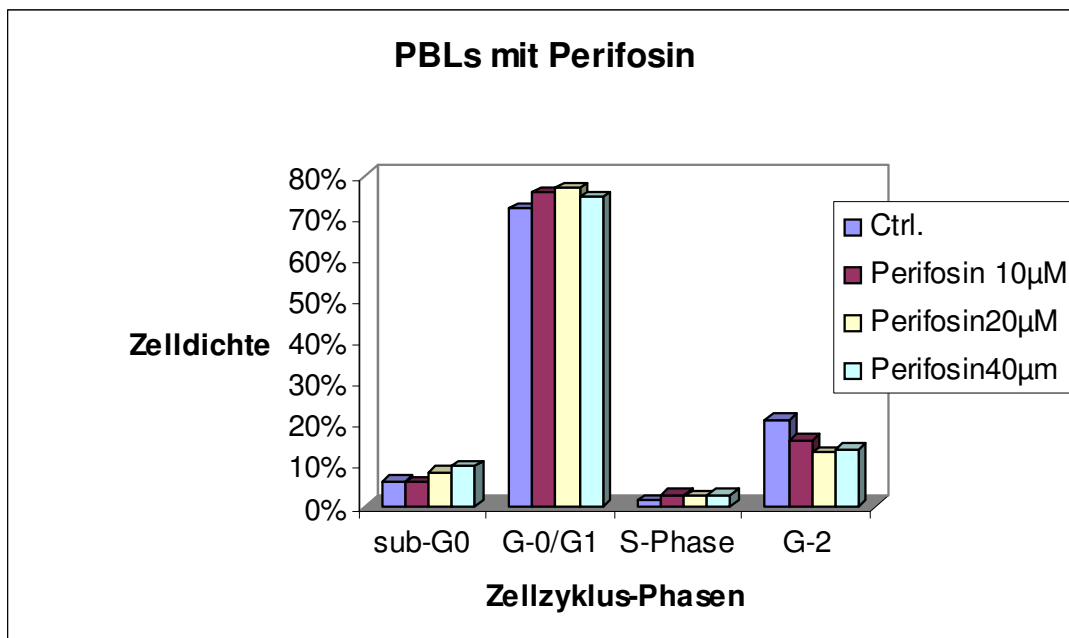


c



d

ee



e

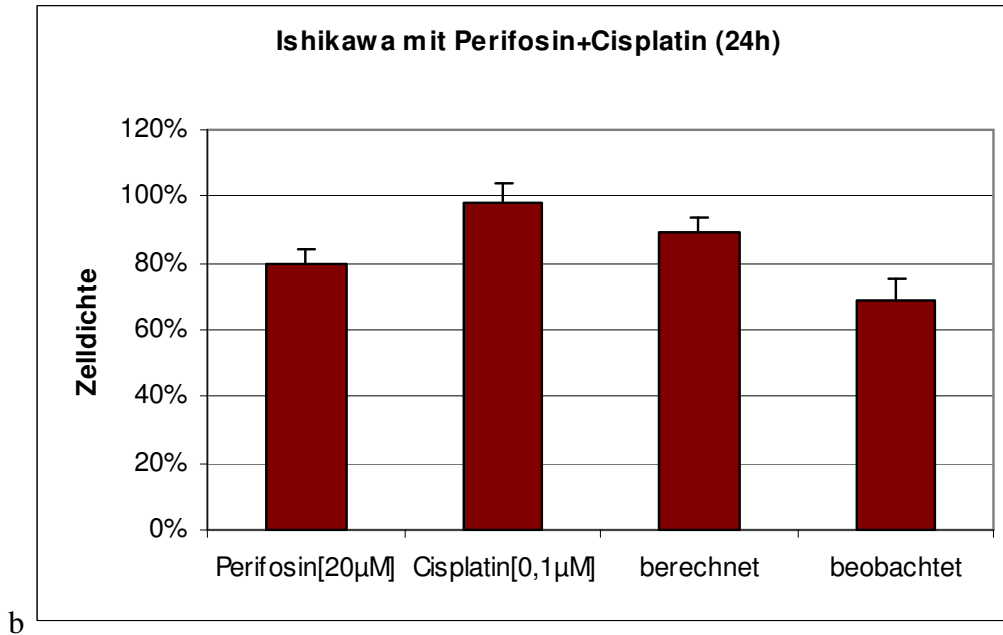
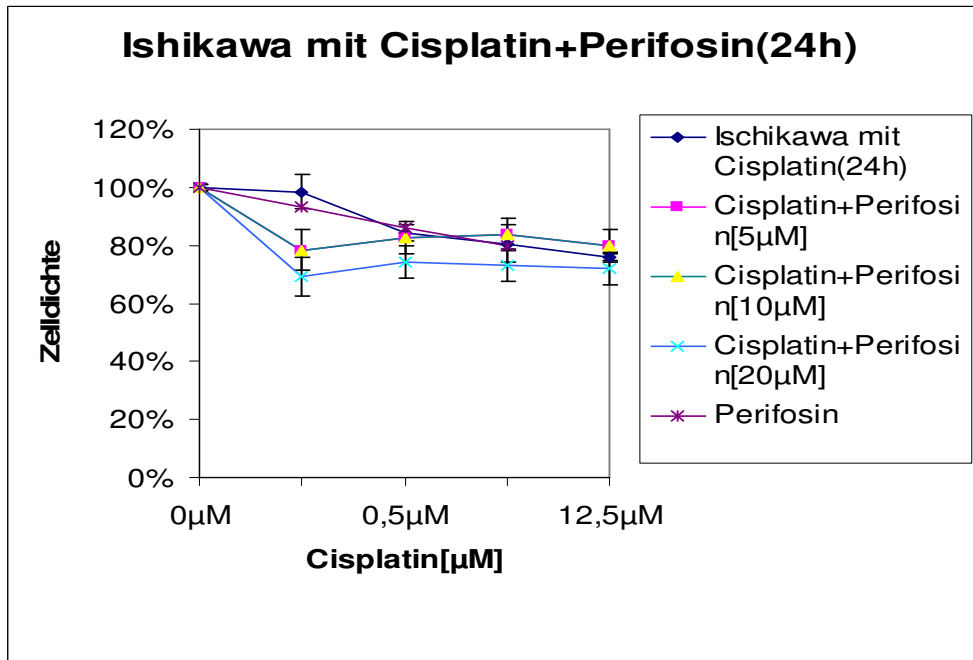
Abb.7 a-e: Darstellung der DNA-Zellzyklus-Analyse von Endometriumkarzinomzelllinien (a,b), Ovarialkarzinomzellen (c,d), und peripheren Blutlymphozyten (PBLs) (e) Die

Abbildung demonstriert die Verteilung der Zellen in verschiedenen Zellzyklus-Phasen [%].

3.6 Additive Effekte von Perifosin und Cisplatin auf Endometrium- und Ovarialkarzinomzellen

Da die vorhergehenden Experimente suggerieren, dass Perifosin ein nützliches Mittel zur Behandlung des humanen Endometrium- und Ovarialkarzinoms sein könnte, wollten wir schliesslich wissen, ob Perifosin den Effekt der gegenwärtigen chemotherapeutischen Protokolle erhöhen könnte. Daher wurden die Endometriumkarzinomzellen Ishikawa und HEC1A mit Cisplatin und verschiedenen Konzentrationen von Perifosin ko-inkubiert. In allen Zelllinien hat Cisplatin in Konzentration 0,1-12,5 μ M keine zytotoxische Aktivität aufgewiesen. Jedoch erhöhte die Kombinationsbehandlung der Ishikawa-Zellen mit Perifosin in Konzentration 20 μ M und 40 μ M die zytotoxische Effekte von Cisplatin erheblich (Abb.8). Dieser additiver Effekt wurde bei HEC1A-Zellen nicht beobachtet.

Bei der Kombinationsbehandlung der OAW-42-Zellen wurde eine ähnliche Erhöhung der Zytotoxizität festgestellt, bei der SKOV-3-Zelllinie kam es zu keinen signifikanten Änderung der antikanzerogenen Aktivität.



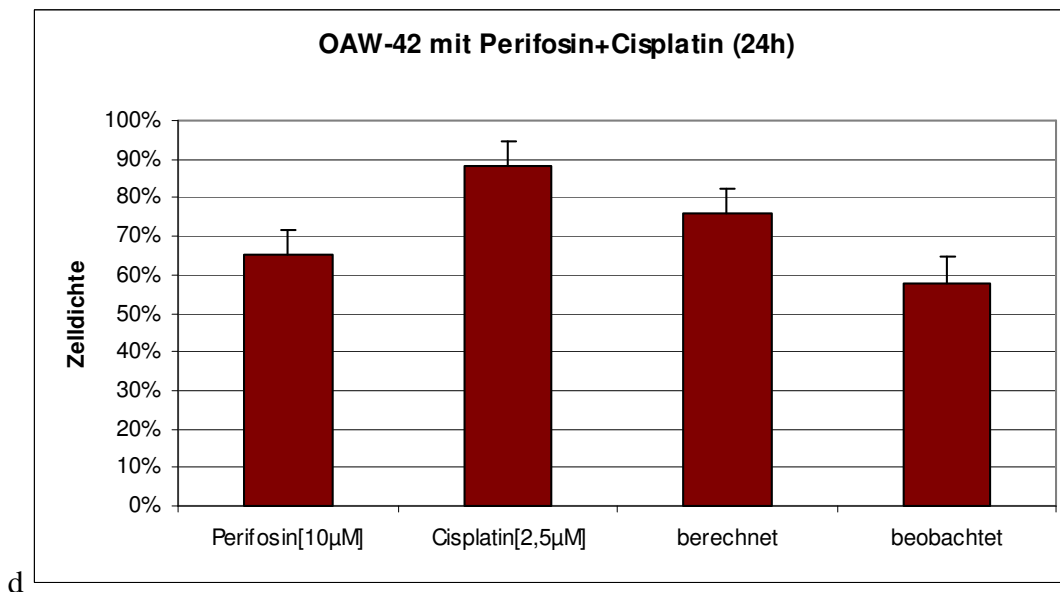
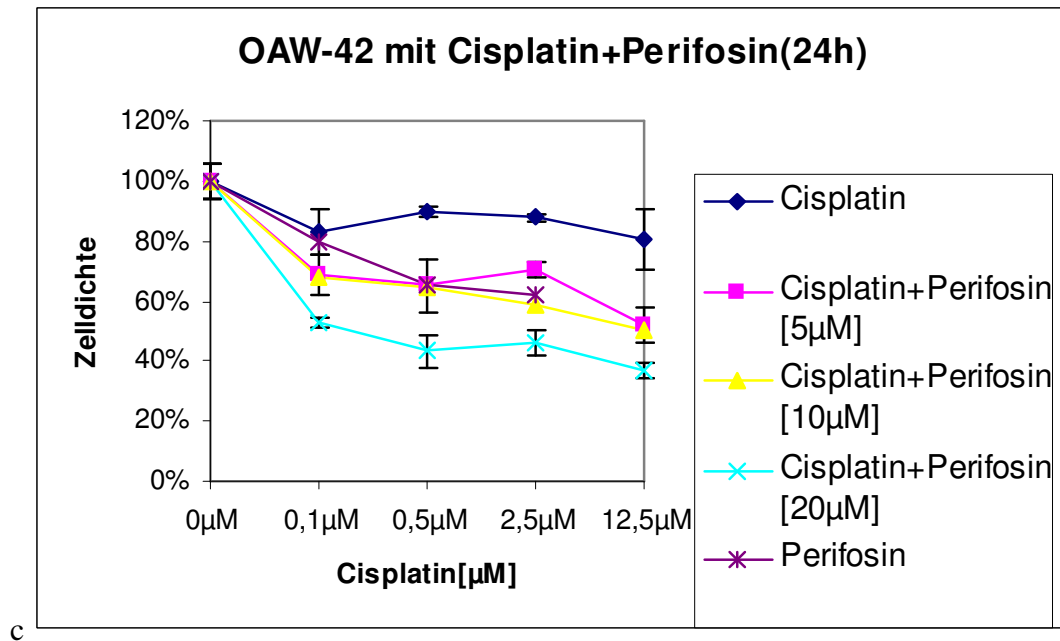


Abb.8 a-d: Verstärkung der antiproliferativen Wirkung durch Kombinationsbehandlung mit Perifosin und Cisplatin in OAW-42 (a,b) und Ishikawa-Zellen (c,d). Den mit Perifosin-vorbehandelten (5μM, 10μM,20μM) und unbehandelten Zellen wurde Cisplatin hinzugegeben und die Zellen wurden weitere 24h inkubiert. Der Anteil überlebender Zellen wurde mittels Kristallviolett färbung bestimmt. Die Grafik-Linie, die Monobehandlung mit Perifosin darstellt, setzt sich aus 3 Punkten zusammen, die den Konzentrationen von 5μM, 10μM und 20μM entsprechen (a,c). In den Abbildungen b und d wurde der erwartete Effekt

nach der *fractional product method* (Referenz z.B. Weinmann, Wischhusen et al, Cell Death & Differentiation 2008) ermittelt und ist als „berechnet“ dargestellt. Die gemessenen Zelldichten nach kombinierter Behandlung mit Perifosin und Cisplatin sind mit „beobachtet“ gekennzeichnet.

4 Diskussion

Das Endometriumkarzinom ist heutzutage das häufigste Genitalmalignom der Frau, mit weltweit ca. 142000 Neuerkrankungen pro Jahr. Dieser Tumor stellt vorwiegend eine Erkrankung des höheren Alters dar, mit steigendem Risiko bei zunehmendem Alter. Das Endometriumkarzinom manifestiert sich bei etwa 80% der Betroffenen in der Postmenopause, mit Erkrankungsgipfel zwischen dem 70-80 Lebensjahr [1,2,10]. 75% der Endometriumkarzinome werden im günstigen Stadium I diagnostiziert und ca. 70% der Patientinnen können von der Erkrankung mittels Operation definitiv geheilt werden. Hingegen stellen die Patientinnen mit prognostisch ungünstigen Hochrisiko-Parametern ein Problem dar, für das keinerlei Standards existieren. Während die Hormontherapie sich als unbefriedigend erwiesen hat, zeigt die Strahlentherapie eine gute lokale Tumorkontrolle, verhindert aber die Fernmetastasen nicht und hat keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben. [1,9,17,18]. Lange Zeit bestand beim Endometriumkarzinom Unsicherheit in der Frage, ob eine Kombinationschemotherapie einer Monotherapie überlegen sei. Mehrere randomisierte Studien haben im direkten Vergleich versucht, die Wirksamkeit zu belegen. Doxorubicin mono versus Doxorubicin plus Cisplatin erbrachte einen signifikanten Vorteil für die Kombination bezüglich der Ansprechraten, der Einfluss auf das Gesamtüberleben war jedoch weniger ausgeprägt [2, 110]. Durch eine Dreifachkombination von Paclitaxel, Cisplatin und Doxorubicin konnte ein längeres progressionfreies Überleben und erhöhtes Gesamtüberleben erreicht werden, dies resultiert aber in einer Verschlechterung des Toxizitätsprofils, die für die meisten Patientinnen mit fortgeschrittenem oder metastasiertem Endometriumkarzinom in Anbetracht ihres höheren Alters und der entsprechenden Ko-Morbiditäten von großer Bedeutung ist.

Da man heutzutage wenn möglich zunächst eine Kombinationschemotherapie bevorzugen wird, stellt sich die Indikation für eine Monochemotherapie meistens in der reinen Palliation bei bereits vorbehandelten Patienten. Bei den Monochemotherapien sind die wirksamsten Einzelsubstanzen Carbo- und Cisplatin, Epi- und Doxorubicin sowie Paclitaxel. Alle diese Substanzen weisen erhebliche Nebenwirkungen auf, wie z. B. Nephro- und Neurotoxizität und gastrointestinale Beschwerden.

Aufgrund bisheriger unbefriedigender Ergebnisse wird intensiv nach neuen

Therapiemodalitäten in der Behandlung der Hochrisiko-Endometriumkarzinome gesucht, die als Typ-II des Endometriumcarcinoms bezeichnet sind. Der Typ II des Endometriumcarcinoms ist histologisch meistens niedrig differenziert (serös-papillär oder klarzellig), exprimiert selten Estrogen- und Progesteronrezeptoren und hat eine schlechte Prognose [115].

Eine weitere Herausforderung für die gynäkologische Onkologie stellt nach wie vor das Ovarialkarzinom dar. Mit der jährlichen Inzidenz und Mortalität von 23 bzw. 14,5 pro 100000 Frauen weist das Ovarialkarzinom die höchste Mortalität unter der gynäkologischen Tumoren in Deutschland auf [30]. Durch fehlende effektive Screeningmethoden und den zumeist klinisch unauffälligen Verlauf der früheren Stadien sind ca. 75% der Fälle zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schon im fortgeschrittenen Stadium [31,32].

Die Standardtherapie von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom besteht in einer maximalen chirurgischen Zytoreduktion mit dem Ziel, alle sichtbaren Tumormassen zu entfernen [41]. Nach optimalem Debulking erfolgt eine Standardtherapie mit 6 Zyklen Carboplatin in Kombination mit Paclitaxel [53-55].

Ein Problem im Rahmen der systematischen Behandlung des Ovarialkarzinoms ist die sekundäre Resistenz gegen Platin-Derivate, die bisher als Therapeutika der ersten Wahl bei dieser Erkrankung verwendet werden. Da es unwahrscheinlich ist, dass sowohl für das Endometrium- wie auch für das Ovarialkarzinom weitere bedeutende Fortschritte mittels der gegenwärtigen verfügbaren chemotherapeutischen Substanzen erzielt werden können, ist der Fokus der zukünftigen Forschung auf Substanzen mit neuen Angriffspunkten gerichtet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung einer neuen Substanz auf Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien analysiert.

Perifosin ist ein oral wirkendes Äther-Alkylphospholipid, das die AKT-Phosphorylierung inhibiert. Seine Anwendung wird derzeit bei verschiedenen Krebsarten in mehreren klinischen Phase-II-Studien geprüft [88]. Bis jetzt wurde Perifosin in klinischen Phase-II-Studien bei Patienten mit Brust-, Kopf und Hals-, Prostata-, Pankreastumoren, multiplem Myelom und Weichteilgewebssarkomen untersucht, wo es *in vitro* und *in vivo* antiproliferative Aktivität zeigte [80-87]. Die Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Untersuchungen demonstrieren eine behandlungsdauer- und dosisabhängige antikanzerogene Aktivität dieser Substanz in verschiedenen

Zelllinien. So kam es z.B. bei allen untersuchten Kopf- und Halstumorzelllinien zur dosisabhängigen Wachstumshemmung unter Perifosin-Behandlung, mit IC50-Werten zwischen 0,6-8,9µM [84]. Prostatakarzinom-Zellen waren noch empfindlicher, die IC50-Werte betragen für manche Zelllinien bei 24h-Behandlungsdauer 5µM. 48h Behandlung mit 5µM Perifosin ruft 100%-Zelltod hervor [85]. Die wachstumshemmende Wirkung von Perifosin auf Zelllinien des Multiplen Myeloms (MM) wurde mit zunehmender Behandlungsdauer und Konzentration immer ausgeprägter und die IC50-Werte lagen bei 12,5µM nach 48h-Behandlung. Die Zellzyklus-Analyse der MM-Zellen zeigte eine Zunahme der Zellpopulation in der sub-G₀-Phase des Zellzyklus, was als Zunahme der Fraktion apoptotischer Zellen interpretiert werden kann [82]. Alle oben genannten Tumorzellen wurden mittels Western-Blot untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine dosis- und behandlungsdauerabhängige Inhibition der AKT-Phosphorylierung unter der Perifosin-Behandlung [80-87]. So ruft z.B. die Behandlung von Prostatakarzinomzellen mit 5µM Perifosin schon nach 30 min eine komplette Hemmung der AKT-Phosphorylierung (Ser473 und Thr308) hervor [85]. Bei den Zelllinien des multiplen Myeloms, die für 0,5 bis 6h mit 10µM Perifosin behandelt wurden, kam es ebenso zur signifikanten Inhibition der AKT-Phosphorylierung [82], die mit zunehmender Behandlungsdauer immer ausgeprägter wurde.

Perifosin ist in der Lage, verschiedene Schlüsselsignalübertragungswege die im Zusammenhang mit dem Wachstum, der Ausbreitung und dem Überleben von Tumorzellen stehen, zu regulieren. Neue Studien weisen jedoch darauf hin, dass Perifosin den Phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K)/AKT-Signalweg, der in Zusammenhang mit der malignen Transformation (zu der eine gesteigerte Proliferation, Wachstum, Invasivität, Metastasen, Angiogenese und Zellüberleben zählt), steht, zu hemmen, indem es die Zellmembranrekrutierung der AKT-Pleckstrin Homologie-Domäne verhindert [88]. In der Tat können viele Effekte des Perifosins durch gezielte Hemmung der AKT-PI3K-Aktivierung an der Zellmembran erklärt werden. Der PI3K/AKT-Signalweg in Tumoren wird häufig durch genomische Alterationen aktiviert, was den zu einem potentiellen therapeutischen Angriffspunkt macht [89-91].

Ein ungünstiger Prognosefaktor bei dem Endometriumkarzinom [79] ist der Verlust oder die mutationsbedingte Inaktivierung von PTEN, die bei 50% der

Endometriumkarzinome ermittelt wurde [77,78]. Patienten mit einem Verlust der PTEN-Expression gefolgt von AKT-Phosphorylierung sind mit einer schlechten Prognose belastet [79].

Mutationen in PTEN resultieren in einer signifikant-erhöhten AKT-Aktivität. Dies veranlasste uns dazu, den AKT-Inhibitor Perifosin [80,82,92] sowohl in Endometriumkarzinomzellen, die PTEN exprimieren als auch in den Zelllinien, denen PTEN fehlte, zu testen [77,93-95].

Die AKT-Phosphorylierung in den humanen Ishikawa Endometriumkarzinomzellen wurde durch Behandlung mit Perifosin dosisabhängig inhibiert, was mittels Western-Blot demonstriert wurde (Abb.4c). Das Vorhandensein von phosphoryliertem und Gesamt-AKT in Ishikawa-Zellen, die mit 0, 10 und 40 μ M Perifosin behandelt worden waren, wurde mittels Western-Blot nachgewiesen. Die spezifische AKT-Bande wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 60 kDA für phosphoryliertes und Gesamt-AKT beobachtet, was mit den Daten aus der Literatur übereinstimmt. Der Anteil des phosphorylierten AKT wird durch Behandlung mit Perifosin dosisabhängig verringert. In mehreren neueren Studien wurde gezeigt, dass die AKT-Inhibition mit der antiproliferativen Wirkung von Perifosin korreliert. Diese AKT-Signalweg-Blockade resultierte in einer Inhibition der Tumorzellproliferation (Abb.1 e-j), die mit zunehmender Behandlungsdauer ausgeprägter wurde, was darauf hinweist, dass die Antitumoraktivität insbesondere auf einer Unterdrückung von Wachstumssignalen beruht. Während der IC 50-Wert für PTEN-exprimierende HEC1A Zellen [93] bei 72h-Behandlungsdauer ca. 6 μ M betrug, lagen die IC 50-Werte für PTEN-defiziente Ishikawa-Zellen [94,95] bei 1,25 μ M. Wichtig sind die Ergebnisse klinischer Studien, die zeigen, dass tägliche orale Behandlung mit 50-150mg Perifosin einen Plasmaspiegel in mikromolarem Bereich induziert, der eine wesentliche antiproliferative Aktivität aufweist. Die Zellzyklus-Analyse hat gezeigt, dass Perifosin in humanen Endometriumkarzinomzelllinien eher einen Zelltod bewirkt als einen Wachstumsarrest. Das wurde dargestellt durch eine Zunahme der hypodiploiden Zellen, während die Anzahl der Zellen, die sich in anderen Phasen des Zellzyklus befanden, eine vergleichbare dosisabhängige Abnahme nach Perifosin Behandlung aufwies (Abb.7 a-b). Dementsprechend scheint Perifosin die Endometriumkarzinomzellen unabhängig von ihrer gegenwärtigen Phase im Zellzyklus zu töten.

Das Prinzip der Polychemotherapie ist die Kombination zweier oder auch mehrerer Zytostatika aus verschiedenen Klassen, um durch verschiedene Wirkungsmechanismen einen synergistischen Effekt zu erreichen und die Entstehung von Resistenzen zu verhindern. Hier wird auch auf unterschiedliche Toxizitätsspektren geachtet, um eine optimale Dosisintensität der Einzelsubstanzen zu erreichen, die auch in der Kombination möglichst in ihrer optimalen Dosierung eingesetzt werden sollten. Voraussetzung für eine Kombinationschemotherapie ist die nachgewiesene Aktivität jeder Einzelsubstanz bei der entsprechenden Tumorentität [112].

Da die vorhergehenden Experimente nahelegen, dass Perifosin ein nützliches Mittel zur Behandlung des humanen Endometriumkarzinoms sein könnte, wurde untersucht, ob Perifosin den Effekt der gegenwärtigen chemotherapeutischen Protokolle erhöhen könnte.

Die Kombinationsbehandlung von Ishikawa-Zellen mit Perifosin und Cisplatin, einer der wirksamsten und wichtigsten zytostatischen Substanzen, deren Wirkmechanismus in kovalenter Bindung an DNA-Basen, DNA-Intrastrang und DNA-Interstrang-Quervernetzung besteht, demonstrierte eine signifikante Zunahme der zytotoxischen Effekte von Cisplatin. (Abb.8) [112,113].

Auch bei der Behandlung des Ovarialkarzinoms zeigt sich der AKT/PKB-Signalweg als vielversprechender neuer Angriffspunkt, da die AKT-Aktivierung in Ovarialkarzinomzellen antiapoptotische und wachstumsinduzierende Effekte hervorruft [106]. Aus diesem Grund wurde auch die Wirkung des AKT-Inhibitors Perifosins auf Ovarialkarzinomzelllinien untersucht.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsassays demonstrieren, dass Perifosin eine starke antiproliferative Wirkung auf beide getestete Ovarialkarzinomzelllinien aufweist (Abb.3 a-d), wobei die Effekte mit steigender Behandlungsdauer immer ausgeprägter wurden. Die IC₅₀-Werte lagen zwischen 7µM und 30µM. Die Zellzyklus-Analyse hat gezeigt, dass Perifosin in humanen Ovarialkarzinom-Zelllinien einen Zelltod bewirkt. Es wurde ähnlich wie bei den Endometriumkarzinomzelllinien eine Zunahme der hypodiploiden Zellen beobachtet, während die Anzahl der Zellen, die sich in anderen Phasen des Zellzyklus befanden eine ähnliche dosisabhängige Abnahme nach Perifosin Behandlung aufwies (Abb.7 c-d). Dementsprechend scheint Perifosin auch Ovarialkarzinomzellen unabhängig von ihrer gegenwärtigen Phase im Zellzyklus zu

töten.

Bei der Kombinationsbehandlung der Ovarialkarzinomzellen stellte man fest, dass Cisplatin in den beiden untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien in Konzentration 0,1-12,5 μ M keine zytotoxische Aktivität aufgewiesen hat. Jedoch erhöhte die Kombinationsbehandlung der OAW-42-Zellen mit Perifosin in Konzentration 20 μ M und 40 μ M die zytotoxische Effekte von Cisplatin erheblich (Abb.8). Dieser additive Effekt wurde bei der SKOV-3-Zelllinie nicht beobachtet.

Die Tatsache, dass die Perifosin-Spiegel im Plasma behandelter Patientinnen nur niedrigere Konzentrationen erreichen, könnte durch die in Tiermodellen demonstrierte Akkumulation von Perifosin im Tumorgewebe kompensiert werden [97]. So konnten Hennessy et al anhand eines Nude-Mouse-Modell mit humanem SKOV-3 Ovarialkarzinomzellen die antiproliferative Wirksamkeit des Perifosins in vivo nachweisen, was die klinische Relevanz unserer Feststellungen noch deutlicher zeigt.

Eine Zellzyklus-Analyse demonstrierte auch, dass periphere Blutlymphozyten nach der Behandlung mit Perifosin-Konzentrationen bis zu 40 μ M vollständig unberührt blieben, was in Übereinstimmung mit mehreren Phase I und II Studien ein annehmbares Sicherheits- und Verträglichkeitsprofil des Perifosins nahe legt [98-101]. Da der AKT-Signalweg stark mit dem Zellüberleben verbunden ist [102] und da von Perifosin bekannt ist, dass es in verschiedenen experimentellen Tumorsystemen Apoptose induziert [96,103], haben wir den Effekt einer Kombinationsbehandlung des multi-caspase-Inhibitors zVAD-fmk mit Perifosin untersucht. Überraschenderweise konnte der Zelltod durch zVAD-fmk nicht gehemmt werden (Abb.5 a-d). Dieses Ergebnis könnte damit zusammenhängen, dass der Zelltod durch alternative Signalwege (Necroptose) vermittelt werden kann. So induzierte in Gliomzellen eine Behandlung mit Alkylphosphocholinen, die strukturell mit Perifosin verwandt sind, trotz zVAD-fmk-Kombinationsbehandlung programmierten Zelltod mit verschiedenen apoptose-ähnlichen Markern [104]. Zusätzlich wurde der Zelltod durch andere Faktoren als Caspasen-Aktivierung oder Cytochrom C-Freisetzung induziert, sodass die fehlende Wirksamkeit des Caspasen-Inhibitors zVAD-fmk Behandlung nicht allzu überraschend ist [105].

Aufgrund seines neuartigen Wirkungsmechanismus und der Vermeidung einer dosis-limitierenden Myelosuppression scheint Perifosin für den Einsatz in der Kombinationstherapie mit klassischen Platin-Derivaten gut geeignet zu sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Behandlung der Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen mit Perifosin eine Inhibition der AKT-Phosphorylierung und eine damit verbundene Hemmung der Zellproliferation hervorruft. In PTEN-defizienten Zellen, die mutmaßlich eine stärkere konstitutive AKT-Aktivität aufweisen, waren die zytostatischen Effekte von Perifosin stärker ausgeprägt. In allen Zelllinien wurde gezeigt, dass der Zelltod unabhängig von einer Inhibition der Caspasen erfolgen kann [116].

Die Kombinationsbehandlung von Ishikawa- und OAW-42-Zelllinien mit Perifosin und Cisplatin demonstrierte additive Effekte. Daher scheint Perifosin ein guter Kandidat für eine Phase II Studie bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Endometrium- und Ovarialkarzinomen zu sein und zwar sowohl als Monopräparat als auch in Kombination mit Platin-Derivaten.

5 Zusammenfassung

Aufgrund bislang unbefriedigender Ergebnisse wird intensiv nach neuen Therapiemodalitäten in der Behandlung der Hochrisiko-Endometriumkarzinome gesucht, die als Typ-II des Endometriumkarzinome bezeichnet werden. Die bekannten Chemotherapien sind allesamt palliativ, und die beobachtete Wirkung ist meist von kurzer Dauer und oft nur partiell. Eine weitere Herausforderung für die gynäkologische Onkologie stellt nach wie vor das Ovarialkarzinom dar. Mit der jährlichen Inzidenz und Mortalität von 23 bzw. 14,5 pro 100000 Frauen weist das Ovarialkarzinom die höchste Mortalität unter den gynäkologischen Tumoren in Deutschland auf. Durch fehlende effektive Screeningmethoden und den zumeist klinisch unauffälligen Verlauf der früheren Stadien sind ca. 75% der Fälle zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schon im fortgeschrittenen Stadium. Ein Problem im Rahmen der systematischen Behandlung des Ovarialkarzinoms ist die sekundäre Resistenz gegen Platin-Derivate, die bisher als Therapeutika der ersten Wahl bei dieser Erkrankung verwendet werden.

Da es unwahrscheinlich ist, dass sowohl für das Endometrium- als auch für das Ovarialkarzinom weitere bedeutende Fortschritte mittels der gegenwärtigen verfügbaren chemotherapeutischen Substanzen erzielt werden können, ist der Fokus der zukünftigen Forschung auf Substanzen mit neuen Angriffspunkten gerichtet.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, Perifosin *in vitro* auf seine potentielle antiproliferative und zytotoxische Aktivität gegenüber humanen Endometrium- und Ovarialkarzinomzellen zu untersuchen. Dabei wurde Perifosin sowohl alleine als auch in Kombination mit anderen etablierten Chemotherapeutika verwendet.

Perifosin ist ein oral wirkendes Äther-Alkylphospholipid, das die AKT-Phosphorylierung inhibiert. Seine Anwendung wird derzeit bei verschiedenen Krebsarten in mehreren klinischen Phase-II-Studien geprüft. Bis jetzt wurde Perifosin in klinischen Phase-II-Studien bei Patienten mit Brust-, Kopf und Hals-, Prostata-, Pankreastumoren, multiplem Myelom und Weichteilgewebssarkomen untersucht, wo es *in vitro* und *in vivo* antiproliferative Aktivität zeigte. Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessungen zeigen eine behandlungsdauer- und dosisabhängige antikanzerogene Aktivität dieser Substanz in mehreren Zelllinien. Perifosin ist in der Lage verschiedene Schlüsselsignalübertragungswege, die im Zusammenhang mit dem Wachstum, der Ausbreitung und dem Überleben von Tumorzellen stehen, zu regulieren. Neue Studien weisen jedoch darauf hin, dass Perifosin den in vielen Tumoren aktivierten Phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K)/AKT-Signalweg hemmt, indem es die Rekrutierung der AKT-Pleckstrin Homologie-Domäne an die Zellmembran verhindert. So können viele Effekte des Perifosins durch Inhibition der membranständigen AKT-Aktivität erklärt werden.

Die AKT-Phosphorylierung in den humanen Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen wurde durch Behandlung mit Perifosin dosisabhängig inhibiert, was mittels Western Blot demonstriert wurde.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsassays zeigen, dass Perifosin eine starke antiproliferative Wirkung auf die getesteten Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien aufweist, wobei die Effekte mit steigender Behandlungsdauer immer ausgeprägter wurden.

Die Zellzyklus-Analyse hat gezeigt, dass Perifosin in humanen Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien eher einen Zelltod als einen Wachstumsarrest bewirkt. Das äußerte sich in einer Zunahme der hypodiploiden Zellen, während sich die Anzahl der Zellen in anderen Phasen des Zellzyklus nach Perifosin Behandlung gleichmäßig und dosisabhängig verringerte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Behandlung von Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen mit Perifosin eine Inhibition der AKT-Phosphorylierung

und eine damit verbundene Hemmung der Zellproliferation und -viabilität hervorruft. In PTEN-defizienten Zellen, die mutmaßlich eine stärkere konstitutive AKT-Aktivität aufweisen, waren die zytostatischen Effekte von Perifosin stärker ausgeprägt. In allen Zelllinien wurde gezeigt, dass der Zelltod unabhängig von einer Inhibition der Caspasen erfolgen kann.

Die Kombinationsbehandlung von Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien mit Perifosin und Cisplatin demonstrierte additive Effekte. Daher scheint Perifosin ein guter Kandidat für eine Phase II Studie bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Endometrium- und Ovarialkarzinomen zu sein und zwar sowohl als Monopräparat als auch in Kombination mit Platin-Derivaten.

6 Literaturverzeichnis

- 1 AWMF Leitlinien-Register NR. 032/034: Endometriumkarzinom In.: Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien 2006
- 2 Strauber, M., Weyerstahl, T. (Hsgb.): Gynäkologie und Geburtshilfe. 3.Aufl., Thiem, Stuttgart 2007
- 3 Hanf, V., Günter, A.R., Hawighorst, T., Emons, G (2004). Endometriumkarzinom, Gynäkologie, 37: 907-915
- 4 Cohn, D.E., Horowitz, N.S., Mutch, D.G. et al. (2002): Should the presence of lymphovascular space involvement be used to assign patients to adjuvant therapy following hysterectomy for unstaged endometrial cancer? Gynecol Oncol 87:243-246
- 5 Shumsky, A.G., Brasher, P.M., Stuart, G.C. et al. (1997): Risk-specific flow-up for endometrial carcinoma patients. Gynecol Oncol 65 (3): 379-382
- 6 Partridge, E.E., Shingleton, H.M., Menck, H.R. (1996). The National Cancer Data Base report on endometrial cancer. J Surg Oncol 61:111-123
- 7 Blythe, J.G., Edwards, E., Heimbecker, P. (1997). Paraaortic lymph node biopsy: a twenty-year study. Am J Obstet Gynecol 176:1157-1165
- 8 Nag, S. (1996). Modern techniques of radiation therapy for endometrial cancer. Clin Obstet Gynecol 39 (3): 728-744
- 9 Emons, G., Günthert, A., Hawighorst, T., Hanf, V. (2003). Endokrine Therapie des Endometriumkarzinoms und seiner Präkanzerosen. Onkologie 9:1234-1240
- 10 Amant, F., Moerman, P., Noven, P., Timmeran, D., Van Limbergen, E., Vergote, I: Endometrial cancer, Lancet 2005, 366:491-505
- 11 Creasman, W.T: Endometrial cancer: incidence, prognostic factors, diagnosis and treatment, Semin Oncol 1997, 24:140-150
- 12 Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland: Krebs in Deutschland-, Häufigkeiten und Trends. Edited by 3. erweiterte aA. Saarbrücken, 2002
- 13 Kaufman, M.C.S., Scharl, A.: Die Gynäkologie. Edited by Berlin, Springer-Verlag, 2002
- 14 Blumenfeld, M.L., Turner, L.P.: Role of transvaginal sonography in the

- evaluation of endometrial hyperplasia and cancer, *Clin Obstet Gynecol* 1996, 39:641-655
- 15 Lax, S.F.P.E., Ronnett, B.M., Kurman, R.J.: Comparison of estrogen and progesterone receptor, Ki-67, and p53 immunoreactivity in uterine endometrioid carcinoma and endometrioid carcinoma with squamous, mucinous, secretory and ciliated cell differentiation, *Hum Pathol.* 1998 Sep;29(9):924-931
 - 16 Kimmig, R. K., Höß, C., Kolben, M., Straub, J.: Malignome des Corpus uteri.
 - 17 Morrow, C.P., Bundy, B.N., Homesley, H.D., Creasman, W.T., Hornback, N.B., Kurman, R., Thigpen, J.T.: Doxorubicin as an adjuvant following surgery and radiation therapy in patients with high-risk endometrial carcinoma, stage I and occult stage II: a Gynecologic Oncology Group Study, *Gynecol Oncol* 1990, 36:166-171
 - 18 Martin-Hirsch, P.L., Jarvis, G., Kitchener, H., Lilford, R.: Progestagens for endometrial cancer, *Cochrane Database Syst Rev* 2000, CD001040
 - 19 Randall, M.E., Filiaci, V.L., Muss, H., Spirtos, N.M., Mannel, R.S., Fowler, J., Thigpen, J.T., Benda, J.A.: Randomized phase III trial of whole-abdominal irradiation versus doxorubicin and cisplatin chemotherapy in adjuvanted endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study, *J Clin Oncol* 2006, 24:36-44
 - 20 Vaidya, A.P., Littell, R., Krasner, C., Duska, L.R: Treatment of uterine papillary serous carcinoma with platinum-based chemotherapy and paclitaxel, *Int J Gynecol Cancer* 2006, 16 Suppl 1:267-272
 - 21 Loning, T., Reusch, U., Thomssen, C.: [Algorithm of clinical aspects and pathology of endometrial carcinoma], *Pathology* 1999, 20:63-71
 - 22 Tiffen, J.M., Mahon, S.M.: Educating women regarding the early detection of endometrial cancer-what is the evidence? *Clin J Oncol Nurs* 2006, 10:102-104
 - 23 Christopherson, W.M., Connelly, P.J., Alberhasky, R.C.: Carcinoma of the endometrium. V. An analysis of prognosticators in patients with favorable subtypes and Stage I disease, *Cancer* 1983, 51:1705-1709
 - 24 Dvalishvili, I., Charkviani, L., Turashvili, G., Burkadze, G.: Clinical characteristics of prognostic factors in uterine endometrioid adenocarcinoma of various grade, *Georgian Med News* 2006, 24-27

- 25 Schenker, J.G., Tal, J.: Adenocarcinoma of the endometrium in Israel, 1960-1968, *Cancer* 1980, 46:2752-2758
- 26 Christopherson, W.M., Alberhasky, R.C., Connelly, P.J.: Carcinoma of the endometrium. II. Papillary adenocarcinoma: a clinical pathological study, 46 cases, *Am J Clin Pathol* 1982, 77:534-540
- 27 Abeler, V.M., Kjorstad, K.E.: Endometrial adenocarcinoma with squamous cell differentiation, *Cancer* 1992, 69:488-495
- 28 Grulich, D., Hagen, A., Morack, G.: [Prognostic factors and results of treatment in endometrial carcinoma], *Zentralbl Gynecol* 1996, 118:154-163
- 29 Bellino, R., Arisio, R., D'Addato, F., Alba, E., Attini, R., Colla, F., Leotta, E., Tersiev, P., Griro, R.: Pathologic Features of endometrial carcinoma in elderly women, *Anticancer Res* 2001, 21:3721-3724
- 30 Arbeitsgemeinschaft (2004). Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland-Häufigkeiten und Trends. Saarbrücken. 4.Ausgabe.
- 31 Holschneider, C.H., Berek, J.S. (2000). Ovarian cancer: epidemiology, biology and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 19(1): 3-10
- 32 Runnebaum, I.B., Stickeler, E. (2001). Epidemiological and molecular aspects of ovarian cancer risk. *J Cancer Res Clin Oncol* 127(2):73-79
- 33 Antoniou, A., Pharoah, P.D., et al.: Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *AM J Hum Genet* 72(5): 1117-11130
- 34 Narod, S.A., Risch, H., et al.. (1998). Oral contraceptions and the risk of hereditary ovarian cancer. Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group. *N Engl J Med* 339(7): 424-428
- 35 Rosen, B., Kwon, J., et al. (2004). Systematic review of management options for women with a hereditary predisposition to ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 93(2): 280-286
- 36 Trope, C. (1998). Prognostic factors in ovarian cancer. *Cancer Treat Res* 95: 287-352
- 37 Köchli, O.R. (1994). Ovarialkarzinom- Screening, Therapie und Follow-up. *Gynakol Geburtshilfe Rundsch* 34: 123-129

- 38 AGO-Richtlinien (2004)
- 39 Gore, M. (2001). Treatment of relapsed epithelial ovarian cancer. American Society of Clinical Oncology.
- 40 Thigpen, T., Brady, M.F., et al. (1993). Age as a prognostic factor in ovarian carcinoma. The Gynecologic oncology Group experience. *Cancer* 71(2 Suppl): 606-614
- 41 Kuhn, W., Rutke, S., et al. (2001). Neoadjuvant chemotherapy followed by tumor debulking prolongs survival for patients with poor prognosis in International Federation of Gynecology and Obstetrics Stage IIIc ovarian carcinoma. *Cancer* 92(10): 2585-2591
- 42 Tingulstad, S., Skjeldestad, F.E., et al. (2003). Survival and prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 101(5 Pt1): 885-891
- 43 Van der Burg, M.E. (2001). Advanced ovarian cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2(2): 109-118
- 44 See, H.T., Kavanagh, J.J. (2004). Novel agents in epithelial ovarian cancer. *Cancer Invest* 22 Suppl 2: 29-44
- 45 Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference [GCIG OCCC], 2004
- 46 Kuhn, W. (2003). Therapy for recurrent ovarian cancer. *Curr Womens Health Rep* 3: 33-38
- 47 Schelling, M., Braun, M., Kuhr, W.A., et al.: Combined transvaginal B-mode and Color Doppler sonography for diagnosis of ovarian tumors: results of a multivariate logistic regression analysis. *Gynecol Oncol* 2000. 77: 78-86
- 48 Franchi, M., Beretta, P., Ghezzi, F. Diagnosis of pelvic masses with transabdominal Color Doppler, CA125 and ultrasonography. *Acta Obstet Gynecol Scand* (1995) 74(9): 734-739
- 49 Forstner, R., Hricak, H., White, S. CT and MRI of ovarian cancer. *Abdom imaging*. (1995). 20(1): 2-8
- 50 Tavassoli, F.A., Devilee, P. (Eds). World Health Organisation of Tumours. Pathology & Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IA RC Press: Lyon 2003
- 51 Rerbrat, P., Lhomme, C., Fervers, B., Guastalla, J.P., Thomas, L., Tournemaine, N., et al. Ovarian cancer. *Br. J. Cancer*.(2001) 84(Supp 2): 18-

- 52 Morgan, R.J., Copeland, L., Gershenson, D., Locker, G., McIntosh, D., Ozols, R.F. and et al. NCCN Ovarian Cancer Practice Guidelines Oncology (Huntingt) 1996. 10: 293-310
- 53 Du Bois, A., Lück, H.J., Meier, W., Adams, H.P., Möbus, V., Costa, S., Bauknecht, T., Richter, B, Warm, M., Schröder, W., Olbricht, S., Nitz, U., Jackisch, C., Emons, G., Wagner, U., Kuhn, W., Pfisterer, J. (2003). A randomized clinical trial of Cisplatin/Paclitaxel versus Carboplatin/Paclitaxel as a first-line treatment of ovarian cancer . J Nat Cancer Inst. 95: 1320-1329
- 54 Neijt, J.P., Engelholm, S.A., Tuxen, M.K., Sorensen, P.G., Hansen, M., Sessa, C., de Swart, C.A., Hirsch, F.R., Lund, B., van Houwelingen, H.C. Exploratory phase III study of paclitaxel and cisplatin versus paclitaxel and carboplatin in advanced ovarian cancer. J Clin Oncol 2000. 18: 3084-3092
- 55 Ozols, R.F., Bundy, B.N., Greer, B.E., Fowler, J.M., Clarke-Pearson, D., Burger, R.A., Mannel, R.S., De Geest, K., Hartenbach, E.M., Baergen, R. Phase III Trial of Carboplatin and Paclitaxel compared with Cisplatin and Paclitaxel in patients with optimally resected stade III Ovarian Cancer. A Gynecologic Oncology Group Study. J Clin Oncol (2003). 21: 3194-3200
- 56 Ten Bakkel Huinink, W., Gore, M., Carmichael, J., et al. Topotecan versus Paclitaxel fort he treatment of recurrent epithelial ovarian cancer . J Clin Oncol (1997) 15: 2183-2193
- 57 Creemers, G.J., Bolis, G., Gore, M. et al. (1996). Topotecan an active drug in the secondline treatment of epithelial ovarian cancer: A highly active regiment. Proc Am Soc Clin Oncol (1996). (abstr775). 15:2858
- 58 Gordon, A.N., Fleagle, J.T., Guthrie, D. et al. Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegulated liposomal doxorubicin versus topotecan. J Clin Oncol (2001): 19(14): 3312-3322
- 59 Meier, W., Du Bois, A., Kuhn, W. et al. (2003). Topotecan versus treosulfan in recurrent ovarian cancer after initial therapy with platinum and paclitaxel. A prospective randomized phase III study. Proc Am Soc Clin Oncol . (abstr1810). 22: 450
- 60 Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften AWMF. Interdisziplinäre kurz gefasste Leitlinien der Deutschen

- Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe. Maligne Ovarialtumoren. 2001: AWMF-Leitlinien Register Nr. 032/035
- 61 Beckmann, M., Minkwitz von Get. et al. (2003). Stellungnahme der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO): Nachsorge beim Mammakarzinom und bei gynäkologischen Malignomen-to follow-up or not to follow up. *Geburtsch Frauenheilk.* 2003; 63: 725-730
- 62 Holliday, R. (1996) Neoplastic transformation: the contrasting stability of human and mouse cells. *Cancer Surv*, 28: 103-115
- 63 Couch, D.B. (1996) carcinogenesis: basic principles. *Drug Chem Toxicol*, 19: 133-148
- 64 Fiorini, M., Alimandi, M., Fiorentino, L., Sala, G. and Segatto, O. (2001). Negative regulation of receptor tyrosine kinase signals. *FEBS Lett*, 490: 132-141
- 65 Gullick, W.J. (1998) Type I growth factor receptors: current status and future work. *Biochem. Soc. Symp.* 63: 193-198
- 66 Schlessinger, J. and Lemmon, M.A. (2003). SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci STLE*, RE12
- 67 Daly, R.J. (1999). Take yoer partners, please—signal diversification by the erbB family of receptor tyrosine kinases *Growth Factors*. 16: 255-263
- 68 Prenzel, N., Fischer, O.M., Streit, S., Hart, S. and Ullrich, A. (2001). The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 8: 11-31
- 69 Andjelkovic, M., Alessi, D.R., Meier, R., Lamb, N.J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Hemmings, B.A. (1997). Role of translocation in the activation and function of the proteinkinase B. *J Biol Chem.* 272: 31515-31524
- 70 Brunet, A., Bonni, A., Zigmund, M.J., Lin, M.Z., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857-868
- 71 Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282: 1318-1321

- 72 Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of Glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378: 785-789
- 73 Sako, Y., Minoghchi, S., Yanagida, T. (2000). Single-molecule imaging of EGFR signaling on the surface of living cells. *Nat. Cell. Biol.* 2: 168-172
- 74 Schmelze, T., Hall, M.T. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell.* 103: 253-262
- 75 Shima, H., Pende, M., Chen, Y., Fumagalli, S., Thomas, G., Kozma, S. (1998). Disruption of the p70 (s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J.* 17: 6649-6659
- 76 Chow, L.M., Baker, S.J. PTEN function in normal and neoplastic growth. *Cancer Lett* 2006. 241(2): 184-186
- 77 Kanamori, Y., Kigawa, J., Itamochi, H., et al. Corellation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001. 7(4): 892-895
- 78 Tashiro, H., Blazes, M.S., Wu, R., et al. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res* (1997). 57(18): 3935-3940
- 79 Terakawa, N., Kanamori, Y., Yoshida, S. Loss of PTEN expression followed by Akt phosphorylation is a poor prognostic factor for patients with endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer* 2003. 10(2): 203-208
- 80 Kondapaka, S.B., Singh, S.S., Dasmaphapatra, G.P., Sausville, E.A., Roy, K.K. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol Cancer Ther* (2003). 2(11): 1093-1103
- 81 Elrod, H.A., Lin, Y.D., Yue, P., et al. The alkylphospholipid perifosine induced apoptosis of human lung cancer cells requiring inhibition of Akt and activation of the extrinsic apoptotic pathway. *Mol Cancer Ther* (2007). 6(7): 2029-2038
- 82 Hideshima, T., Catley, L., Yasui, H., et al. Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood* (2006). 107(10): 4053-4062
- 83 Leighl, N.B., Dent, S., Clemons, M., et al. A Phase 2 study of perifosine in advanced or metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2007

- 84 Argiris, A., Cohen, E., Karrison, T., et al. A phase II trial of perifosine, an oral alkylphospholipid, in recurrent or metastatic head and neck cancer. *Cancer Biol Ther* (2006) 5(7): 766-770
- 85 Posadas, E.M., Gulley, J., Arlen, P.M., et al. A phase II study of perifosine in androgen independent prostate cancer. *Cancer Biol Ther* (2005). 4(10): 1133-1137
- 86 Marsh Rde, W., Rocha Lima, C.M, Levy, D.E., Mitchell, E.P., Rowland, K.M., Jr., Benson, A.B., 3rd. A phase II trial of perifosine in locally advanced, unresectable, or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Am j Clin Oncol* (2007). 30(1): 26-31
- 87 Bailey, H.H., Mahoney, M.R., Ettinger, D.S., et al. Phase II study of daily oral perifosine in patients with advanced soft tissue sarcoma. *Cancer* 2006. 107(10): 2462-2467
- 88 Kondapaka, S.B., Singh, S.S., Dasmahapatra, G.P., Sausville, E.A., Roy, K.K. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol Cancer Ther* (2003). 2: 1093-1103
- 89 Hennesy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y., Mills, G.B. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* (2005). 4: 988-1004
- 90 Samuels, Y., Velculescu, V.E. Oncogenic mutations of PI3CA in human cancers. *Cell Cycle* (2004). 3: 1221-1224
- 91 Bellacosa, A., de Feo, D., Godwin, A.K., et al. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer* (1995). 64: 280-285
- 92 Momota, H., Nerio, E., Holland, E.C. Perifosine inhibits multiple signaling pathways in glial progenitors and cooperates with temozolomide to arrest cell proliferation in gliomas in vivo. *Cancer Res* (2005); 65(16): 7429-7435
- 93 Jin, X., Gossett, D.R., Wang, S., et al. Inhibition of AKT survival pathway by a small molecule inhibitor in human endometrial cancer cells. *Br J Cancer* (2004); 91(10): 1808-1812
- 94 Albitar, L., Pickett, G., Morgan, M., Davies, S., Leslie, K.K. Models representing type I and type II human enometrial cancers: Ishikawa H and Hec50co cells. *Gynecol Oncol* (2007);106(1):52-64

- 95 Wan, X., Li, J., Xie, X., Lu, W. PTEN augments doxorubicin-induced apoptosis in PTEN-null Ishikawa cells. *Int J Gynecol Cancer* (2007);17(4):808-812
- 96 Ruiter, G.A., Zerp, S.F., Bartelink, H., van Blitterswijk, W.J., Verheij, M. Anti-cancer alkyllysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer Drugs* (2003);14(2): 167-173
- 97 Vink, S.R., Schellens, J.H., van Blitterswijk, W.J., Verheij, M. Tumor and normal tissue pharmacokinetics of perifosine, an oral anti-cancer alkylphospholipid. *Invest New Drugs* (2005);23(4):279-286
- 98 Ernst, D.S., Eisenhauer, E., Wainman, N., et al. Phase II study of perifosine in previously untreated patients with metastatic melanoma. *Invest New Drugs* (2005);23(6): 569-575
- 99 Van Ummersen, L., Binger, K., Volkman, J., et al. A phase I trial of perifosine (NSC 639966) on a loading dose/maintenance dose schedule in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* (2004); 10(22):7450-7456
- 100 Crul, M., Rosing, H., de Klerk, G.J., et al. Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine (D-21266) in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer* (2002);38(12):1615-1621
- 101 Knowling, M., Blackstein, M., Tozer, R., et al. A phase II study of perifosine (D-21226) in patients with previously untreated metastatic or locally advanced soft tissue sarcoma: A National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Groupe trial. *Invest New Drugs* (2006);24(5):435-439
- 102 Cully, M., You, H., Levine, A.J., Mak, T.W. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* (2006);6(3):184-192
- 103 Rahmani, M., Reese, E., Dai, Y., et al. Coadministration of histone deacetylase inhibitors and perifosine synergistically induces apoptosis in human leukemia cells through Akt and ERK1/2 inactivation and the generation of ceramide and reactive oxygen species. *Cancer Res* (2005);65(6):2422-2432
- 104 Naumann, U., Wischhusen, J., Weit, S., et al. Alkylphosphocholine-induced glioma cell death is BCL-X(L)-sensitive, caspase-independent and characterized by massive cytoplasmic vacuole formation. *Cell Death Differ* (2004);11(12):1326-1341

- 105 Naumann, U., Kügler, S., Wolburg, H., et al. Chimeric tumor suppressor 1, a p53-derived chimeric tumor suppressor gene, kills p53 mutant and p53 wild-type glioma cells in synergy with irradiation and CD95 ligand. *Cancer Res* (2001);61(15):5833-5842
- 106 Altomare, D.A., et al. AKT and mTOR phosphorylation is frequently detected in ovarian cancer and kann be targeted to disrupt ovarian tumor cell growth. *Oncogene* (2004);23(34):5853-5857
- 107 Momota, H.E., Nerio, and E.C. Holland. Perifosine inhibits multiple signaling pathways in glial progenitors and cooperates with temozolomide to arrest cell proliferation in gliomas in vivo. *Cancer Res*, 2005. 65(16):7429-7435
- 108 Ruitter, G.A., et al. Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer drugs*, 2003. 14(2):167-173
- 109 Manning, B.D., Lewis, C.C. Division of Signal Transduction. *Cell* 129, 2007
- 110 Aapro, M., Boli, G., et. al. An EORTC-GCCG randomized phase II trial of doxorubicin versus doxorubicin+cisplatin in endometrial carcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* (1994) 13:275
- 111 Thigpen, J.T., Blessing, J.A., et.al. Phase III trial of doxorubicin+/- cisplatin in advanced or recurrent endometrial carcinoma: A GOG Study. (1993) *Proc Am Soc Clin oncol* 12:261
- 112 Baltzer, J., Meerpohl, H.G., et.al. Endometriumkarzinom. *Praxis der gynäkologischen Onkologie*. G.T. Verlag, Stuttgart. New York (1999) 195-214
- 113 Von Minckwitz, G., Costa, S.D., et.al. Chemotherapie. *Allgemeine gynäkologische Onkologie*. H.G. Bender, München-Wien-Baltimore, Urban&Schwarzenberg: 265-301
- 114 Schlessinger, J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of Egf receptor. *Cell* 2002; 110:669-672
- 115 Emons, G., Fleckenstein, G., Hinney, B., Huschmand, A., Heyl, W. Hormonal interactions in endometrial cancer. *Endoc. Relat Cancer* 2000, 7: 227-242
- 116 Hitomi, J. et.al. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 2008 dec. 26, 135(7): 1311-23

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abb.1: Modell der EGFR-abhängigen Signaltransduktion	12
Abb.2: Der PI3K/PKB/AKT-Signalweg	14
Abb.3 (a-l): Zytotoxische Effekt des Perifosins auf Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien	27
Abb.4 (a-d): Antiproliferative Wirkung von Perifosin auf metabolisch-inaktive Zellen	36
Abb.5 (a-d): Kombinationsbehandlung der Zelllinien mit Perifosin und dem multi-Caspasen-Inhibitor zVAD-fmk über 48h	39
Abb.6 (a-c): Effekt von Perifosin auf die Expression von phosphoryliertem AKT	40
Abb.7 (a-e): DNA-Zellzyklus-Analyse Von Endometrium-, Ovarialkarzinomzelllinien und peripheren Blutlymphozyten	41
Abb.8 (a-d): Kombinationsbehandlung mit Perifosin und Cisplatin	46

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. med. Johannes Dietl möchte ich für die die Aufgabenstellung, Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für die Übernahme des Koreferates herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. med. Lorenz Rieger für die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung während der experimentellen Phase, sowie die hervorragende Unterstützung bei

der Fertigstellung der Arbeit.

Ebenfalls ein großes Dankeschön gilt Privatdozent Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen für die kompetente und hilfreiche Zusammenarbeit und die Betreuung der Tätigkeiten im Labor. Ich danke für die sehr gute Betreuung, vertrauensvolle Zusammenarbeit und die kompetente Beratung während der Arbeit an dieser Dissertation.

Herrn Privatdozent Dr. med. Jörg Engel danke ich sehr herzlich für die engagierte Unterstützung bei den Experimenten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Tanja Schönhals

geb. am 26.07.1979 in Kokschetau
verheiratet, zwei Kinder

Schulbildung

09.1986-07.1996

allgemeine Mittelschule in Kokschetau

09.2001-07.2003

allgemeine Hochschulreife auf dem Bayernkolleg
Schweinfurt

Hochschulstudium

10.2003-06.2010

Studium der Humanmedizin an der Julius-
Maximilians Universität Würzburg

02.2005

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

02.2009-01.2010

Praktisches Jahr:

Missionsärztliche Institut: Abteilungen für Innere
Medizin, Chirurgie, Gynäkologie und
Geburtshilfe

04.2010

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion

2006-2009

Thema:" Die Wirkung von AKT-Inhibitoren auf
die humane Endometrium- und
Ovarialkarzinomzelllinien, Frauenklinik Würzburg

Würzburg, 23.01.2011