

Aus dem Medizinischen Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Geschäftsführende Direktoren:

Prof. Dr. med. U. Wagner und Prof. Dr. med. S. Schmidt

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg und
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg

**Effekte und Wirksamkeitsvergleich
verschiedener Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Analoga
in gynäkologischen Karzinomzelllinien**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin, dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Aline Metz aus Karlsruhe

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
26.02.2009

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs der Philipps-Universität Marburg.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. G. Emons

1. Korreferent: PD Dr. G. Zugmaier

2. Korreferent: Prof. Dr. A. Steinmetz

Tag der mündlichen Prüfung: 26.02.2009

Für meine Mutter Helma

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | |
| 1.1 | Einführung | 6 |
| 1.2 | Das Mammakarzinom..... | 6 |
| 1.2.1 | Epidemiologie, Ätiologie und Therapie | 6 |
| 1.2.2 | Endokrine Therapie..... | 8 |
| 1.3 | Das Ovarialkarzinom | 11 |
| 1.3.1 | Epidemiologie, Ätiologie und Therapie | 11 |
| 1.3.2 | Endokrine Therapie..... | 12 |
| 1.4 | Das Endometriumkarzinom | 14 |
| 1.4.1 | Epidemiologie, Ätiologie und Therapie | 14 |
| 1.4.2 | Endokrine Therapie..... | 15 |
| 1.5 | Das Gonadotropin-Releasing-Hormon Typ I und II | 17 |
| 1.5.1 | Biochemie und Physiologie..... | 17 |
| 1.5.2 | GnRH-Analoga..... | 18 |
| 1.5.3 | GnRH Rezeptoren I und II | 21 |
| 1.5.4 | Signaltransduktion | 22 |
| 1.5.5 | Therapeutischer Nutzen und Anwendung..... | 23 |
| 1.5.6 | Nebenwirkungen | 24 |
| 1.6 | Zielsetzung der vorliegenden Arbeit..... | 25 |
| 2 | MATERIAL UND METHODIK | 26 |
| 2.1 | Chemikalien und Lösungen..... | 26 |
| 2.1.1 | Liste der Chemikalien | 26 |
| 2.1.2 | Lösungen | 27 |
| 2.1.2.1 | Kulturmedium | 27 |
| 2.1.2.2 | PBS/BSA-Lösung..... | 27 |
| 2.1.2.3 | Trypsin-Lösung | 28 |
| 2.1.2.4 | GnRH-Agonisten und -Antagonisten..... | 28 |
| 2.2 | Zellkulturen..... | 28 |
| 2.2.1 | Zelllinien..... | 28 |
| 2.2.2 | Kultivierung | 29 |
| 2.2.2.1 | Passagieren | 29 |
| 2.2.2.2 | Kryokonservierung | 30 |
| 2.3 | Versuchsaufbau | 30 |
| 2.3.1 | Proliferationsassay | 31 |
| 2.4 | Statistische Auswertung..... | 31 |
| 3 | ERGEBNISSE | 32 |
| 3.1 | Dosisabhängiger Einfluss von GnRH-Agonisten und -Antagonisten auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 | 32 |
| 3.1.1 | Darstellung der Ergebnisse in Tabellenform..... | 34 |

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.2 | Darstellung der Ergebnisse als Balkendiagramm..... | 34 |
| 3.2 | Dosisabhängiger Einfluss von GnRH-Agonisten und -Antagonisten auf die Proliferation der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-21..... | 37 |
| 3.2.1 | Darstellung der Ergebnisse in Tabellenform..... | 38 |
| 3.2.2 | Darstellung der Ergebnisse als Balkendiagramm..... | 38 |
| 3.3 | Dosisabhängiger Einfluss von GnRH-Agonisten und -Antagonisten auf die Proliferation der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27..... | 41 |
| 3.3.1 | Darstellung der Ergebnisse in Tabellenform..... | 42 |
| 3.3.2 | Darstellung der Ergebnisse als Balkendiagramm..... | 42 |
| 3.4 | Dosisabhängiger Einfluss von GnRH-Agonisten und -Antagonisten auf die Proliferation der Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1A..... | 45 |
| 3.4.1 | Darstellung der Ergebnisse in Tabellenform..... | 46 |
| 3.4.2 | Darstellung der Ergebnisse als Balkendiagramm..... | 46 |
| 4 | DISKUSSION..... | 49 |
| 4.1 | Betrachtung der Ergebnisse in Hinblick auf die Dosisabhängigkeit der Wirkung von GnRH-Analoga..... | 51 |
| 4.2 | Betrachtung der Ergebnisse in Hinblick auf Unterschiede der Wirkung von GnRH-Analoga auf Zelllinien der verschiedenen Tumorarten..... | 52 |
| 4.3 | Betrachtung der Ergebnisse des Proliferationsverhaltens der Zelllinie HEC-1A..... | 52 |
| 4.4 | Betrachtung der Ergebnisse des Proliferationsverhaltens der Zelllinie MCF-7..... | 53 |
| 4.5 | Betrachtung der Ergebnisse des Proliferationsverhaltens der Zelllinien EFO-21 und EFO-27..... | 54 |
| 4.6 | Versuch der Klärung der unterschiedlichen Wirkweise der Analoga..... | 55 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY..... | 57 |
| 6 | LITERATURNACHWEIS..... | 61 |
| 7 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | 72 |
| 8 | TABELLENVERZEICHNIS..... | 73 |
| 9 | AKADEMISCHE LEHRER..... | 74 |
| 10 | ERKLÄRUNG..... | 75 |
| 11 | DANKSAGUNG..... | 76 |

1 EINLEITUNG

1.1 Einführung

Die vorliegende Arbeit beschreibt Daten aus Zellproliferationsversuchen vier unterschiedlicher Zelllinien von drei gynäkologischen Karzinomerkrankungen. Es wurde die Wirkung von sechs unterschiedlichen Analoga des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH) auf das Proliferationsverhalten der Karzinomzellen getestet. Untersucht wurden die Mammakarzinomzelllinie MCF-7, die Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1A und die Zelllinien EFO-21 und EFO-27 zweier Ovarialkarzinome. Die verwendeten Analoga setzen sich aus vier Substanzen aus der agonistisch wirkenden Gruppe und aus zwei Substanzen aus der antagonistisch wirkenden Gruppe zusammen. Die Daten wurden mittels standardisierter Proliferationsversuche in einem Zellkulturlabor erhoben.

1.2 Das Mammakarzinom

1.2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Therapie

Von den Krebserkrankungen der Frau entfallen 20–25% auf das Mammakarzinom. Es ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau in Deutschland (Leitlinie Mammakarzinom 2006). Zurzeit wird die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland auf etwa 50.000 pro Jahr geschätzt, der Erkrankungsgipfel liegt im 7. Lebensjahrzehnt (mittleres Erkrankungsalter 63,5 Jahre). Auf das Gesamtspektrum des Alters zwischen 35 und 59 Jahren gesehen, ist das Mammakarzinom die häufigste Todesursache (Schüler und Gutzwiller 1995, Leitlinie Mammakarzinom 2006).

Die Übersicht über die Risikofaktoren ist in der Literatur ausführlich dargestellt.

Ein großer Einfluss auf die Entstehung eines Mammakarzinoms wird der familiären Belastung sowie dem Vorhandensein der BRCA-1- und BRCA-2-Gene (q-Arm des Chromosoms 17), die in 5% der Fälle vorhanden sind, zugeschrieben (Antoniou und Easton 2006).

Eine eindeutige Rolle spielt die erhöhte Zufuhr tierischer Fette (Brinton und Hoover 1992, Brinton und Devesa 1996). Bei Adipositas findet die Umwandlung von Androstendion zu Östrogen in der Postmenopause im Fettgewebe statt und die Konversionsrate erhöht sich signifikant mit zunehmendem Körpergewicht.

Eine besondere Bedeutung hat die Dauer der Östrogeneinwirkung. Je früher die Menarche (Menstruation vor dem 12. Lebensjahr) oder je später die Menopause einsetzt, desto länger ist die Östrogenproduktion. Über den Effekt der exogenen alleinigen Östrogenzufuhr oder der Kombinationstherapie von Östrogenen und Gestagenen bei einer Hormonersatztherapie in der Postmenopause sind kontroverse Meinungen bekannt. 1997 wies die Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer nach, dass das Risiko für das Mammakarzinom bei fünfjähriger Anwendung einer Hormonersatztherapie 1,36fach erhöht ist. Scharier zeigte 2000, dass eine postmenopausale Hormonsubstitution das Wachstum von differenzierten Tumoren fördert. Gapstur et al. (1999) zeigten einen Anstieg an invasiven Mammakarzinomen nach einer Hormonersatztherapie. Stanford et al. (1995) jedoch konnten keine Risikoerhöhung finden. In der WHI Studie (Womens` Health Initiative Trial, 1993) konnte ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms unter einer Kombinationstherapie gezeigt werden, ohne Erhöhung der Mortalität und in Abhängigkeit der Einnahmezeit (Rossouw et al. 2002). Ähnliche Ergebnisse konnten in der HERS Studie (Heart and Estrogen/progestin Replacement Study) erhoben werden (Hulley et al. 2002). Die Million Women Study beschreibt ein erhöhtes Risiko während aktueller Hormonersatztherapie, nicht aber nach Beendigung dieser (Million Women Study Collaborators 2003).

Zusammenfassend ist das Risiko von der Gesamtdauer der Exposition abhängig, eine Anwendung von mehr als 5 Jahren erhöht das Risiko, und von der Art der Anwendung. Die Kombinationstherapie zeigt ein höheres Risiko als die Monotherapie mit Östrogenen (Leitlinien Mammakarzinom 2004, U.S. Preventive Services Task Force 2005).

Späte Schwangerschaft und Nulliparität bedeuten ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko (Maass 1995, Thomas et al. 1993, Schmidt-Matthiesen 1998).

Die Prognose für die Patientinnen ist von verschiedenen Faktoren abhängig.

Einer möglichst früh einsetzenden Diagnose und Therapie kommt dabei die größte Bedeutung zu. Die Tumorgöße, das Wachstum, die Differenzierung des histologischen Typs, der axilläre Lymphknotenstatus und der Steroidrezeptorstatus

sind wie bei anderen Tumorarten von weiterer Bedeutung und stellen die „klassischen“ gesicherten Prognosefaktoren dar (Harbeck et al. 2001).

Die Therapie des Mammakarzinoms umfasst vorrangig die operative Therapie. Aufgrund jüngerer Ergebnisse hat sich ein individualisiertes multimodales und interdisziplinäres Therapiekonzept in der Behandlung etabliert.

Ziel der operativen Therapie ist es, eine R-0-Situation zu erreichen unter Berücksichtigung der Möglichkeit eines brusterhaltenden Vorgehens wie eine Exstirpation im Gesunden oder eine modifiziert-radikale Mastektomie mit anschließender axillärer Lymphonodektomie und einer adjuvanten Nachbehandlung (Leitlinie Mammakarzinom 2006, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 2000). Die adjuvante Therapie richtet sich nach der Größe des Tumors, der Histologie, dem Grading und dem Rezeptorstatus. Hier können eine Radiotherapie und eine adjuvante postoperative medikamentöse Behandlung bestehend aus einer Chemotherapie oder einer endokrinen Therapie oder auch einer Kombination aus beiden Therapieformen indiziert sein. Bei rezeptorpositiven Patientinnen ist eine endokrine Behandlung indiziert (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 1998, 2001, Leitlinie Mammakarzinom 2006).

1.2.2 Endokrine Therapie

Bei allen prämenopausalen Frauen mit östrogen- und/oder progesteronrezeptorpositiven Karzinomen ist die endokrine Therapie des Mammakarzinoms als adjuvante oder palliative Maßnahme etabliert.

Vor mehr als 100 Jahren konnte Beatson durch eine beidseitige Adnexektomie eine Regression von Tumoren in fortgeschrittenen Fällen erzielen und durch die Suppression der gonadalen Hormone eine Hemmung des Tumorwachstums nachweisen. Nach der operativen Therapie wurde 1948 die erste strahlentherapeutische ovarielle Ablation durchgeführt, mit Remissionsraten von 30–35% in prämenopausalen Fällen. Im weiteren Wandel der Therapien wurden systemisch wirksame, aber weniger nebenwirkungsreiche Therapeutika entwickelt, die eine ovarielle Suppression oder Blockade der Rezeptoren bewirken.

Zunächst wurde das Antiöstrogen Tamoxifen seit Mitte der 70er Jahre besonders beim Mammakarzinom in vielen Studien untersucht und war Goldstandard. Die Wirkung beruht auf einer antiöstrogenen Wirkung durch kompetitive Hemmung am Östrogenrezeptor. Es hemmt die Expression östrogenregulierter Gene für Wachstumsfaktoren und angiogenetische Faktoren. Indikation ist das rezeptorpositive Mammakarzinom.

Neuere Studien zeigen eine bessere Wirksamkeit von Aromatasehemmern wie Anastrozol, welches momentan als adjuvante Therapie beim postmenopausalen Brustkrebs eingesetzt wird (ATAC Trialists' Group 2008).

Durch die Entdeckung des GnRH 1971 (Schally et al.) konnte der Effekt einer operativen Ovariectomie auf das hormonabhängige Mammakarzinom, den Beatson schon 1896 beschrieb, systemisch nachvollzogen werden.

Durch GnRH-Analoga fand sich eine reversible und nebenwirkungsarme Behandlung des Mammakarzinoms. Eingesetzt wurden Goserelin und Leuprorelin, wobei die Wirkung der Hormonsuppression durch beide Methoden gleich zuverlässig war (Taylor et al. 1998).

Spezifische Bindungsstellen für GnRH in Mammakarzinomzellen wurden von Eidne et al. (1985, 1987) entdeckt und durch nachfolgende Studien weiter klassifiziert (Miller et al. 1985, Baumann et al. 1993, Bützow et al. 1987, Mangia et al. 2002). 50–64% der Karzinome exprimieren GnRH-Rezeptoren. Viele Studien zeigen einen zeit- und dosisabhängigen direkten Effekt auf die Hemmung der Proliferation bei Mammakarzinomzellen in-vitro von bis zu 40% durch verschiedene GnRH-Agonisten (Blankenstein et al. 1985, Miller et al. 1985, Sica et al. 1992 und 1994).

Kakar et al. (1994) wiesen GnRH-Bindungsstellen in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nach. Antiproliferative Effekte von GnRH-Analoga auf diese Zelllinie wurden von mehreren Gruppen untersucht und es liegen teilweise kontroverse Ergebnisse vor. Miller et al. (1985) zeigten antiproliferative Effekte von Buserelin an MCF-7, ebenso Eidne et al. (1987). Segal-Abramson et al. (1992) zeigten eine Inhibition durch Cetrorelix und Buserelin, Brower et al. (1992) untersuchten Triptorelin, Goserelin und Cetrorelix und fanden keine signifikanten Effekte auf die Zelllinie MCF-7. Nicht nur die direkte antiproliferative Wirkung von GnRH, auch ein signifikanter Effekt der Analoga Triptorelin und Cetrorelix in der Reduktion von Metastasierungsvorgängen der Zellen wurde gesehen. Von Alten et al. zeigten eine GnRH-vermittelte Hemmung

der Zellinvasion und -migration (und damit eventuell der Metastasierung) von Zelllinien des Mammakarzinoms (Zelllinie MCF-7) (von Alten et al. 2006).

In der Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms konnten in klinischen Studien mit dem Einsatz der Agonisten Goserelin und Leuprorelin Remissionsraten von 39–58% bei guter Verträglichkeit der Analoga erreicht werden (Klijn et al. 2001). Weitere Studien zeigten auch Erfolge in der Kombination von Tamoxifen und GnRH-Analoga (Boccardo et al. 1994). Brambilla et al. (1992) und andere Gruppen konnten mit dem Agonisten Goserelin Remissionen von bis zu 32% in prämenopausalen fortgeschrittenen Mammakarzinomen erreichen (Boccardo et al. 1994, Nicholsons und Walker 1989). Torrisi bewies in einer Studie, dass eine simultane Gabe von Letrozol und GnRH-Analoga eine Wirkung bei prämenopausalem Mammakarzinom zeigt (Torrisi et al. 2007).

1.3 Das Ovarialkarzinom

1.3.1 Epidemiologie, Ätiologie und Therapie

Das Ovarialkarzinom steht an zweiter Stelle der gynäkologischen Malignome der Frau. Die Inzidenz in Deutschland liegt bei 14 pro 100.000 und stellt 15–20% aller gynäkologischen Malignome dar. Das Erkrankungsalter liegt zwischen 58 und 65 Jahren.

Da klinische Symptome erst spät auftreten, sind bei der Feststellung des Tumors bereits mehr als 70% der Fälle in einem Stadium der intraabdominellen Ausbreitung (FIGO III – Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique). Bis heute existieren keine effektiven Früherkennungsmaßnahmen und Screeningmethoden. Viele Tumore werden erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt, wobei bei den Stadien III und IV die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei 5–20% liegt.

Das Lebensalter der Patientinnen, die Tumorgöße und -ausbreitung, der Differenzierungsgrad, der Ploidiegrad, der Lymphknotenstatus, okkulte postoperative Tumorrreste und der Allgemeinzustand der Frauen beeinflussen den Verlauf der Erkrankung und die Überlebenszeit (De Souza et al. 1992, Thigpen et al. 1993, Silverberg et al. 2000, von Georgi et al. 2003, Leitlinie maligne Ovarialtumore 2007). Auch der Rezeptorstatus des Tumorgewebes hat in Zusammenhang mit der hormonellen Therapie des Malignoms an Bedeutung gewonnen. Risikofaktoren sind die familiäre Disposition (10% sind genetisch bedingt), Adipositas, Östrogentherapie, Ernährung mit hohem Gehalt an tierischen Fetten und Umweltfaktoren wie Asbest (Piver et al. 1991).

Die Therapie des Ovarialkarzinoms basiert auf der Einteilung in ein frühes und ein fortgeschrittenes Karzinom. Die operative Therapie und eventuell eine adjuvante systemische platinhaltige Chemotherapie sind die wichtigsten Therapieformen beim frühen Karzinom (Stadium I–II). In einem fortgeschrittenen Stadium ist nach Operation eine adjuvante platin- und taxanhaltige Chemotherapie Standard (Zanetta et al. 1997, Trimbos et al. 2003, International Collaborative Ovarian Neoplasm Collaborators 2003, Colombo et al. 2005, Leitlinie maligne Ovarialtumore 2007). Bei fortgeschrittenen Karzinomen ist die Prognose durch das Ausmaß der operativen

Tumorentfernung bestimmt. Der Tumorrest ist ausschlaggebender Prognosefaktor (OVAR-3-Studie). Ziel ist ein makroskopisch tumorfreies Gebiet. Im Anschluss an die Operation empfiehlt sich eine primäre Chemotherapie – platin- und taxanhaltig (Advanced Ovarian Cancer Trialists' Group 1999, Covens et al. 2002, Du Bois et al. 2004, Bristow et al. 2006).

In der Rezidivtherapie nach Primärchemotherapie sind Daten für die Gabe von Tamoxifen, Gestagen, Etoposid und GnRH-Analoga bekannt. Das Ziel ist hier die Optimierung der Lebensqualität (Leitlinie maligne Ovarialtumore 2007).

1.3.2 Endokrine Therapie

Wie im Abschnitt zuvor erwähnt, steht bei der Therapie des refraktären Rezidivs die Optimierung der Lebensqualität im Vordergrund. In dieser Situation ist die nebenwirkungsarme endokrine Therapie eine Option. Der Einsatz verschiedener endokriner Therapiekonzepte ist besonders im Hinblick auf die geringe Toxizität der eingesetzten Substanzen und die dadurch erhaltene Lebensqualität gerechtfertigt (Leitlinie maligne Ovarialtumore 2007).

Die meisten Ovarialkarzinome zeigen Rezeptoren für Östrogene, Gestagene, Androgene und das Gonadotropin-Releasing-Hormon (Kavanagh et al. 1989, Rao und Slotman 1991, Emons et al. 1993 und 1994, Emons et al. 1999), so dass sich ein Einsatz der entsprechenden Hormone anbietet.

Als nachgewiesen wurde, dass Ovarialtumore auch Rezeptoren für GnRH, LH (Luteinisierendes Hormon) und FSH (Follikel-Stimulierendes Hormon) exprimieren, versuchte man diese Erkenntnisse therapeutisch zu nutzen (Kammerman et al. 1981, Rajaniemi et al. 1989). Die ersten Behandlungsversuche wurden von Parmar et al. (1985 und 1988) mit dem GnRH-Analoga Triptorelin durchgeführt und es zeigte sich eine Reduktion der Tumormasse bei Suppression der endogenen Gonadotropine.

Weitere klinische Studien zeigten bisher 12% Remissions- und 19% Stabilisierungsraten (Emons et al. 1994).

Ergebnisse aus Tier- und in-vitro-Untersuchungen ließen vermuten, dass verschiedene GnRH-Analoga das Wachstum von Ovarialkarzinomzellen zeit- und

dosisabhängig beeinflussen (Parmar et al. 1985, Emons et al. 1993, Emons und Schally 1994, Gründker et al. 2002). Emons et al. (1993) zeigten spezielle Bindungsstellen der Karzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27 und testeten GnRH-Analoga in Bezug auf eine Wachstumshemmung. Eine deutliche Proliferationshemmung ergab sich für Triptorelin auf die Zelllinien EFO-21 und EFO-27. Cetrorelix zeigte in Studien nur Wirkung auf die Proliferation der Zelle EFO-21. Diese Effekte wurden in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen (Emons et al. 2000). In mehreren Studien zeigte die Zelllinie EFO-27 ein ähnliches Wachstumsverhalten unter Einfluss von GnRH-Agonisten wie die Zelllinie EFO-21. Bei den Antagonisten zeigte sich ein anderes Bild. Emons et al. (1993 und 2000) fanden für die Antagonisten Cetrorelix und Ramorelix keinen proliferationshemmenden Effekt bei dieser Zelllinie bei fehlenden GnRH-II-Rezeptoren, wie weitere Untersuchungen zeigten (Gründker et al. 2003).

1.4 Das Endometriumkarzinom

1.4.1 Epidemiologie, Ätiologie und Therapie

Die Inzidenz des Endometriumkarzinoms weltweit beträgt zwischen 9,9 und 15,0 pro 100.000 Frauen. In Deutschland ist es das vierthäufigste Malignom der Frau und steht an neunter Stelle der Mortalität. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 75 und 80 Jahren.

Es gibt zwei Typen – ein estrogenabhängiges (Typ I) und ein estrogenunabhängiges (Typ II) Karzinom.

Ätiologisch sind endogene und exogene Risikofaktoren zu nennen. Exogene Risikofaktoren sind die nicht-zyklische Langzeiteinnahme von Estrogenen ohne Gestagenschutz und eine Tamoxifen-Therapie in Zusammenhang mit einem Mammakarzinom (Weiderpass et al. 1999, Bernstein et al. 1999). Als endogene Risikofaktoren gelten z. B. ein metabolisches Syndrom mit Adipositas, ein Diabetes mellitus, ein PCO-Syndrom und Nulliparität (Bristow et al. 1999).

Die Prognose des Endometriumkarzinoms ist im Allgemeinen als günstig anzusehen, was darauf zurückzuführen ist, dass sich mehr als 85% der Patientinnen in den klinischen Stadien I und II befinden. Die Überlebens- und Heilungsraten hängen vom Tumortyp, dem Grading und der Invasionstiefe im Myometrium sowie von einer Infiltration anderer Gewebe und dem Lymphknotenbefall ab.

Die Therapie kann in eine konservative, fertilitätserhaltende Therapie im Frühstadium mit hohem Rezidivrisiko und in eine operative, stadienabhängige Therapie eingeteilt werden. Eine Operation bestehend aus Hysterektomie mit Adnexektomie und pelviner und paraaortaler Lymphonodektomie ist die Primärtherapie und entscheidende Stagingmaßnahme für invasive Karzinome. Der Einsatz einer zusätzlichen adjuvanten Brachytherapie richtet sich nach dem Stadium (z. B. optional ab Stadium IA, G3, IB, G2). Eine Brachytherapie ist in Frühstadien nicht empfohlen, bei ausgedehntem Befall oder unklarem Staging ist eine perkutane und/oder vaginale Brachytherapie angeraten (Leitlinie Endometriumkarzinom 2006). Eine adjuvante systemische Therapie mit Gestagenen ist nicht empfohlen. Eine adjuvante Chemotherapie hat ebenfalls keine gesicherte Indikation. Die GOG-Studie 122 konnte allerdings einen Vorteil durch Therapie mit Adriamycin und Cisplatin gegenüber einer

Abdomenganzbestrahlung zeigen (Shaeffer et al. 2005). Unter die palliativen Therapien fallen bei progesteronrezeptorpositiven Karzinomen die endokrine Therapie mit Gestagenen oder Tamoxifen oder bei rezeptornegativen Karzinomen die Chemotherapie mit z. B. Adriamycin, Cisplatin, Ifosfamid, Epirubicin oder Paclitaxel mit teilweiser Verbesserung der Responseraten und Nutzen hinsichtlich der Überlebenszeit (Emons 2006, Leitlinie Endometriumkarzinom 2006).

1.4.2 Endokrine Therapie

Seit 1982 belegten zahlreiche Studien, dass GnRH einen therapeutischen Effekt auf steroidabhängige Tumore hat. Gallagher berichtete 1991 von antiproliferativen Effekten von GnRH-Agonisten bei Patientinnen mit Endometriumkarzinomen (Gallagher et al. 1991).

Verschiedene Gruppen fanden bei 80% der Endometriumkarzinome Rezeptoren für GnRH (Pahwa et al. 1991). Emons et al. (1988 und 1993) zeigten spezifische Bindungsstellen in zwölf Endometriumkarzinomen auf.

Auch ein Einfluss auf das Wachstum der Tumore, ähnlich wie beim Ovarial- und Mammakarzinom, wurde festgestellt (Emons et al. 1993). Für die GnRH-Agonisten Triptorelin und Cetrorelix wurde eine dosisabhängige Inhibition des Zellwachstums gefunden. Der inhibitorische Effekt war bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L maximal und betrug bis zu $52\% \pm 2$ zur Kontrolle (Emons et al. 1993). In weiteren klinischen Studien mit GnRH-Agonisten wurden Remissionsraten von 12% bis 31% gezeigt (Emons et al. 2000, Noci et al. 2001).

Eine Studie von Wang et al. zeigte 2002, dass die Therapie mit Megastrol-Acetat, Tamoxifen und GnRH in Frühstadien des Karzinoms (IA, Grad I) Erfolge mit 88% Remissionsrate erbrachte. Durch in-vitro-Untersuchungen an Zelllinien des Endometriumkarzinoms konnte weiter nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit GnRH-II-Antagonisten den Zelltod durch Apoptose einleiten (Fister et al. 2007).

Neuere Untersuchungen zeigten das Vorhandensein von GnRH-Typ-II-Rezeptoren in Zelllinien des Endometriumkarzinoms (Gründker et al. 2002) und in weiteren Versuchen zeigte sich eine wirkungsvollere Proliferationshemmung durch einen

GnRH-Typ-II-Agonisten als durch GnRH-I (Eicke et al. 2006). Eine Indikation der primären endokrinen Therapie aufgrund eines relativ guten Nebenwirkungsspektrums könnte möglicherweise die Behandlung von älteren, nicht-operablen Patientinnen im Stadium I der Erkrankung sein.

1.5 Das Gonadotropin-Releasing-Hormon Typ I und Typ II

Seit das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) in den 70er Jahren entdeckt wurde (Schally et al. 1971), haben sich die Bedeutung und das Verständnis der Funktion und damit auch die Anwendungsmöglichkeiten für dieses Hormon stark gewandelt. Besondere Bedeutung erlangte es recht schnell in der Therapie des Prostatakarzinoms, der Endometriose, der Genitalkarzinome wie dem Mammakarzinom und der Pubertas Präcox bei Kindern. Besonders die Möglichkeit der Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse brachte Fortschritte bei den Anwendungsmöglichkeiten.

1.5.1 Biochemie und Physiologie

GnRH (auch GnRH-I) ist ein Decapeptid, das im Nucleus arcuatus und in der Area praeoptica des Hypothalamus in Neuronengruppen der Eminentia mediana gebildet wird. Es erreicht über das portale System seinen Wirkort, die Hypophyse. Dort reguliert es in der Adenohypophyse die Produktion und Ausschüttung der Gonadotropine: das Luteinisierende Hormon (LH) und das Follikel-Stimulierende Hormon (FSH).

Physiologisch ist eine pulsatile Ausschüttung des Hormons in einer Dosis, die der jeweiligen gonadalen Funktion angepasst ist. Die Pulsfrequenz beträgt 60-120 Minuten, wobei die Frequenz auch eine unterschiedliche Freisetzung von LH und FSH steuert. Bei niedrigen Frequenzen wird vermehrt mRNA für die β -Untereinheit des FSH gebildet.

LH und FSH erreichen über den Blutkreislauf die Ovarien, wo sie die Synthese von Östrogen und Progesteron stimulieren und die Follikelreifung steuern.

Durch einen Rückkopplungsmechanismus kann das vom Follikel in der folliculären Phase gebildete Östradiol die GnRH-Sekretion hemmen und verhindert dadurch die LH- und FSH-Sekretion und -Freisetzung (Runnebaum und Rabe 1987). Eine Änderung in der Frequenz und Menge wird besonders durch den Östrogenspiegel beeinflusst.

Auf der Kenntnis dieses physiologischen Mechanismus basieren verschiedene Therapieansätze für Krankheiten wie z. B. die hypothalamische Amenorrhö, für hypogonadotropen Hypogonadismus und die Anwendung in der IVF-Stimulation.

Neben der Funktion im hypothalamisch-hypophysären System gibt es auch andere extrahypophysäre Gewebe, auf die GnRH Einfluss hat. Im Plazentagewebe wurde der Nachweis eines Regulationssystems, basierend auf GnRH, erbracht (Petraglia et al. 1990, Merz et al. 1991). Auch in hormonsensitiven Tumoren des Mamma-, des Endometrium- und des Ovarialkarzinoms wurden GnRH-Bindungsstellen und eine GnRH-Bildung bzw. Expression der mRNA des Hormons beobachtet und nachgewiesen (Miller et al. 1985, Eidne et al. 1987, Emons et al. 1989, 93, Skralovic et al. 1990, Pahwa et al. 1991, Limonta et al. 1992, Ohno et al. 1993, Gründker et al. 2002).

Neben dem ursprünglichen GnRH (oder auch GnRH-I) wurden weitere Formen beschrieben. Das GnRH Typ II ist ebenfalls ein Decapeptid und zu 70% homolog zu GnRH-I (Chen et al. 2001). Die Rolle von GnRH-II und dessen Rezeptor ist noch relativ ungeklärt, in Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien konnte eine antiproliferative Wirkung nachgewiesen werden (Gründker et al. 2002).

1.5.2 GnRH-Analoga

1971 wurde von Schally et al. erstmals die Gensequenz charakterisiert. Die Aminosäuren der Kettenenden des Decapeptids sind verantwortlich für die biologische Aktivität.

Die Aminosäure in der 6. Position ist für die metabolische Stabilität verantwortlich. Ein Ersatz von Glycin in Position 6 durch eine unphysiologische D-Aminosäure verlängert die normale Halbwertszeit von 15 Minuten um ein Vielfaches. Die ersten drei Aminosäuren regulieren die Rezeptoraktivität. Ein Austausch in dieser Region bewirkt eine Bindung an den Rezeptor ohne Rezeptor-Zellantwort (Schally et al. 1971).

Durch Veränderungen in der Aminosäuresequenz konnte man unterschiedliche Analoga synthetisieren, die durch veränderte Rezeptoraffinität teilweise stärkere und längere Wirkungen als das körpereigene Hormon zeigen (Schally 1972).

Man kann die synthetisierten Analoga in GnRH-Agonisten, die synergistisch zu natürlichem GnRH wirken, und Antagonisten, die natürliches GnRH am Rezeptor kompetitiv verdrängen und biologisch nicht aktiv sind, einteilen (Kiesel 1992).

Struktur des GnRH-I:

| | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------|
| pGLU | HIS | TRP | SER | TYR | GLY | LEU | ARG | PRO | GLY-NH ₂ |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------|

Struktur des GnRH-II:

| | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------|
| pGLU | HIS | TRP | SER | HIS | GLY | TRP | TYR | PRO | GLY-NH ₂ |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------|

Triptorelin:

| | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|--------------------|-----|-----|-----|---------------------|
| pGLU | HIS | TRP | SER | TYR | D-TRP ⁶ | LEU | ARG | PRO | GLY-NH ₂ |
|------|-----|-----|-----|-----|--------------------|-----|-----|-----|---------------------|

Buserelin:

| | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----------|
| pGLU | HIS | TRP | SER | TYR | D-SER(Bu ^t) ⁶ | LEU | ARG | PRO | Ethylamid |
|------|-----|-----|-----|-----|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----------|

Goserelin:

| | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|--------------------------------------|-----|-----|-----|------------------------|
| pGLU | HIS | TRP | SER | TYR | D-SER(Bu ^t) ⁶ | LEU | ARG | PRO | Az-GLY-NH ₂ |
|------|-----|-----|-----|-----|--------------------------------------|-----|-----|-----|------------------------|

Leuprorelin:

| | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|--------------------|-----|-----|-----|-----------|
| pGLU | HIS | TRP | SER | TYR | D-LEU ⁶ | LEU | ARG | PRO | Ethylamid |
|------|-----|-----|-----|-----|--------------------|-----|-----|-----|-----------|

Cetrorelix:

| | | | | | | | | | |
|----------|-------------------------|-----------------------|-----|-----|-------|-----|-----|-----|----------|
| AcD-NAL2 | D-PHE(4Cl) ² | D-PAL(3) ³ | SER | TYR | D-CIT | LEU | ARG | PRO | D-ALA-OH |
|----------|-------------------------|-----------------------|-----|-----|-------|-----|-----|-----|----------|

Ramorelix:

| | | | | | | | | | |
|----------|-------------------------|--------|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-------|
| AcD-NAL2 | D-PHE(4Cl) ² | D-PAL3 | SER | TYR | D-SER | LEU | ARG | PRO | AzGLY |
|----------|-------------------------|--------|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-------|

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von GnRH-I und -II und der in dieser Arbeit verwendeten Analoga.

Die kontinuierliche Gabe eines GnRH-Agonisten führt anfänglich zu einem „Flare-up-Effekt“, d. h. zu einem plötzlichen Anstieg der LH/FSH-Sekretion. Danach stellt sich eine Desensibilisierung der Hypophyse durch eine Down-Regulation der Rezeptoren ein. Dadurch vermindert sich die Anzahl der Rezeptoren, wodurch in Folge die Gonadotropinsekretion erlischt; das heißt, es wird eine medikamentöse Hypophysektomie erreicht (Schally et al. 1989 und 1993, Emons und Schally 1994). Im Gegensatz zu den Agonisten verursachen die Antagonisten keine vorübergehende Stimulation der Hypophyse, was besonders in Fällen wie den hormonabhängigen Malignomen erwünscht ist. Die Antagonisten, die seit 1972 bekannt sind (Schally et al. 1972), unterscheiden sich stärker als die Agonisten von der Struktur des natürlichen GnRH und blockieren die hypophysären Rezeptoren. Es findet eine kompetitive Blockade statt, bei der es zu keiner intrazellulären Antwort kommt. Die LH- und FSH-Sekretion kommt sofort zum Erliegen. Auch bewirken die Antagonisten eine reversible Down-Regulation der Rezeptoren. Die erste Generation führte zu starken Nebenwirkungen wie Ödemen und Anaphylaxie durch Histaminfreisetzung, so dass ein klinischer Einsatz stark limitiert war. Neuere Antagonisten sind weitgehend frei von Nebenwirkungen und gut tolerabel (Reissmann et al. 1996). Ein klinischer Einsatz ist teilweise bei der Prostatahyperplasie und der Möglichkeit zur Kontrazeption des Mannes durch GnRH-Antagonisten in Erprobung. Auch findet ein Einsatz in der in-vitro-Fertilisationsbehandlung und bei der Behandlung der Endometriose statt.

Bedeutsam und wichtig für diese Arbeit aber ist, dass nicht nur eine Beeinflussung von hormonsensitiven Geweben durch die chemische Suppression der Sexualsteroiden durch GnRH, sondern auch direkte antiproliferative Effekte auf Mamma-, Prostata-, Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen beobachtet und in vielfachen Studien belegt werden konnten.

1.5.3 GnRH Rezeptoren I und II

Der GnRH Rezeptor Typ I ist, wie nahezu alle Rezeptoren von Peptidhormonen, membranständig. Der Rezeptor besteht aus 327-328 Aminosäuren. In dieser Polypeptidkette sind sieben Regionen schleifenartig angeordnet, die die Zellmembran durchziehen. Dies ist typisch für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Die Zahl der Rezeptoren in der Zellmembran alterniert und wird zeit- und dosisabhängig durch GnRH reguliert (Up- und Down-Regulation). Nicht nur im hypophysärem Gewebe, sondern auch in Geweben von Karzinomen des Ovars, der Brust, des Endometriums, der Plazenta und der Prostata wurden Rezeptoren entdeckt.

Bei ungefähr 80% der Ovarial- und Endometriumkarzinome und bei 50% der Mammakarzinome wird der GnRH Rezeptor Typ I exprimiert (Eidne et al. 1985, Blankenstein et al. 1985, Fekete et al. 1989, Skralovic et al. 1990, Pahwa et al. 1991, Emons et al. 1993, Ohno et al. 1993, Imai et al. 1994, Chatzaki et al. 1996, Völker et al. 2002).

Der GnRH Rezeptor Typ II wurde bei Primaten beschrieben und lokalisiert, eine vollständige Beschreibung des humanen Rezeptors liegt noch nicht vor (Millar 2003). Er besteht aus 379 Aminosäuren (Tensen et al. 1997).

In den Geweben von Ovar- und Endometriumkarzinomen wurde mittels reverser Transkriptase eine Expression von GnRH-II-Rezeptor-mRNA entdeckt und die Behandlung dieser Tumorzellen mit GnRH-II konnte größere antiproliferative Effekte zeigen als mit GnRH-I (Gründker et al. 2002, Eicke et al. 2006).

Es wird vermutet, dass die frühere Einteilung in „high affinity, low capacity“- und „low affinity, high capacity“-Rezeptoren den GnRH-I- und GnRH-II-Rezeptor beschreiben. Typ I entspricht wahrscheinlich dem „high affinity, low capacity“-Rezeptor, der den eigentlichen Rezeptor darstellt, und Typ II wahrscheinlich dem „low affinity, high capacity“-Rezeptor (Pahwa et al. 1991, Emons et al. 1993, 1997, 1998, Imai et al. 1994, Irmer et al. 1995, Skralovic et al. 1998, Gründker et al. 2002).

Das Vorliegen dieser Rezeptoren in den Geweben legt die Vermutung eines direkten regulatorischen, auf GnRH basierenden Systems für diese Gewebearten nahe (Gründker et al. 2002).

1.5.4 Signaltransduktion

Hauptursächlich verantwortlich für eine Zellantwort im hypophysären Gewebe ist im Fall des GnRH-Rezeptors eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Über eine Kaskade von Reaktionsschritten wird Ca^{2+} intrazellulär erhöht.

Über ein G-Protein wird die Phospholipase C aktiviert. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von Inositlipiden in der Zellmembran zu den Second-messenger *Inositoltriphosphat (IP3)* und *Diacylglycerol (DAG)*. *IP3* öffnet über den Calmodulin-Rezeptor Calcium-Kanäle und es kommt zum intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg. Intrazelluläres Ca^{2+} , *IP3* und *DAG* aktivieren eine Proteinkinase C. Diese bildet einen Enzymkomplex, der Serin- und Threonin-Reste verschiedener Proteine phosphoryliert und deren Aktivitätszustand ändert. Auch bewirkt sie eine Expression der LH β - und FSH β -Gene (Keri et al. 1991 und 1992, Horn et al. 1991, Hsieh und Martin 1992).

In Ovarialkarzinomzellen konnten Ohno et al. (1993) die Stimulation von Phospholipasen nachweisen.

In neueren Untersuchungen der Gruppe von Emons (1996, 1998, 2002) wird postuliert, dass der rezeptorvermittelte Effekt von GnRH, wie er in Hypophysenzellen stattfindet, in Karzinomzellen nicht durch den ursprünglichen klassischen Signaltransduktionsweg des Rezeptors vermittelt wird, sondern dass ein alternativer Mechanismus vorliegt. In den Untersuchungen konnte kein Nachweis erbracht werden, dass GnRH den Phosphatidylinositolphosphatweg in Zellen der Zelllinien EFO-21, EFO-27 und HEC-1A beeinflusst. Vielmehr werden die antiproliferativen Effekte durch Beeinflussung des mitogenen Signaltransduktionswegs der Wachstumsfaktorrezeptoren hervorgerufen.

Lee et al. zeigten 1991, dass GnRH in Pankreaskarzinomzellen eine Phosphatidyrosin-Phosphatase aktiviert. Dieses Enzym antagonisiert die Aktivierung der Tyrosinkinase in den Zellen. Ein weiterer Effekt von GnRH, ein Antagonismus zum Wachstumsfaktor EGF, zeigten Motta et al. (1996) in Prostatatumoren auf.

Mittlerweile konnte nachgewiesen werden, dass in gynäkologischen Karzinomzellen im Signaltransduktionsweg des GnRH-Rezeptors über ein G-Protein eine Phosphatidyrosin-Phosphatase aktiviert wird, wodurch die Tyrosin-Autophosphorylierung von epidermalen Wachstumsfaktor-(EGF)-Rezeptoren und damit die mitogene Signaltransduktion gehemmt wird. Dies führt zu einer Abnahme

der Zellproliferation (Emons et al. 1997, Emons et al. 2000, Gründker et al. 2000, 2001 und 2002). Eine weitere Wirkung von GnRH ist die Aktivierung des Nukleus-Faktor-kappa-B und die Hemmung der Apoptose, zugleich wird auch der Aktivator-Protein-1-Signalweg angeregt (Gründker et al. 2000 und 2002).

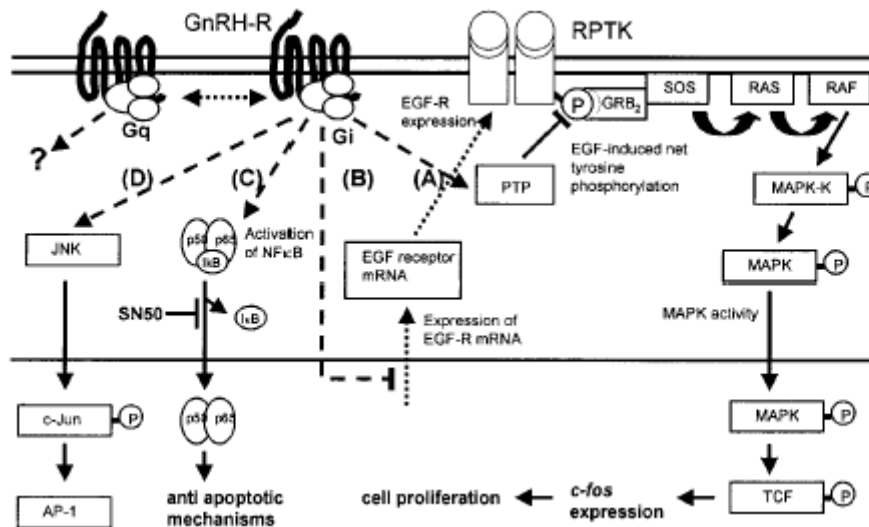


Abbildung 2: Signaltransduktion von GnRH in gynäkologischen Karzinomen. Aus: Gründker C, Günthert AR, Westphalen S, Emons G: Biology of the gonadotropin hormone system in gynecological cancers. Eur J Endocrinol 2002 146: 1–14

1.5.5 Therapeutischer Nutzen und Anwendung

Seit 1971 das GnRH und die verschiedenen Analoga entdeckt wurden, konnte man die hypothalamische-hypophysäre-Achse therapeutisch beeinflussen. Durch physiologische pulsatile Gabe wurde eine Stimulierung der Gonaden bei Infertilität von Mann und Frau erreicht. Die Behandlung verschiedener Erkrankungen, wie der primären Amenorrhö und des polyzystischen Ovars, wurden dadurch ermöglicht. Durch eine kontinuierliche Gabe erreichte man eine Desensibilisierung der Hypophyse und der Gonaden – medikamentöse Kastration (s.o.). Bei Kindern und Jugendlichen kann die Pubertas präcox erfolgreich behandelt werden. Bei Frauen mit gutartigen gynäkologischen Erkrankungen, wie der Endometriose und Leiomyomen des Uterus, zeigten GnRH-Therapien Erfolge. Der Einsatz von GnRH bei malignen Erkrankungen

der Prostata und des hormonsensitiven Mammakarzinoms der Frau etablierte sich schon vor 20 Jahren.

Der aktuelle klinische Einsatz von GnRH-Analoga besteht in der Behandlung des prämenopausalen Mammakarzinoms, des Ovarialkarzinoms in der Rezidivsituation und in der palliativen Behandlung des Endometriumkarzinoms.

1.5.6 Nebenwirkungen

Die Nebenwirkungen einer endokrinen Therapie mit GnRH und seinen Analoga sind vor allem Folgen eines Östrogen- und Androgenmangels bei prämenopausalen Patientinnen. Es kann zu Hitzewallungen und Schweißausbrüchen kommen; ebenso können Kopfschmerzen, Übelkeit, Stimmungsschwankungen, ein prämenstruelles Syndrom und ausgeprägter Spannungsschmerz der Brust auftreten sowie eine Osteoporose mit weiteren Komplikationen. Diese Nebenwirkungen können therapielimitierend sein. Vor allem die ersten Antagonisten riefen histamininduzierte allergische Ödeme hervor und sind im klinischen Gebrauch erst seit Entwicklung neuerer Antagonisten ohne diesen Effekt nützlich.

1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die bisherige Darstellung zeigt, dass die Anwendung von GnRH-Analoga in der Behandlung von Genitalkarzinomen der Frau in modernen Therapiekonzepten einen Stellenwert erlangt hat und beim Mammakarzinom einen gesicherten Status in der adjuvanten und palliativen Situation hat. Viele Studien haben den direkten und indirekten Einfluss der verschiedenen Substanzen auf das Wachstum von Tumorzellen bewiesen, es liegen aber auch gegenteilige Studien vor, in denen insbesondere kein direkter Effekt von GnRH auf die Zellproliferation von Karzinomzellen nachgewiesen wird (Eidne et al. 1987, Connor et al. 1994, Manetta et al. 1995).

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die in-vitro-Effekte der im Moment gebräuchlichsten GnRH-Agonisten und -Antagonisten auf das Proliferationsverhalten von vier verschiedenen Karzinomzelllinien quantitativ zu erfassen und zu vergleichen. Die Karzinomzelllinie HEC-1A stammt aus einem Endometriumkarzinom, die Zelllinie MCF-7 aus einem Mammakarzinom und die Zelllinien EFO-21 und EFO-27 aus Ovarialkarzinomen.

Es wurden sechs verschiedene Substanzen eingesetzt: die GnRH-Agonisten Triptorelin, Buserelin, Goserelin und Leuprorelin und die beiden GnRH-Antagonisten Cetrorelix und Ramorelix.

Das Proliferationsverhalten der GnRH-rezeptorpositiven Karzinomzelllinien des Endometriumkarzinoms (HEC-1A), des Mammakarzinoms (MCF-7) und der Ovarialkarzinome (EFO-21 und EFO-27) wurde in fünftägigen Proliferationsversuchen beobachtet.

Ziel der Proliferationsversuche war es, unter identischen Versuchsbedingungen das Verhalten der Proliferation der Karzinomzellen unter direktem Einfluss der sechs verschiedenen GnRH-Analoga zu vergleichen und einen Nachweis der in der Literatur beschriebenen dosisabhängigen Effekte der untersuchten Analoga zu erhalten.

Weiterhin wurden die Effekte der einzelnen Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen verglichen und vorhandene Unterschiede in der Wirkpotenz der Analoga aufgezeigt. So konnte ein direkter Vergleich in Bezug auf eine dosisabhängige Wirkung der unterschiedlichen Analoga gezogen werden. Zusätzlich ließ sich durch diese Versuchsanordnung eine Aussage über eine organspezifische Wirkung der GnRH-Agonisten und -Antagonisten ableiten.

2 MATERIAL UND METHODEN

Die Proliferationsversuche an den Zelllinien HEC-1A, MCF-7, EFO-21 und EFO-27 mit den GnRH-Analoga Triptorelin, Buserelin, Goserelin, Leuprorelin, Ramorelix und Cetrorelix wurden in fünftägiger Dauer und unter jeweils identischen Kulturbedingungen durchgeführt. Ziel war die Erfassung der dosisabhängigen Wirkung der GnRH-Analoga im direkten Vergleich. In den folgenden Unterkapiteln werden die eingesetzten Chemikalien und Lösungen, die verwendeten Zelllinien, die genaue Handhabung und die Kulturbedingungen der Versuchsreihen dargestellt.

2.1 Chemikalien und Lösungen

2.1.1 Liste der Chemikalien

| | | | |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------|-------------|
| Albumin bovine | | Sigma | Deisenhofen |
| BSA | Rinderserumalbumin | Sigma | München |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | Serva | Heidelberg |
| FCS | Fötales Kälberserum | Boehringer | Mannheim |
| Gentamycinsulfat | | Biochrom | Berlin |
| Instamed MEM Earle | | Biochrom | Berlin |
| Insulin | | Hoechst- Behring | Frankfurt |
| KCl | Kaliumchlorid | Merck | Darmstadt |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat | Merck | Darmstadt |
| NaCl | Natriumchlorid | Merck | Darmstadt |
| NaHCO ₃ | Natriumhydrogencarbonat | Merck | Darmstadt |
| Na ₂ HPO ₄ | Dinatriumhydrogenphosphat | Merck | Darmstadt |
| NaOH | | Merck | Darmstadt |
| PBS | Phosphate buffered saline | Merck | Darmstadt |
| Transferrin | | Sigma | München |
| Trypsin bovine | | Serva | Heidelberg |

Tabelle 1: Chemikalienliste

2.1.2 Lösungen

2.1.2.1 Kulturmedium

Das verwendete Medium hatte Minimal Essential Medium (MEM; Eagle, 1959), ergänzt mit Earle's Salze (NaCl 6800 mg/l, KCl 400 mg/l, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 140 mg/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 mg/l, CaCl 200 mg/l, D-Glucose 1000 mg/l, NaHCO_3 2200 mg/l), zur Grundlage. Das Medium wurde in Pulverform (Instamed MEM Earle, Biochrom, Berlin) in Aqua bidest gelöst und steril gefiltert (Cellulose Nitrat Filter, Sartorius, Göttingen, und Tiefenfilter, Seitz-Filter-Werke, Bad Kreuznach). Dem Medium wurden jeweils essentielle/nichtessentielle Aminosäuren und die doppelte MEM-Konzentration an Vitaminen zugesetzt.

Dieses Medium wurde vor der sterilen Filtration mittels Natriumhydrogencarbonatlösung auf einen pH-Wert von 7,4–7,6 eingestellt.

| | |
|-------------------------|--------------------------|
| 2,5 mg/ml Transferrin | 67 mg/L Gentamycinsulfat |
| 40 IU/l Insulin | 2,2 g/L NaHCO_3 |
| 10% fötales Kälberserum | |

Tabelle 2: Zusammensetzung des Mediums

2.1.2.2 PBS/BSA-Lösung

Die PBS/BSA-Lösung, Phosphate buffered saline, diente als isotone Pufferlösung bei der Herstellung der Verdünnungsreihe. Der pH-Wert wurde auf 7,2–7,4 eingestellt.

| |
|----------------------------------------------------------|
| 140 mmol/L NaCl |
| 3 mmol/L KCl |
| 8 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ |
| 1,5 mmol/L KH_2PO_4 |
| 3 g/L Rinderserumalbumin |

Tabelle 3: Zusammensetzung der Pufferlösung

2.1.2.3 Trypsin-Lösung

Die 0,5% Trypsin-Lösung diente zur Ablösung der Zellen aus der Haftung in den Kulturflaschen und den Versuchsschalen. Die Grundlösung bestand aus PBS und BSA mit folgenden Zusätzen:

| | |
|-----------------|-------------------------|
| 2,5 mmol/L EDTA | 2000U/l Trypsin, pH 7,2 |
|-----------------|-------------------------|

Tabelle 4: Zusammensetzung der Trypsin-Lösung

2.1.2.4. GnRH-Agonisten und -Antagonisten

Die Substanzen wurden als Pulver in wenigen μ l 0,1 molarer Essigsäure gelöst und mit PBS-Lösung wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 5×10^{-4} mol/l hergestellt. Der pH-Wert wurde mittels 0,1 molarer Salzsäure oder Natronlauge auf 7,6 eingestellt. Die so erzeugte Lösung konnte bei -20°C eingefroren werden. Aufgetaut war sie sofort zu verwenden und kein zweites Mal einzufrieren.

2.2 Zellkulturen

2.2.1 Zelllinien

Für die Untersuchung der Proliferationshemmung der verschiedenen GnRH-Analoga standen jeweils intensiv charakterisierte und adhärent wachsende Zelllinien zur Verfügung: die Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27 (Simon et al. 1983), die Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1A (Kuramoto et al. 1972) und die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 (Dr. Hackenberg, Marburg).

Die Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27 stammten aus der Eppendorfer Universitätsfrauenklinik Hamburg (Prof. Dr. Hölzel). Die Zelllinie EFO-21 wurde aus der Aszitesflüssigkeit einer 56-jährigen Patientin mit einem serösen, entdifferenzierten Adenokarzinom des Ovars entnommen. Die Zelllinie EFO-27 stammte aus einem serös-papillären, mäßig differenzierten Ovarialkarzinom einer 36-jährigen Patientin.

Die Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1A wurde aus einem papillären, schwach differenzierten Adenokarzinom einer 71-jährigen Frau angezüchtet und von dem Labor von Prof. Dr. T. Bauknecht, Universitätsfrauenklinik Freiburg, zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinie MCF-7 stammte aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen Patientin mit einem metastasierten Mammakarzinom und kam aus Maryland, USA.

2.2.2 Kultivierung

Die Zellkulturen wurden in Plastikzellkulturflaschen (80 cm²) der Firma Nunc, Wiesbaden, in Brutschränken der Firma Heraeus, Hanau, bei 37°C und wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ gehalten. Das sterile Verarbeiten der Zellkulturen fand an Werkbänken der Firma Cryo-Technik, Hamburg, Modelle DFOP 18IIS und DFOP 12S statt.

2.2.2.1 Passagieren

In bestimmten Zeitabständen, die sich nach den Wachstumseigenschaften der jeweiligen Zelllinie richteten, wurden adhärente Zellen, die an dem Plastikboden der Kulturflaschen hafteten und eine 80–90%ige Konfluenz erreicht hatten, mit 5ml Trypsin-Lösung für fünf bis zehn Minuten im Brutschrank inkubiert.

Durch Anschlag der Flasche lösten sich die Zellen, danach wurde die Flasche mit 20ml Medium aufgefüllt. Der Vorgang wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Anschließend wurde die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die so abgelösten Zellen konnten auf neue Kulturflaschen verteilt und für Versuche ausgesät werden, überschüssige Zellen wurden für die Langzeitkonservierung tiefgefroren.

2.2.2.2 Kryokonservierung

Für die Langzeitkonservierung wurden die Zellen in einer Kühleinheit bei -80°C tiefgefroren (Tiefgefriertruhe, Firma Heraeus, Hanau). Hierzu wurden die Zellen abtrypsiniert. Die Trypsin-Zell-Suspension wurde mit gleichem Volumenanteil Wachstumsmedium vermischt und in ein steriles Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach Zentrifugation (10 Min, $30\times g$) der Suspension wurde der Überstand verworfen. Das verbleibende Zellpellet wurde in 0,9ml Wachstumsmedium aufgelöst und für zwei Stunden bei -80°C tiefgekühlt. Danach wurde 0,9ml 10%iges Dimethylsulfoxid (DMSO, Firma Serva, Heidelberg) dazugegeben und alles in ein Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) gefüllt. Anschließend wurden die so vorbereiteten Zellen bei -80°C eingefroren.

Bei Bedarf konnten die Zellen wieder aufgetaut werden. Nach Abzentrifugieren der DMSO-Lösung wurde das Zellpellet mit 20ml Wachstumsmedium in eine Kulturflasche gegeben und im Brutschrank neu angezchtet.

2.3 Versuchsaufbau

Nach Abtrypsinieren des Zellmonolayers aus der Kulturflasche (siehe 2.2.2.1) wurde die Zellzahl bestimmt und in einer definierten Dichte von 15.000 Zellen/ml wurden die Zellen in 4-Well-Kulturschalen (Nunc, Wiesbaden) ausgesät und für 24 Stunden inkubiert.

Nach dieser Anwachsphase (Tag 0) fand ein Wechsel der Nährlösung statt und es wurde eine Kontrollauszählung einer Kulturschale in der Zählkammer mit dem Phasenkontrastmikroskop durchgeführt. In einer Fuchs-Rosenthal-Kammer mit dem Rauminhalt von $3,2\ \mu\text{l}$ (Fläche: $16\ \text{mm}^2$, Tiefe: $0,2\ \text{mm}^2$) wurden die Zellen ausgezählt und festgehalten.

Für die Austestung der dosisabhängigen Wirkung der Substanzen wurden die einzelnen Schalen parallel mit dem Versuchsmedium mit der zu testenden Substanz bzw. als Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen PBS/BSA-Puffer versetzt und für fünf Tage inkubiert. Man erhielt so eine Kontrollschale und 30 Schalen, die die jeweiligen GnRH-Analoga in fünf unterschiedlichen Konzentrationen enthielten.

2.3.1 Proliferationsassay

Die 4-Well-Clusterschalen wurden am Tag 0 mit 20µl der entsprechenden Lösung beimpft.

Für jede Substanz (Triptorelin, Buserelin, Leuprorelin, Goserelin, Cetrorelix und Ramorelix) wurden sechs Clusterschalen in oben genannter Form hergestellt, jeweils in fünf verschiedenen Endkonzentrationen (10^{-5} mol/L, 10^{-6} mol/L, 10^{-7} mol/L, 10^{-9} mol/L, 10^{-11} mol/L durch Verdünnung mit PBS), und eine Kontrollschale, die mit 20µl PBS/BSA-Puffer beimpft wurde. Alle wurden für fünf Tage im Brutschrank inkubiert.

Nach fünf Tagen wurde das Medium der einzelnen Wells der Schalen vorsichtig abgenommen und jedes Well mit 25µl Trypsin vorgespült und dann mit 1ml Trypsin für fünf Minuten inkubiert. Nach der Kontrolle der Ablösung der Zellen unter dem Lichtmikroskop wurde mit Eppendorf-Pipetten jedes Well im Uhrzeigersinn gespült und mit einer 20µl-Pipette wurde die Zellsuspension in der Neubauer-Zählkammer (FA Zeiss, Oberkochen) unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und festgehalten. Eine fünftägige Versuchsdauer wurde gewählt, da hier ein optimales Wachstum des Zellrasens in Form einer Monolage (Monolayer) gewährleistet war.

2.4 Statistische Auswertung

Nach Erhebung der Daten wurden folgende Auswertungen (Kapitel 3) durchgeführt. Die angegebenen Daten sind arithmetische Mittelwerte und die Standardabweichungen der einzelnen Versuche. Die Anzahl der durchgeführten Experimente betrug acht in unterschiedlichen Passagen der jeweiligen Zelllinie.

Innerhalb der einzelnen Versuchsreihen wurden Unterschiede zwischen den Mittelwerten anhand der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA-Test, ordinary measures of analysis of variance) und durch eine Varianzanalyse mit anschließendem Newmann-Keuls-Test geprüft. Signifikante Unterschiede wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,001$ angenommen.

Verwendete Programme: GraphPad Prism Version 3.00, 1999, GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA.

3 ERGEBNISSE

Die Expression von GnRH-Rezeptoren und GnRH in Ovarial-, Endometrium- und Mammakarzinomzelllinien wurde von mehreren Gruppen dargestellt. Der Effekt von GnRH-Analoga wurde in vielen Studien in-vitro untersucht und es sind teilweise widersprüchliche Effekte in Bezug auf Hemmung und Wirkung beschrieben worden. Zur Klärung der Effekte von GnRH-Analoga auf das Proliferationsverhalten von Karzinomzelllinien wurde vorhergehend beschriebener Versuchsaufbau vorgenommen. In folgender Darstellung sind die Ergebnisse aufgeführt.

3.1 Dosisabhängiger Einfluss von GnRH-Agonisten und -Antagonisten auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an der Zelllinie MCF-7 zeigte sich, dass

- 1.) alle Analoga einen antiproliferativen Effekt zeigten.
- 2.) der Agonist Triptorelin in allen untersuchten Konzentrationen eine größere Proliferationshemmung der Zelllinie MCF-7 bewirkte als die Agonisten Goserelin, Buserelin, Leuprorelin und die Antagonisten Cetrorelix und Ramorelix.

Der GnRH-Agonist Triptorelin zeigte in allen untersuchten Konzentrationen die größte Wachstumsinhibition der Zelllinie. Bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L ergaben sich Zellzahlen von $64,8\% \pm 3,59$ im Vergleich zur Kontrolle (100%).

Der Agonist Goserelin zeigte sich in allen Konzentrationen wirkungsvoller in Bezug auf die Proliferationshemmung als die Agonisten Buserelin und Leuprorelin. Es ergaben sich für Goserelin bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L Zellzahlen von $68,4\% \pm 2,3$ im Vergleich zur Kontrolle (100%).

Der Agonist Buserelin zeigte maximale Werte der Zellzahl von $71,9\% \pm 1,3$ und der Agonist Leuprorelin maximale Werte von $71,5\% \pm 1,4$ in Bezug auf die Kontrolle (100%) bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L.

Der Antagonist Ramorelix zeigte ähnliche Werte wie der Agonist Goserelin, es stellten sich aber im Bereich der Konzentrationen von 10^{-7} mol/L bis 10^{-11} mol/L

niedrigere Zellzahlen heraus. In der Konzentration von 10^{-5} mol/L zeigte Ramorelix, mit $69,0\% \pm 1,1$ im Vergleich zur Kontrolle (100%), eine um 0,6% höhere Zellzahl als der Agonist Goserelin.

Der Antagonist Cetrorelix war in Bezug auf eine Proliferationshemmung in allen Konzentrationen wirkungsvoller als die Agonisten Buserelin und Leuprorelin. Bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L ergab sich eine Zellzahl von $70,1\% \pm 1,6$ im Vergleich zur Kontrolle (100%). Bei der Anfangskonzentration von 10^{-11} mol/L zeigte sich der Antagonist Cetrorelix jedoch den beiden Agonisten unterlegen.

3.1.1 Darstellung der Ergebnisse in Tabellenform

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse des Proliferationsverhaltens der Karzinomzelllinie MCF-7 unter Einfluss der verschiedenen GnRH-Analoga aufgeführt:

| Konzentration mol/L | Triptorelin | Buserelin | Goserelin | Leuprorelin | Cetrorelix | Ramorelix |
|------------------------|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 10 ⁻¹¹ | 96,3 ± 1,7 <i>a, c, d, e, f</i> | 99,8 ± 1,5 <i>b</i> | 98,5 ± 0,8 <i>b</i> | 99,1 ± 1,1 <i>b</i> | 100 ± 0,9 <i>b</i> | 98,1 ± 0,9 |
| 10 ⁻⁹ | 88,4 ± 2,7 <i>a, c</i> | 93,1 ± 1,6 <i>a</i> | 92,0 ± 3,4 <i>a</i> | 92,0 ± 1,3 <i>a</i> | 91,9 ± 1,1 <i>a</i> | 91,4 ± 2,9 <i>a</i> |
| 10 ⁻⁷ | 79,5 ± 2,2 <i>a, c, d, e</i> | 86,4 ± 1,7 <i>a, b</i> | 84,3 ± 2,4 <i>a, b</i> | 84,6 ± 1,9 <i>a, b</i> | 84,3 ± 2,4 <i>a, b</i> | 82,8 ± 2,4 <i>a, b</i> |
| 10 ⁻⁶ | 72,5 ± 3,3 <i>a, c, d, e, f, g</i> | 78,8 ± 1,0 <i>a, b</i> | 76,4 ± 2,5 <i>a, b</i> | 77,5 ± 1,9 <i>a, b</i> | 77,0 ± 2,6 <i>a, b</i> | 75,3 ± 1,8 <i>a, b</i> |
| 10 ⁻⁵ | 64,8 ± 3,6 <i>a, c, d, e, f, g</i> | 71,9 ± 1,3 <i>a, b</i> | 68,4 ± 2,3 <i>a, b</i> | 71,5 ± 1,4 <i>a, b</i> | 70,1 ± 1,6 <i>a, b</i> | 69,0 ± 1,1 <i>a, b</i> |

Tabelle 5: Ergebnisse der Proliferationsassays der Zelle MCF-7. Die Ergebnisse sind dargestellt als die jeweiligen Mittelwerte aus acht Einzelassays in [% ± SD] nach fünf Tagen Behandlung. ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test.

a: p<0,001 versus Kontrolle, *b*: p<0,001 versus Triptorelin, *c*: p<0,001 versus Buserelin, *d*: p<0,001 versus Goserelin, *e*: p<0,001 versus Leuprorelin, *f*: p<0,001 versus Cetrorelix, *g*: p<0,001 versus Ramorelix.

3.1.2 Darstellung der Ergebnisse als Balkendiagramm

In den folgenden Schaubildern ist die Zellproliferation der Zelllinie MCF-7 nach Inkubation mit den GnRH-Analoga über fünf Tage in den Konzentrationen von 10⁻¹¹ mol/L, 10⁻⁷ mol/L und 10⁻⁵ mol/L graphisch dargestellt. Die Werte sind als Mittelwerte aus acht Versuchen in Bezug auf die Kontrolle mit der Standardabweichung abgebildet. Die statistische Signifikanz ist als x gezeigt. Sie kennzeichnet die signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten auf die unterschiedlichen GnRH-Analoga.

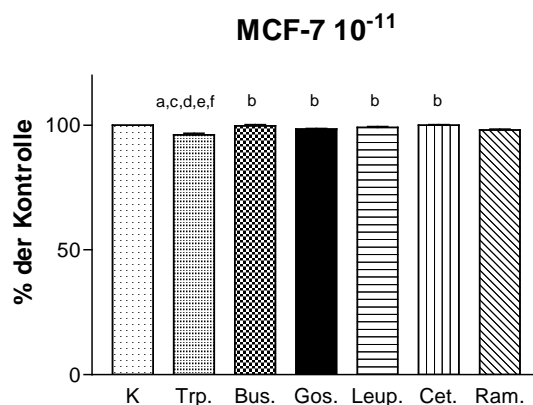


Abbildung 3: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie MCF-7. Gibt die Zellproliferation der Zelle MCF-7 nach Inkubation mit GnRH-Analoga für fünf Tage bei einer Konzentration von 10^{-11} mol/L in % \pm SD der Kontrolle (K) wieder. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) sind gekennzeichnet.

a: $p < 0,001$ versus Kontrolle, b: $p < 0,001$ versus Triptorelin, c: $p < 0,001$ versus Buserelin, d: $p < 0,001$ versus Goserelin, e: $p < 0,001$ versus Leuprorelin, f: $p < 0,001$ versus Cetorelix, g: $p < 0,001$ versus Ramorelix.

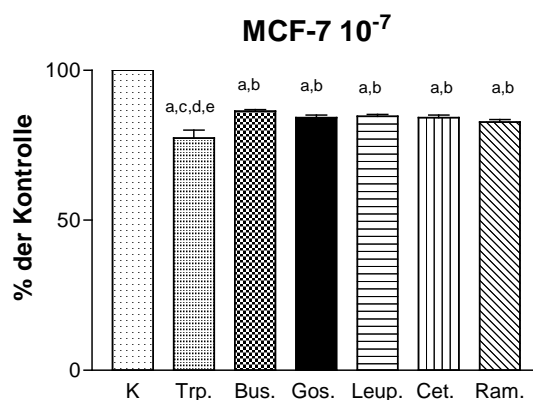


Abbildung 4: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie MCF-7. Gibt die Zellproliferation der Zelle MCF-7 nach Inkubation mit GnRH-Analoga für fünf Tage bei einer Konzentration von 10^{-7} mol/L in % \pm SD der Kontrolle (K) wieder. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) sind gekennzeichnet.

a: $p < 0,001$ versus Kontrolle, b: $p < 0,001$ versus Triptorelin, c: $p < 0,001$ versus Buserelin, d: $p < 0,001$ versus Goserelin, e: $p < 0,001$ versus Leuprorelin, f: $p < 0,001$ versus Cetorelix, g: $p < 0,001$ versus Ramorelix.

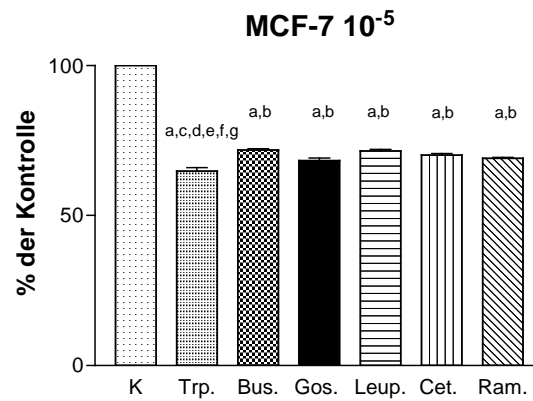


Abbildung 5: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie MCF-7. Gibt die Zellproliferation der Zelle MCF-7 nach Inkubation mit GnRH-Analoga für fünf Tage bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L in % \pm SD der Kontrolle (K) wieder. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) sind gekennzeichnet.

a: $p < 0,001$ versus Kontrolle, b: $p < 0,001$ versus Triptorelin, c: $p < 0,001$ versus Buserelin, d: $p < 0,001$ versus Goserelin, e: $p < 0,001$ versus Leuprorelin, f: $p < 0,001$ versus Cetorelix, g: $p < 0,001$ versus Ramorelix.

3.2 Dosisabhängiger Einfluss von GnRH-Agonisten und -Antagonisten auf die Proliferation der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-21

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an der Zelllinie EFO-21 zeigte sich, dass

- 1.) alle Analoga einen antiproliferativen dosisabhängigen Effekt zeigten.
- 2.) der Agonist Triptorelin in allen untersuchten Konzentrationen eine größere Proliferationshemmung der Zelllinie EFO-21 bewirkte als die Agonisten Goserelin, Buserelin, Leuprorelin und die Antagonisten Cetrorelix und Ramorelix.

Die Zellzahl von Triptorelin betrug $66,2\% \pm 5,2$ im Vergleich zur Kontrolle (100%) in einer Konzentration von 10^{-5} mol/L. Keine andere getestete Substanz erreichte Zellzahlen unter 70% im Vergleich zur Kontrolle (100%).

Der Agonist Goserelin zeigte nach Triptorelin den größten Effekt bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L und einer Zellzahl von $71\% \pm 4,1$ in Bezug auf die Kontrolle (100%). Analoge Effekte wie Goserelin zeigte der GnRH-Antagonist Ramorelix mit einem Mittelwert von $71,2\% \pm 5,9$ als Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle (100%).

Bei den weiteren Agonisten Buserelin, Leuprorelin und dem Antagonisten Cetrorelix ergaben sich in Bezug auf die Inhibition des Zellwachstums nur sehr geringe Unterschiede. Der Antagonist Cetrorelix zeigte mit maximalen Zellzahlen von $73,8\% \pm 5,4$ in den Konzentrationen 10^{-7} mol/L bis 10^{-5} mol/L einen größeren Einfluss auf die Proliferation als die Agonisten Buserelin und Leuprorelin, die bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L maximale Zellzahlen von $75,8\% \pm 4$ bzw. $75,7\% \pm 3,9$ im Vergleich zur Kontrolle (100%) aufwiesen.

Der Vergleich der beiden GnRH-Antagonisten Ramorelix und Cetrorelix ergab, dass in jeder der untersuchten Konzentration Ramorelix eine niedrigere Zellzahl der Zelllinie EFO-21 als Cetrorelix bewirkte.

Alle untersuchten Substanzen zeigten eine dosisabhängige Wirkung auf das Proliferationsverhalten der Zelllinie EFO-21, die jeweils signifikant im Hinblick auf den als Goldstandard angenommenen Agonisten Triptorelin war.

3.2.1. Darstellung der Ergebnisse in Tabellenform

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse des Proliferationsverhaltens der Karzinomzelllinie EFO-21 unter Einfluss der verschiedenen GnRH-Analoga aufgeführt.

| Konzentration mol/L | Triptorelin | Buserelin | Goserelin | Leuprorelin | Cetrorelix | Ramorelix |
|------------------------|---------------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| 10 ⁻¹¹ | 94,3 ± 4,2 <i>a</i> | 96,2 ± 4,2 | 95,7 ± 4,0 <i>a</i> | 97,1 ± 4,2 | 97,3 ± 2,9 | 96,3 ± 3,2 |
| 10 ⁻⁹ | 86,8 ± 3,8 <i>a, e, f</i> | 91,7 ± 2,2 <i>a</i> | 90,3 ± 3,1 <i>a</i> | 92 ± 2,9 <i>a</i> | 91,5 ± 2,1 <i>a, b</i> | 89,8 ± 2,2 <i>a</i> |
| 10 ⁻⁷ | 79,5 ± 5,5 <i>a, c, e, f</i> | 87 ± 2,9 <i>a, b</i> | 83,1 ± 4,6 <i>a</i> | 86,3 ± 3,9 <i>a, b</i> | 85,8 ± 3,4 <i>a, b</i> | 84,2 ± 3,3 <i>a</i> |
| 10 ⁻⁶ | 73,0 ± 5,3 <i>a</i> | 80,6 ± 4,7 <i>a</i> | 76,2 ± 4,6 <i>a</i> | 80,3 ± 4,2 <i>a</i> | 78,6 ± 5,5 <i>a</i> | 76 ± 4,9 <i>a</i> |
| 10 ⁻⁵ | 66,2 ± 5,2 <i>a, c, e, f</i> | 75,8 ± 4 <i>a, b</i> | 71 ± 4,1 <i>a</i> | 75,7 ± 3,9 <i>a, b</i> | 73,8 ± 5,4 <i>a, b</i> | 71,2 ± 5,9 <i>a</i> |

Tabelle 6: Ergebnisse der Proliferationsassays der Zelle EFO-21. Die Ergebnisse sind dargestellt als die jeweiligen Mittelwerte aus acht Einzelassays in [% ± SD] nach fünf Tagen Behandlung. ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test.

a: p<0,001 versus Kontrolle, *b:* p<0,001 versus Triptorelin, *c:* p<0,001 versus Buserelin, *d:* p<0,001 versus Goserelin, *e:* p<0,001 versus Leuprorelin, *f:* p<0,001 versus Cetrorelix, *g:* p<0,001 versus Ramorelix.

3.2.2 Darstellung der Ergebnisse als Balkendiagramm

In den folgenden Schaubildern ist die Zellproliferation der Zelllinie EFO-21 nach Inkubation mit den GnRH-Analoga über fünf Tage in den Konzentrationen von 10⁻¹¹ mol/L, 10⁻⁷ mol/L und 10⁻⁵ mol/L graphisch dargestellt. Die Werte sind als Mittelwerte aus acht Versuchen in Bezug auf die Kontrolle mit der Standardabweichung abgebildet. Die statistische Signifikanz ist als *x* gezeigt. Sie kennzeichnet die signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten auf die unterschiedlichen GnRH-Analoga.

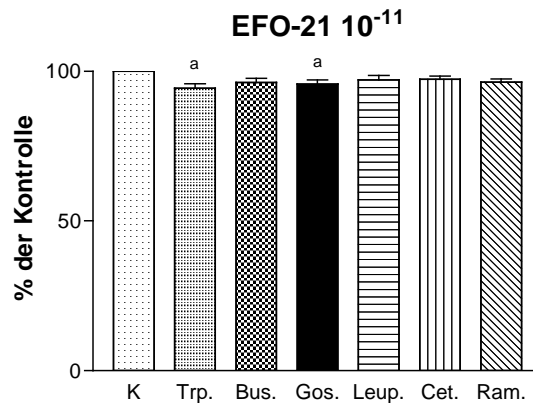


Abbildung 6: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie EFO-21. Gibt die Zellproliferation der Zelle EFO-21 nach Inkubation mit GnRH-Analoga für fünf Tage bei einer Konzentration von 10^{-11} mol/L in % \pm SD der Kontrolle (K) wieder. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) sind gekennzeichnet.

a: $p < 0,001$ versus Kontrolle, b: $p < 0,001$ versus Triptorelin, c: $p < 0,001$ versus Buserelin, d: $p < 0,001$ versus Goserelin, e: $p < 0,001$ versus Leuprorelin, f: $p < 0,001$ versus Cetrorelix, g: $p < 0,001$ versus Ramorelix.

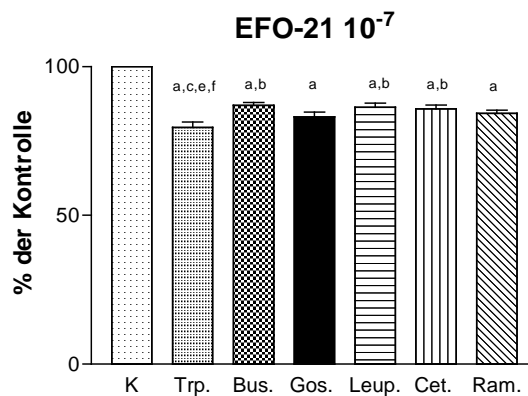


Abbildung 7: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie EFO-21. Gibt die Zellproliferation der Zelle EFO-21 nach Inkubation mit GnRH-Analoga für fünf Tage bei einer Konzentration von 10^{-7} mol/L in % \pm SD der Kontrolle (K) wieder. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) sind gekennzeichnet.

a: $p < 0,001$ versus Kontrolle, b: $p < 0,001$ versus Triptorelin, c: $p < 0,001$ versus Buserelin, d: $p < 0,001$ versus Goserelin, e: $p < 0,001$ versus Leuprorelin, f: $p < 0,001$ versus Cetrorelix, g: $p < 0,001$ versus Ramorelix.

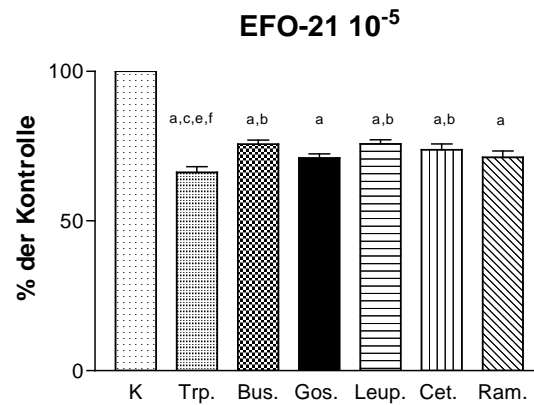


Abbildung 8: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie EFO-21. Gibt die Zellproliferation der Zelle EFO-21 nach Inkubation mit GnRH-Analoga für fünf Tage bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L in % \pm SD der Kontrolle (K) wieder. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) sind gekennzeichnet.

a: $p < 0,001$ versus Kontrolle, b: $p < 0,001$ versus Triptorelin, c: $p < 0,001$ versus Buserelin, d: $p < 0,001$ versus Goserelin, e: $p < 0,001$ versus Leuprorelin, f: $p < 0,001$ versus Cetorelix, g: $p < 0,001$ versus Ramorelix.

3.3 Dosisabhängiger Einfluss von GnRH-Agonisten und -Antagonisten auf die Proliferation der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an der Zelllinie EFO-27 zeigte sich, dass

- 1.) alle Agonisten eine antiproliferative dosisabhängige Wirkung zeigten.
- 2.) die Antagonisten nur eine marginale antiproliferative Wirkung aufzeigten, die auch keine Dosisabhängigkeit zeigt.

Der Agonist Triptorelin bewirkte in allen untersuchten Konzentrationen eine größere Proliferationshemmung der Zelllinie EFO-27 als die Agonisten Goserelin, Buserelin, Leuprorelin und die Antagonisten Cetrorelix und Ramorelix.

Triptorelin zeigte bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L eine maximale Zellzahl von $68\% \pm 2,4$ im Vergleich zur Kontrolle (100%) und war effektiver als alle anderen Analoga.

Der Agonist Goserelin war mit maximalen Werten der Zellzahlen von $74\% \pm 2,39$ im Vergleich zur Kontrolle (100%) in den Konzentrationen 10^{-7} mol/L bis 10^{-5} mol/L effektiver als die Agonisten Leuprorelin und Buserelin und die Antagonisten.

Der Agonist Buserelin zeigte mit einer maximalen Zellzahl von $77,3\% \pm 3,1$ bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L in Bezug auf die Kontrolle (100%) eine bessere Hemmungsrate als der Agonist Leuprorelin mit einer Zellzahl von $78,2\% \pm 1,7$.

Bei den Antagonisten Cetrorelix und Ramorelix blieb ein antiproliferativer Effekt in allen Konzentrationen aus. Es fanden sich Zellzahlen von $96,2\% \pm 5,7$ und $94,3\% \pm 3,3$ im Vergleich zur Kontrolle (100%) bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L. Die erhobenen Daten lassen keine dosisabhängige Wirkung der untersuchten Antagonisten in jeder untersuchten Konzentration auf die Zelllinie EFO-27 erkennen.

3.3.1 Darstellung der Ergebnisse in Tabellenform

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse des Proliferationsverhaltens der Karzinomzelllinie EFO-27 unter Einfluss der verschiedenen GnRH-Analoga aufgeführt.

| Konzentration mol/L | Triptorelin | Buserelin | Goserelin | Leuprorelin | Cetrorelix | Ramorelix |
|------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 10^{-11} | 97,6 ± 5,9 | 96,6 ± 1,7 | 97,7 ± 2,8 | 97,2 ± 1,7 | 103,6 ± 6,4 | 98 ± 4,6 |
| 10^{-9} | 89,6 ± 3,0 <i>a,f,g</i> | 92,3 ± 2,8 <i>a,f</i> | 91,3 ± 2 <i>a,f</i> | 93,7 ± 2,1 <i>a</i> | 99 ± 4,2 <i>b,c,d</i> | 96,5 ± 3,6 |
| 10^{-7} | 82,1 ± 4,1 <i>a,f,g</i> | 86,7 ± 2,4 <i>a,f,g</i> | 84,7 ± 2,8 <i>a,f,g</i> | 88,1 ± 1,5 <i>a,f,g</i> | 96,5 ± 6 <i>b,c,d,e</i> | 95,1 ± 5,1 <i>b,c,d,e</i> |
| 10^{-6} | 74,1 ± 2,5 <i>a,c,e,f,g</i> | 82,7 ± 3,6 <i>a,b,f,g</i> | 79,1 ± 2,5 <i>a,f,g</i> | 82,0 ± 1,4 <i>a,b,f,g</i> | 97,6 ± 6,0 <i>b,c,d,e</i> | 96,1 ± 2,3 <i>b,c,d,e</i> |
| 10^{-5} | 68 ± 2,4 <i>a,c,d,e,f,g</i> | 77,3 ± 3,1 <i>a,b,f,g</i> | 74 ± 2,39 <i>a,b,f,g</i> | 78,2 ± 1,7 <i>a,b,f,g</i> | 96,2 ± 5,7 <i>b,c,d,e</i> | 94,3 ± 3,3 <i>b,c,d,e</i> |

Tabelle 7: Ergebnisse der Proliferationsassays der Zelle EFO-27. Die Ergebnisse sind dargestellt als die jeweiligen Mittelwerte aus acht Einzelassays in [% ± SD] nach fünf Tagen Behandlung. ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test.

a: $p < 0,001$ versus Kontrolle, b: $p < 0,001$ versus Triptorelin, c: $p < 0,001$ versus Buserelin, d: $p < 0,001$ versus Goserelin, e: $p < 0,001$ versus Leuprorelin, f: $p < 0,001$ versus Cetrorelix, g: $p < 0,001$ versus Ramorelix.

3.3.2 Darstellung der Ergebnisse als Balkendiagramm

In den folgenden Schaubildern ist die Zellproliferation der Zelllinie EFO-27 nach Inkubation mit den GnRH-Analoga über fünf Tage in den Konzentrationen von 10^{-11} mol/L, 10^{-7} mol/L und 10^{-5} mol/L graphisch dargestellt. Die Werte sind als Mittelwerte aus acht Versuchen in Bezug auf die Kontrolle mit der Standardabweichung abgebildet. Die statistische Signifikanz ist als x gezeigt. Sie kennzeichnet die signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten auf die unterschiedlichen GnRH-Analoga.

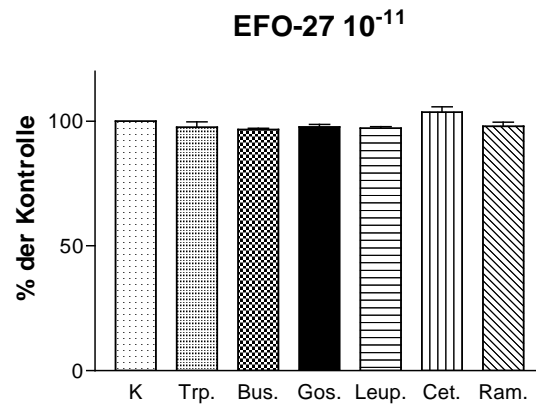


Abbildung 9: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie EFO-27. Gibt die Zellproliferation der Zelle EFO-27 nach Inkubation mit GnRH-Analoga für fünf Tage bei einer Konzentration von 10^{-11} mol/L in % \pm SD der Kontrolle (K) wieder. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) sind gekennzeichnet.

a: $p < 0,001$ versus Kontrolle, b: $p < 0,001$ versus Triptorelin, c: $p < 0,001$ versus Buserelin, d: $p < 0,001$ versus Goserelin, e: $p < 0,001$ versus Leuprorelin, f: $p < 0,001$ versus Cetorelix, g: $p < 0,001$ versus Ramorelix.

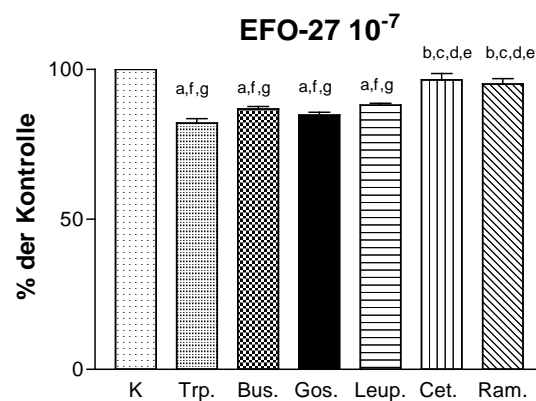


Abbildung 10: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie EFO-27. Gibt die Zellproliferation der Zelle EFO-27 nach Inkubation mit GnRH-Analoga für fünf Tage bei einer Konzentration von 10^{-7} mol/L in % \pm SD der Kontrolle (K) wieder. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) sind gekennzeichnet.

a: $p < 0,001$ versus Kontrolle, b: $p < 0,001$ versus Triptorelin, c: $p < 0,001$ versus Buserelin, d: $p < 0,001$ versus Goserelin, e: $p < 0,001$ versus Leuprorelin, f: $p < 0,001$ versus Cetorelix, g: $p < 0,001$ versus Ramorelix.

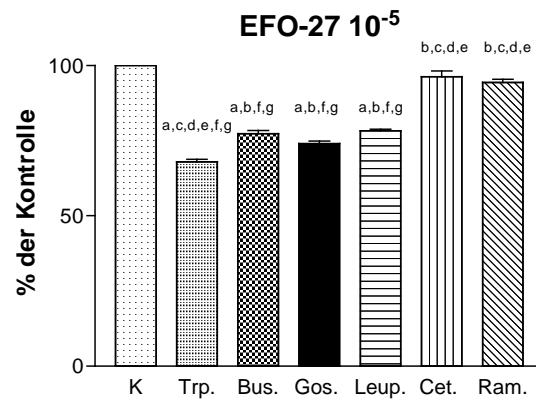


Abbildung 11: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie EFO-27. Gibt die Zellproliferation der Zelle EFO-27 nach Inkubation mit GnRH-Analoga für fünf Tage bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L in % \pm SD der Kontrolle (K) wieder. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) sind gekennzeichnet.

a: $p < 0,001$ versus Kontrolle, b: $p < 0,001$ versus Triptorelin, c: $p < 0,001$ versus Buserelin, d: $p < 0,001$ versus Goserelin, e: $p < 0,001$ versus Leuprorelin, f: $p < 0,001$ versus Cetorelix, g: $p < 0,001$ versus Ramorelix.

3.4 Dosisabhängiger Einfluss von GnRH-Agonisten und -Antagonisten auf die Proliferation der Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1A

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an der Zelllinie HEC-1A zeigte sich, dass

- 1.) alle Analoga eine antiproliferative dosisabhängige Wirkung zeigten.
- 2.) der Agonist Triptorelin in allen untersuchten Konzentrationen eine größere Proliferationshemmung der Zelllinie HEC-1A bewirkte als die Agonisten Goserelin, Buserelin, Leuprorelin und die Antagonisten Cetrorelix und Ramorelix. Eine Signifikanz in der Varianzanalyse zeigte sich hier nicht.

Der Agonist Triptorelin ergab bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L eine Zellzahl von $66,3\% \pm 6,6$ im Vergleich zur Kontrolle (100%).

Der Agonist Goserelin war im Vergleich zu den Agonisten Buserelin und Leuprorelin effektiver – aber nicht signifikant –, dies zeigte sich vor allem in der Konzentration von 10^{-9} mol/L mit einer Zellzahl von $86,8\% \pm 7,8$ im Vergleich zur Kontrolle (100%). Bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L ergab sich eine Zellzahl von $71,5\% \pm 4,8$ im Vergleich zur Kontrolle (100%).

Der Agonist Buserelin war mit einer Zellzahl von $75,7\% \pm 3,2$ dem Agonisten Leuprorelin bei der Konzentration von 10^{-5} mol/L nicht signifikant unterlegen. Bei dieser Konzentration ergab sich für den Agonisten Leuprorelin eine Zellzahl von $74,8\% \pm 3,4$.

Der Vergleich der Antagonisten zeigte, dass Ramorelix in allen Konzentrationen effektiver – aber nicht signifikant – als Cetrorelix und die Agonisten Buserelin und Leuprorelin war. In einer Konzentration von 10^{-5} mol/L ergab es eine maximale Zellzahl von $69,7\% \pm 5,3$ und erreichte eine größere Wachstumshemmung als der Agonist Goserelin in dieser Konzentration.

Der Antagonist Cetrorelix zeigte bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L Zellzahlen von $73,3\% \pm 3,8$ im Vergleich zur Kontrolle (100%). Im Vergleich zu den Agonisten Buserelin und Leuprorelin ergab sich hier eine niedrigere Zellzahl bei fehlender Signifikanz.

3.4.1. Darstellung der Ergebnisse in Tabellenform

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse des Proliferationsverhaltens der Karzinomzelllinie HEC-1A unter Einfluss der verschiedenen GnRH-Analoga aufgeführt.

| Konzentration mol/L | Triptorelin | Buserelin | Goserelin | Leuprorelin | Cetrorelix | Ramorelix |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 10^{-11} | 95,7 ± 3,9 | 99,1 ± 1,4 | 99,1 ± 1,4 | 97,7 ± 1,8 | 99,3 ± 2,3 | 96 ± 2,5 |
| 10^{-9} | 85,1 ± 5,8 <i>a</i> | 91,7 ± 3,8 <i>a</i> | 86,8 ± 7,8 <i>a</i> | 90,1 ± 3,6 <i>a</i> | 92,2 ± 4,2 <i>a</i> | 87,7 ± 4,5 <i>a</i> |
| 10^{-7} | 78,6 ± 5,5 <i>a</i> | 86,8 ± 5,3 | 82,1 ± 5,3 <i>a</i> | 85,2 ± 3,0 <i>a</i> | 86,2 ± 5,5 | 83,1 ± 3,2 <i>a</i> |
| 10^{-6} | 71,8 ± 6,7 <i>a</i> | 81,8 ± 3,5 <i>a</i> | 77,5 ± 3,5 <i>a</i> | 77,5 ± 5,7 <i>a</i> | 81,7 ± 4,2 <i>a</i> | 77 ± 2,31 <i>a</i> |
| 10^{-5} | 66,3 ± 6,6 <i>a</i> | 75,7 ± 3,2 <i>a</i> | 71,5 ± 4,8 <i>a</i> | 74,8 ± 3,4 <i>a</i> | 73,3 ± 3,8 <i>a</i> | 69,7 ± 5,3 <i>a</i> |

Tabelle 8: Ergebnisse der Proliferationsassays der Zelle HEC-1A. Die Ergebnisse sind dargestellt als die jeweiligen Mittelwerte aus acht Einzelassays in [% ± SD] nach fünf Tagen Behandlung. ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test.

a: $p < 0,001$ versus Kontrolle, *b*: $p < 0,001$ versus Triptorelin, *c*: $p < 0,001$ versus Buserelin, *d*: $p < 0,001$ versus Goserelin, *e*: $p < 0,001$ versus Leuprorelin, *f*: $p < 0,001$ versus Cetrorelix, *g*: $p < 0,001$ versus Ramorelix.

3.4.2 Darstellung der Ergebnisse als Balkendiagramm

In den folgenden Schaubildern ist die Zellproliferation der Zelllinie HEC-1A nach Inkubation mit den GnRH-Analoga über fünf Tage in den Konzentrationen 10^{-11} mol/L, 10^{-7} mol/L und 10^{-5} mol/L graphisch dargestellt. Die Werte sind als Mittelwerte aus acht Versuchen in Bezug auf die Kontrolle mit der Standardabweichung abgebildet. Die statistische Signifikanz ist als x gezeigt. Sie kennzeichnet die signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten auf die unterschiedlichen GnRH-Analoga.

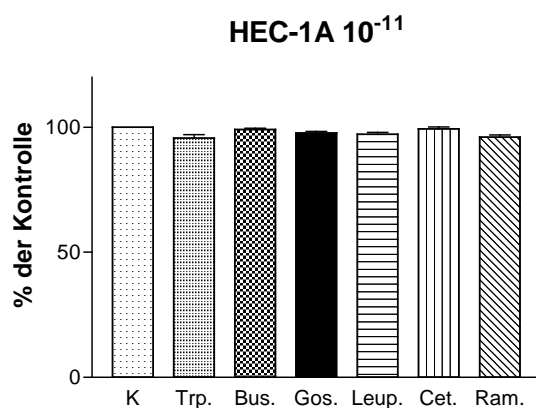


Abbildung 12: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie HEC-1A. Gibt die Zellproliferation der Zelle HEC-1A nach Inkubation mit GnRH-Analoga für fünf Tage bei einer Konzentration von 10^{-11} mol/L in % \pm SD der Kontrolle (K) wieder. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) sind gekennzeichnet.
a: $p < 0,001$ versus Kontrolle, *b:* $p < 0,001$ versus Triptorelin, *c:* $p < 0,001$ versus Buserelin, *d:* $p < 0,001$ versus Goserelin, *e:* $p < 0,001$ versus Leuprorelin, *f:* $p < 0,001$ versus Cetorelix, *g:* $p < 0,001$ versus Ramorelix.

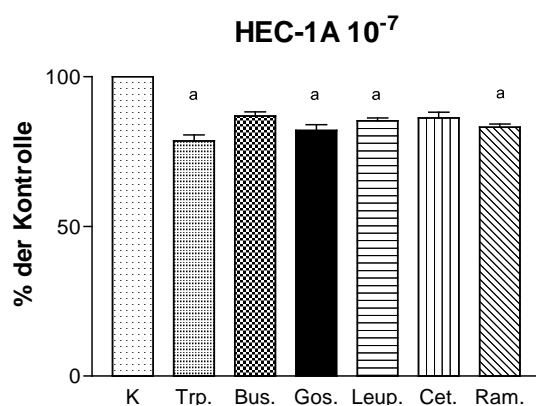


Abbildung 13: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie HEC-1A. Gibt die Zellproliferation der Zelle HEC-1A nach Inkubation mit GnRH-Analoga für fünf Tage bei einer Konzentration von 10^{-7} mol/L in % \pm SD der Kontrolle (K) wieder. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) sind gekennzeichnet.
a: $p < 0,001$ versus Kontrolle, *b:* $p < 0,001$ versus Triptorelin, *c:* $p < 0,001$ versus Buserelin, *d:* $p < 0,001$ versus Goserelin, *e:* $p < 0,001$ versus Leuprorelin, *f:* $p < 0,001$ versus Cetorelix, *g:* $p < 0,001$ versus Ramorelix.

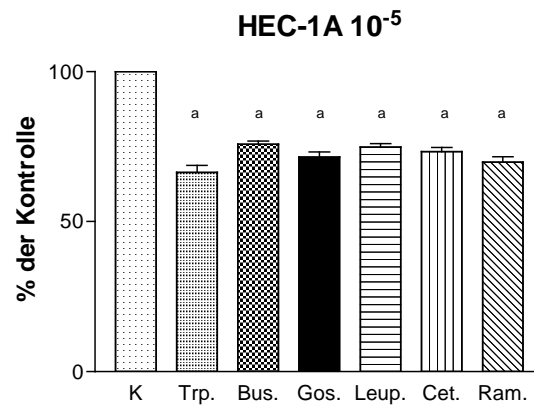


Abbildung 14: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie HEC-1A. Gibt die Zellproliferation der Zelle HEC-1A nach Inkubation mit GnRH-Analoga für fünf Tage bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L in % \pm SD der Kontrolle (K) wieder. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) sind gekennzeichnet.

a: $p < 0,001$ versus Kontrolle, b: $p < 0,001$ versus Triptorelin, c: $p < 0,001$ versus Buserelin, d: $p < 0,001$ versus Goserelin, e: $p < 0,001$ versus Leuprorelin, f: $p < 0,001$ versus Cetorelix, g: $p < 0,001$ versus Ramorelix.

4 DISKUSSION

Der Einsatz und die Wirkung von Hormonen in der Therapie von hormonsensitiven Tumoren des Genitaltraktes der Frau und beim Prostatakarzinom des Mannes wurden durch viele epidemiologische und klinische Studien sowie in zahlreichen experimentellen Untersuchungen beschrieben. Seit Schally und Mitarbeiter das GnRH 1971 entdeckten, entstand im Laufe der Jahre ein breites Einsatzgebiet der GnRH-Agonisten und -Antagonisten. Viele Gruppen bemühten sich und bemühen sich auch heute noch, den Aufbau und die Wirkungsweise der Agonisten und Antagonisten besser zu verstehen.

Besonders früh wurde dem Einsatz von GnRH im Bereich der Onkologie als palliative, endokrine Therapie und Zusatztherapie zu primären Behandlungsschemata bei Ovarial-, Endometrium- und Mammakarzinomen, neben dem Einsatz von Anti-Östrogenen und Gestagenen, Aufmerksamkeit geschenkt. Die Verbesserungsmöglichkeit im Hinblick auf die Therapieergebnisse und den Allgemeinzustand der Patientinnen unter einer nicht toxischen, nebenwirkungsarmen Therapie rechtfertigt den Einsatz. Vor allem die Kombinationsmöglichkeit von endokriner Therapie mit Radio- oder Chemotherapie und die dadurch erreichte Steigerung der Effektivität und Milderung von Toxizität der Behandlung macht Hoffnung auf einen zukünftigen breiten Einsatz der Hormontherapie.

Nach der Erforschung der mitogenen Wirkung von Östrogenen auf Gewebe, dessen Funktion auch unter physiologischen Umständen von Östrogenen gesteuert wird, versuchte man zuerst durch eine Ovariectomie den Östrogeneffekt zu minimieren. Durch die Gabe von GnRH-Analoga erzielte man den Effekt einer reversiblen, medikamentösen Kastration, die in der Literatur als indirekte GnRH-Wirkung anerkannt ist.

In den 80er Jahren entdeckten Khodr und Mitarbeiter im Plazentagewebe die Bildung von GnRH. Es schlossen sich viele Gruppen an, die die Wirkung von GnRH-Analoga in zahlreichen extrahypophysären Geweben erforschten. Bei Tierversuchen wurde in Ratten-Granulosa- und -Prostatazellen ein GnRH-ähnliches Peptid entdeckt (Clayton et al. 1992, Azad et al. 1993). Auch in menschlichem Tumorgewebe der Prostata, des Endometriums, des Ovars und der Brust wurde eine Expression von GnRH gefunden (Seppälä und Wahlström 1980, Bützow et al. 1987, Ohno et al. 1993, Emons et al.

1993, 1994, 1999, Irmer et al. 1994 und 1995, Gründker et al. 2002, Völker et al. 2002).

Die Bedeutung des lokal gebildeten GnRHs hatte erneut viele Untersuchungen zur Folge, insbesondere die Erforschung der Wirkung auf das Proliferationsverhalten von Karzinomzellen. Die Vermutung einer direkten Wirkung des GnRHs lag nahe und es wurden auto- und parakrine Wachstumsregulationen in den Karzinomzellen von Mamma- und Endometriumtumoren angenommen (Motta et al. 1996, Kang et al. 2000). Es wurde eindeutig nachgewiesen, dass die inhibitorischen Effekte von GnRH-Agonisten und -Antagonisten einer direkten dosis- und zeitabhängigen Proliferationshemmung zu Grunde liegen (Emons und Schally 1994, Gründker und Emons 1999, Emons et al. 1993, Yano et al. 1994).

Die Wirkung der GnRH-Analoga scheint aber nicht über den klassischen, wie aus der Hypophyse bekannten, Signaltransduktionsweg zu erfolgen, sondern über die Beeinflussung des Wachstumsfaktors (EGF-R) (Gründker et al. 2002). Endgültige Erkenntnisse über die Mechanismen liegen aber bis heute nicht vor.

Die Entdeckung von spezifischen Bindungsstellen in 80% der Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen und in 50% der Mammakarzinomzellen bestätigte die Annahme des Modells der direkten Wirkung von GnRH auf Zellen (Eidne et al. 1985, Fekete et al. 1989, Emons et al. 1993, Imai et al. 1994, Srkralovic et al. 1990, Irmer et al. 1995). Direkte inhibitorische Effekte von GnRH-Agonisten und -Antagonisten auf die in-vitro-Proliferation von Mammakarzinomzellen wurden von Blankenstein et al. (1985) beschrieben. Miller et al. (1985) zeigten eine Wachstumsinhibition der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 durch GnRH-Agonisten. Emons et al. (2000) zeigten Wachstumshemmungen von bis zu 32% bezüglich der inhibitorischen Aktivität von GnRH-Agonisten auf die Ovariakarzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27. Diese Daten konnten in der vorliegenden Arbeit nachvollzogen werden.

Einige Arbeitsgruppen fanden widersprüchliche Ergebnisse und vertreten die Meinung, dass eine inhibitorische Aktivität von GnRH-Agonisten und -Antagonisten kein Wirkprinzip bei der Behandlung verschiedener Tumore sei. Eidne et al. (1987) fanden keine Wirkung auf die Zelllinie MCF-7 durch Behandlung mit GnRH-Agonisten, stellten jedoch eine Wirkung der Antagonisten fest. Verschiedene Gruppen beschrieben antiproliferative Effekte nur in sehr hohen Dosen der Agonisten und Antagonisten (Connor et al. 1994, Manetta et al. 1995).

Neben dem GnRH-I ist ein weiteres GnRH-System bekannt. Das GnRH-II und der Rezeptor Typ II (Gründker et al. 2002, Eicke et al. 2005). Da die meisten Ergebnisse von Proliferationsassays eine ähnliche Wirkung der Agonisten als auch der Antagonisten mit Ausnahme in der Zelllinie EFO-27 zeigen, wurde nach Kenntnis des GnRH-II und des Rezeptor Typ II diese Zelllinie daraufhin untersucht. Es konnte ein Fehlen des Rezeptors Typ II nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass der antiproliferative Effekt des Antagonisten Cetrorelix nicht über GnRH Rezeptor Typ I, sondern über Typ II vermittelt wird (Gründker et al. 2004), so dass sich eine fehlende Proliferationshemmung durch Cetrorelix in dieser Zelllinie hierdurch erklärt.

Neuere Daten bezüglich des GnRH-II und des GnRH Rezeptor Typ II zeigen, dass der Wirkung von GNRH-II ähnliche Mechanismen der Proliferationshemmung wie der von GnRH-I zu Grunde liegen sollen und dass in bestimmten Karzinomzelllinien die Proliferationsinhibition sogar stärker ausgeprägt ist (Eicke et al. 2006).

4.1 Betrachtung der Ergebnisse in Hinblick auf die Dosisabhängigkeit der Wirkung von GNRH-Analoga

In allen in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde deutlich, dass die Wirkung der GnRH-Analoga dosisabhängig ist. Es zeigte sich, dass die Wirkung der GnRH-Analoga in den Zelllinien, mit Ausnahme der Antagonisten bei der Zelllinie EFO-27, mit steigender Konzentration zunahm. Eine bessere Wirkung der GnRH-Antagonisten im Vergleich zu den -Agonisten konnte anhand der erhobenen Daten nicht nachgewiesen werden.

Die Unterschiede der Wirksamkeit in den jeweils gewählten Konzentrationen waren in allen Zelllinien ähnlich. Der Agonist Triptorelin zeigte in Konzentrationen von 10^{-5} mol/L bis 10^{-11} mol/L die deutlichste dosisabhängige inhibitorische Wirkung in allen Zelllinien. In der Zelllinie EFO-21 des Ovarialkarzinoms wurde bei der Konzentration von 10^{-5} mol/L eine Zellzahl von 66% im Vergleich zur Kontrolle (100%) gesehen, in der Zelllinie EFO-27 eine Zellzahl von 68% im Vergleich zur Kontrolle (100%) bei gleicher Konzentration. In der Zelllinie HEC-1A zeigte Triptorelin bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L maximale Zellzahlen von 52% im Vergleich zur Kontrolle

(100%). In der Zelllinie MCF-7 wurden Werte von 64% im Vergleich zur Kontrolle (100%) in der Konzentration von 10^{-5} mol/L festgestellt.

4.2 Betrachtung der Ergebnisse in Hinblick auf Unterschiede der Wirkung von GnRH-Analoga auf Zelllinien der verschiedenen Tumorarten

Die Wirkung des Agonisten Triptorelin war in allen Zelllinien vergleichbar. In einer Konzentration von 10^{-5} mol/L ergaben sich Zellzahlen zwischen 64 und 70% im Vergleich zur Kontrolle (100%). Die Zelllinie des Endometriumkarzinoms zeigte die größte Reaktion mit Zellzahlen von 64,8% im Mittel im Vergleich zur Kontrolle (100%). Bei den Zelllinien der übrigen Karzinome zeigten sich aber durchaus vergleichbare Daten.

Ähnliches ergab sich auch bei allen anderen Agonisten und Antagonisten, die in den Zellversuchen getestet wurden. Die Ergebnisse der Anwendung der Agonisten Goserelin, Leuprorelin und Buserelin und der Antagonisten Cetorelix und Ramorelix zeigten bei allen getesteten Konzentrationen keine großen Unterschiede in Bezug auf eine organspezifische Wirkung. Genauere Untersuchungen der intrazellulären Wirkweise werden im Moment durchgeführt.

4.3 Betrachtung der Ergebnisse des Proliferationsverhaltens der Zelllinie HEC-1A

In der durchgeführten Untersuchung konnten die positiven Ergebnisse bezüglich der Inhibition der Proliferation der Zelllinie HEC-1A bestätigt werden. Wie im Ergebnisteil schon erläutert, stellte sich der Agonist Triptorelin als am wirksamsten heraus. Ein maximaler Effekt wurde bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L mit einer Zellzahl von 66% im Vergleich zur Kontrolle (100%) erzielt. Der GnRH-Antagonist Ramorelix und der Agonist Goserelin erzielten gleichfalls ähnliche Effekte bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L, wobei Ramorelix eine bessere Wirkung zeigte, die sich bei abfallender Konzentration aber veränderte. Der Agonist Buserelin und der Antagonist Cetorelix wiesen ein ähnliches Wirkspektrum auf. Weiterhin zeigten die Agonisten und Antagonisten eine deutliche dosisabhängige Wirkung bei dieser Zelllinie.

Durch diese Ergebnisse konnte die Annahme des Vorliegens von GnRH-Rezeptoren in der Zelllinie HEC-1A, die in früheren Untersuchungen in der Literatur beschrieben sind, bestätigt werden. Eine direkte antiproliferative Wirkung der GnRH-Analoga ist aufgrund der Ergebnisse deutlich ableitbar.

Im Varianzvergleich ließen sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Analoga nachweisen.

4.4 Betrachtung der Ergebnisse des Proliferationsverhaltens der Zelllinie MCF-7

Antiproliferative Effekte von GnRH-Analoga auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurden von vielen Gruppen untersucht und es liegen teilweise kontroverse Ergebnisse vor.

Die Ergebnisse des hier durchgeführten Proliferationsassays mit der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 bestätigte signifikante antiproliferative Effekte von GnRH-Agonisten und -Antagonisten. Der GnRH-Agonist Triptorelin zeigte maximale antiproliferative Effekte bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L von 64% im Vergleich zur Kontrolle (100%). Der GnRH-Agonist Goserelin erzielte bei gleicher Konzentration antiproliferative Effekte von 68% im Vergleich zur Kontrolle (100%). Der Antagonist Ramorelix war mit einer Zellzahl von 69% im Vergleich zur Kontrolle (100%) bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/L ähnlich wirkungsvoll. Bei Betrachtung der Effekte in den übrigen Konzentrationen zeigte sich eine bessere antiproliferative Wirkung des Antagonisten Ramorelix gegenüber dem Agonisten Goserelin.

Die übrigen Agonisten und Antagonisten zeigten einen antiproliferativen Effekt mit Zellzahlen von 70–71% im Vergleich zur Kontrolle (100%).

Die vorliegenden Effekte, die eine GnRH-Exposition auf die Zelllinie MCF-7 hat, bestätigen frühere Untersuchungen und sind nachvollziehbar.

4.5 Betrachtung der Ergebnisse des Proliferationsverhaltens der Zelllinien EFO-21 und EFO-27

Das Ansprechen der Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27 auf die Exposition mit GnRH-Agonisten unterscheidet sich in den unterschiedlichen Konzentrationen teilweise wesentlich. Der Agonist Triptorelin zeigt bei 10^{-5} mol/L eine Zellzahl von $66,2\% \pm 5,2$ bei der Zelllinie EFO-21, hingegen bei EFO-27 68% im Vergleich zur Kontrolle (100%). Unter Verwendung des Agonisten Goserelin ergab sich eine Zellzahl von 71% im Mittel im Vergleich zur Kontrolle (100%) bei der Zelllinie EFO-21, die Zelllinie EFO-27 zeigte eine Zellzahl von $74\% \pm 2,3$. Trotz der Unterschiede bezüglich der Wachstumsinhibition lässt sich auch hier feststellen, dass der Agonist Triptorelin eine bessere antiproliferative Wirkung zeigt als die anderen Agonisten.

Der Effekt der Antagonisten Cetrorelix und Ramorelix auf die Zelllinie EFO-21 ließ sich in der Zelllinie EFO-27 nicht nachvollziehen. Hier stellte sich kein eindeutiger antiproliferativer Effekt dar. Bei Anwendung der Antagonisten Cetrorelix und Ramorelix lag die Zellzahl bei 96% bzw. 94% im Vergleich zur Kontrolle (100%). In den durchgeführten Untersuchungen an dieser Zelllinie zeigte sich keine signifikante Proliferationsinhibition in den Konzentrationen 10^{-5} mol/L bis 10^{-11} mol/L. Die Antagonisten unterscheiden sich stärker als die Agonisten von der natürlichen Struktur des GnRH. In der Hypophyse verursachen sie nach Bindung an den Rezeptor eine kompetitive Blockade des Rezeptors, ohne, wie die Agonisten, eine Gonadotropinsekretion auszulösen. Der signifikante Unterschied der antiproliferativen Wirkung bzw. das Fehlen einer Wirkung bei Anwendung der Antagonisten Ramorelix und Cetrorelix bei der Zelllinie EFO-27 erklärt sich, wie Untersuchungen von Gründker zeigen, durch ein Fehlen des GnRH Rezeptor Typ II (Gründker et al. 2002 und 2004).

4.6 Versuch der Klärung der unterschiedlichen Wirkweise der Analoga

Die Unterschiede der bisher in der Literatur vorliegenden Daten, insbesondere Unterschiede in der Effektivität der antiproliferativen Wirkung der Analoga, lässt sich teilweise durch die verschiedenen Strukturen der Analoga erklären.

Unterschiede können sich auch aus der Tatsache heraus ergeben, dass die unterschiedlichen Analoga verschiedene Signaltransduktionswege ansprechen. Möglicherweise laufen auch bestimmte Signalkaskaden parallel ab, die für eine Wachstumshemmung der entsprechenden Zelllinie sorgen.

Die molekularen Mechanismen der GnRH Rezeptoren Typ I und Typ II in Karzinomgeweben unterscheiden sich von denen der Hypophyse, wie zahlreiche Gruppen darstellen konnten (Gründker et al. 2000, Emons et al. 1996). Statt einer Aktivierung von Phospholipase C und Proteinkinase C werden verschiedene Wachstumsfaktoren beeinflusst, so dass sich die Situation der GnRH-Wirkung bei Karzinomzellen verschieden darstellen kann.

Untersuchungen anderer Gruppen zeigen teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf eine generelle Wirksamkeit von GnRH und Analoga auf Karzinomzelllinien und sind publiziert worden. Brower et al. (1992) fanden keine signifikanten Effekte von verschiedenen GnRH-Analoga bei der Zelllinie MCF-7, weiterhin fanden Manetta et al. (1995) keine Effekte von GnRH in Zelllinien von Ovarialkarzinomen.

Diese Unterschiede in der Wirkung lassen sich möglicherweise auf unterschiedliche Labor- und Versuchsbedingungen zurückführen, die den Untersuchungen der einzelnen Gruppen zu Grunde lagen. Wichtiger scheint es aber zu sein, in Anbetracht des Vorkommens verschiedener GnRH-Systeme auf Zellebene, weitere Proliferations- und Rezeptorassays durchzuführen mit dem Ziel einer Einteilung und Klärung der unterschiedlichen Wirkmechanismen der Analoga.

Durch die hier durchgeführten Untersuchungen und deren Ergebnisse wird die Annahme einer direkten Proliferationshemmung von Karzinomzellen durch GnRH-Agonisten und GnRH-Antagonisten bestätigt. Viele bereits vorliegende Ergebnisse von ähnlich aufgebauten Versuchsanordnungen konnten nachvollzogen werden. Eine signifikante direkte Inhibition von GnRH-Analoga auf die Zellen von rezeptorpositiven

gynäkologischen Tumoren lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht bezweifeln.

Anhand dieser Daten wird eine weitere intensive Forschung mit und Weiterentwicklung von GnRH und dessen Wirkungsprinzip stark befürwortet. Diese Ergebnisse sollten die Entwicklung eines optimalen Therapiekonzepts in der Behandlung gynäkologischer Tumore unterstützen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkungsweise und das Verhalten des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH) besonders bei gynäkologischen, malignen Tumoren wurde durch viele Gruppen erforscht und konnten teilweise geklärt werden. Besonders die antiproliferative Wirkung einzelner GnRH-Analoga sind in zahlreichen Proliferationsassays einzeln oder im Paarvergleich untersucht worden und es liegen viele, teilweise auch widersprüchliche Daten vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Proliferationsverhalten von Ovarial-, Endometrium- und Mammakarzinomzelllinien unter Behandlung mit sechs verschiedenen GnRH-Analoga untersucht.

Da unterschiedliche Kulturbedingungen der Gruppen möglicherweise die vielen kontroversen Ergebnisse der Effekte von GnRH auf Zelllinien bedingten und wahrscheinlich oft keine einheitliche Ergebnisdarstellung zuließen, wurden in dieser Untersuchung sechs verschiedene GnRH-Analoga unter gleichen Versuchsbedingungen auf ihre antiproliferativen Effekte getestet. Ziel war es, durch eine parallele Testung der Analoga unter konstanten Bedingungen die Effekte zu erarbeiten, d. h. ohne Abweichungen der Kulturbedingungen wie die Zusammensetzung der Kulturmedien und der verwendeten Stoffe.

Die Versuche wurden jeweils in der gleichen Zellpassage durchgeführt, um Abweichungen, z. B. durch Rezeptorverluste der Zellen durch Passagieren, zu vermeiden.

In fünftägigen Versuchen mit den GnRH-rezeptorpositiven Karzinomzelllinien des Endometriumkarzinoms HEC-1A, des Mammakarzinoms MCF-7 und der Ovarialkarzinome EFO-21 und EFO-27 wurde das Proliferationsverhalten mit sechs verschiedenen GnRH-Analoga getestet. Die verwendeten GnRH-Analoga waren die Agonisten Triptorelin, Goserelin, Leuprorelin, Buserelin und die Antagonisten Ramorelix und Cetrorelix.

- Durch die vorliegenden Daten ließ sich der Nachweis eines direkten dosisabhängigen antiproliferativen Effekts von GnRH-Analoga auf Karzinomzellen des Ovars, des Endometriums und der Mamma bestätigen.
- Die antiproliferative Wirkung der Analoga war bei den Zelllinien des Endometrium- und des Mammakarzinoms in den jeweiligen Konzentrationen ähnlich. Eine signifikante leichte Überlegenheit des antiproliferativen Effekts zeigte der GnRH-Agonist Triptorelin.
- Eine größere antiproliferative Wirkung von GnRH-Antagonisten gegenüber den GnRH-Agonisten konnte nicht beobachtet werden.
- In der Karzinomzelllinie EFO-27 zeigte sich kein antiproliferativer Effekt der GnRH-Antagonisten. Dies scheint auf der Tatsache zu beruhen, dass bei dieser Zelllinie der GnRH Rezeptor Typ II nicht exprimiert wird.

SUMMARY

The mode of action of the Gonadotropin-Releasing hormone (GnRH I and II) particularly at gynecological malignant tumors have been described by various investigators. The majority of human endometrial, ovarian and breast cancers express receptors for gonadotropin-releasing hormone (GnRH I and II). Their proliferation is time- and dose-dependently reduced by GnRH and its agonistic and antagonistic analogues.

Recently, it was shown that two types of GnRH, GnRH-I and II; and their two types of receptors, type I and II, are expressed in endometrial and ovarian cancers. The two types are assumed to be part of the negative autocrine regulatory system and to have different effects on cell proliferation.

The present study was performed in order to analyze the effect of different GnRH-agonists and GnRH-antagonists on proliferation of ovarian, endometrial and breast cancer cells.

There are different and partly contradictory data on the antiproliferative effects of GnRH analogues shown in the literature and these controversial results could be caused e.g. by different culture conditions or loss of GnRH-receptors in the cell lines. In order to avoid this potential bias, possible antiproliferative effects of six GnRH-analogues on cell proliferation were tested under identical trial conditions.

The four GnRH-agonists triptorelin, goserelin, leuprorelin, buserelin and the two GnRH-antagonists ramorelix and cetrorelix were tested on four cell lines: one breast cancer cell line MCF-7, one endometrial cancer cell line HEC-1A and two ovarian cancer cell lines EFO-21 and EFO-27. The cells were treated with increasing concentrations of the GnRH-analogues for five days.

In summary the data show:

- A direct, dose-dependent antiproliferative effect could be confirmed by the assays of GnRH-analogues on ovarian carcinoma cells, endometrial and breast cancer cells.
- The antiproliferative effects of the analogues on the cells of endometrial cancer and of breast cancer cells were comparable in particular

concentrations. The GnRH-agonist triptorelin showed a significant antiproliferative effect to a greater extent than the other agonists.

- There was no proof of a distinct antiproliferative effect of GnRH-antagonists in comparison to the agonists.
- When testing the GnRH-antagonists cetrorelix and ramorelix, the cell line EFO-27 did not show any antiproliferative effect. This seems to be based on the fact that this cell lines does not express the GnRH-receptor typ II and that the effect is not mediated through the GnRH-receptor typ I.

6 Literaturnachweis

Advanced Ovarian Cancer Trialists' Group (2000): Chemotherapy for advanced ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* :CD001418

Antoniou AC, Easton DF (2006): Risk prediction models for familial breast cancer: *Future Oncol* 2(2):257-74

Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) Trialists' Group, Forbes JF, Cuzick J, Buzdar A, Howell A, Tobias JS, Baum M (2008): Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol* 9(1):45-53

Azad N, Paglia NL, Abel K, Jurgens J, Kirsteins L, Emanuele NV, Kelley MR, Lawrence AM, Mohagheghpour N (1993): Immunoactivation Enhances the Concentration of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Peptide and Its Gene Expression in Human Peripheral T-Lymphocytes. *Endocrinology* 133(1): 215-23

Baumann KH, Kiesel L, Kaufmann M, Bastert G, Runnebaum B (1993): Characterization of binding sites for a GnRH-agonist (buserelin) in human breast cancer biopsies and their distribution in relation to tumor parameters. *Breast Cancer Res Treat* 25(1):37-46

Bernstein L, Deapen D, Cerhan JR, Schwartz SM, Liff J, McGann-Maloney E, Perlman JA, Ford L (1999): Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk *J Natl Cancer Inst.* 91(19):1654-62

Blankenstein MA, Henkelmann MA, Klijns JG (1985): Direct Inhibitory Effect of a Luteinizing Hormone-releasing Hormone Agonist on MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Eur J Cancer Clin Oncol* 21(12):1493-9

Boccardo F, Rubagotti A, Perrotta A, Amoroso D, Balestrero M, De Matteis A, Zola P, Sismondi P, Francini G, Petrioli R (1994): Ovarian ablation versus goserelin with or without tamoxifen in pre-perimenopausal patients with advanced breast cancer: results of a multicenter Italian study. *Ann Oncol* 5(4):337-42

Brambilla C, Escobedo A, Artioli R, Lechuga MJ, Motta M (1992): Treatment of premenopausal advanced breast cancer with goserelin - a long-acting luteinizing hormone releasing hormone agonist. *Anticancer Drugs* 3(1):3-8

Bristow RE (1999): Endometrial cancer. *Curr Opin Oncol.*11(5):388-93

Bristow RE, Eisenhauer EL, Santillan A, Chi DS (2006): Delaying the primary surgical effort for advanced ovarian cancer: a systematic review of neoadjuvant chemotherapy and interval cytoreduction. *Gynecol Oncol* 104(2):480-90

Brower ST, Schally AV, Redding TW, Hollander VP (1992): Differential Effects of LHRH and Somatostatin Analogs on Human Breast Cancer. *J Sur Res* 52(1):6-14

Bützow R, Huthaniemi I, Clayton R, Wahlström T, Andersson LC, Sepålla M (1987): Cultured Mammary Carcinoma Cells Contain Gonadotropin-Releasing Hormone-Like Immunoreactivity, GnRH Binding Site And Chorionic Gonadotropin. *Int J Cancer* 39(4):498-501

Chatzaki E, Bax CMR, Eidne KA, Anderson L, Grudzinskas JG, Gallagher CJ (1996): The Expression of Gonadotropin-releasing Hormone and its Receptor in Endometrial Cancer and its Relevance as an autocrine Growth Factor. *Cancer Res* 56(9):2059-65

Chen A, Yahalom D, Laskar-Levy O, Rahimipour S, Ben-Aroya N, Koch Y (2001): Two isoforms of gonadotropin-releasing hormone are coexpressed in neuronal cell lines. *Endocrinology* 142(2):830-7

Clayton RN, Eccleston L, Gossard F, Thalbard JC, Morel G (1992): Rat granulosa cells express the gonadotropin-releasing hormone gene: evidence from in-situ hybridization histochemistry. *J Mol Endocrinol* 9(3):189-95

Colombo N, Parma G, Lapresa MT, Maggi F, Piantanda P, Maggioni A (2005): Role of conservative surgery in ovarian cancer: the European experience. *Int J Gynecol Cancer*. 15 (suppl 3):206-11

Connor JP, Buller RE, Conn PM (1994): Effects of GnRH Analogs on Six Ovarian Cancer Cell Lines in Culture. *Gynecol Oncol* 54(1):80-6

Covens A, Carey M, Bryson P, Verma S, Fung Kee Fung M, Johnston M (2002): Systematic review of first-line chemotherapy for newly diagnosed postoperative patients with stage II, III, or IV epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 5(1):71-80

De Souza PL, Friedlander ML (1992): Prognostic Factors In Ovarian Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 6(4):761-82

Du Bois A, Quinn M, Thigpen T, Vermorken J, Avall-Lundqvist E, Bookman M, Bowtell D, Brady M, Casado A, Cervantes A, Eisenhauer E, Friedlaender M, Fujiwara K, Grenman S, Guastalla JP, Harper P, Hogberg T, Kaye S, Kitchener H, Kristensen G, Mannel R, Meier W, Miller B, Neijt JP, Oza A, Ozols R, Parmar M, Pecorelli S, Pfisterer J, Poveda A, Provencher D, Pujade-Lauraine E, Randall M, Rochon J, Rustin G, Sagae S, Stehman F, Stuart G, Trimble E, Vasey P, Vergote I, Verheijen R, Wagner U; Gynecologic Cancer Intergroup; AGO-OVAR; ANZGOG; EORTC; GEICO; GINECO; GOG; JGOG; MRC/NCRI; NCIC-CTG; NCI-US; NSGO; RTOG; SGCTG; IGCS; Organizational team of the two prior International OCCC (2005): 2004 consensus statements on the management of ovarian cancer: final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GCIG OCCC 2004). *Ann Oncol*. 16 (suppl 8):viii7-viii12

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (2000): Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 355(9217):1757-70

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (1998): Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 352(9132):930-42

- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (2000): Ovarian ablation for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* (3):CD000485
- Eicke N, Günthert AR, Viereck V (2005): GnRH-II receptor-like antigenicity in human placenta and in cancers of human reproductive organs. *Eur J Endocrinol* 153(4):605-12
- Eicke N, Günthert A, Emons G, Gründker C (2006): GnRHII agonist (D-Lys6)GnRH-II inhibits the EGF-induced mitogenic signal transduction in human endometrial and ovarian cancer. *Int J Onco* 29(5):1223-9
- Eidne KA, Flanagan CA, Millar RP (1985): Gonadotropin-Releasing Hormone Binding Sites in Human Breast Carcinoma. *Science* 229(4717):989-91
- Eidne A, Flanagan CA, Harris NS, Millar RP (1987): Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)-Binding Sites in Human Breast Cancer Cell Lines and Inhibitory Effects of GnRH Antagonists. *J Clin Endocrinol Metab* 64(3):425-32
- Emons G, Hoffmann HG, Brack C, Ortmann O, Sturm R, Ball P, Knuppen R (1988): Modulation of Gonadotropin-releasing Hormone Receptor Concentration in cultured Female Rat Pituitary Cells by Estradiol Treatment. *J Steroid Biochem* 31(5):751-6
- Emons G, Pahwa GS, Brack C, Sturm R, Oberheuser F, Knuppen R (1989): Gonadotropin Releasing Hormone Binding Sites in Human Epithelial Ovarian Carcinomata. *Eur J Cancer Clin Oncol* 25(2):215-21
- Emons G, Pahwa GS, Ortmann O, Knuppen R, Oberheuser F, Schulz KD (1990): LHRH-Receptors And LHRH-Agonist Treatment In Ovarian Cancer An Overview. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37(6):1003-6
- Emons G, Ortmann O, Pahwa GS, Hackenberg R, Oberheuser F, Schulz KD (1992): Intracellular actions of gonadotropic and peptide hormones and the therapeutic value of GnRH-agonists in ovarian cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 155:31-8
- Emons G, Ortmann O, Pahwa GS, Löhns U, Wetterling T, Dilling H, Oberheuser F, Knuppen R (1992): In-vivo- und In-vitro-Effekte von GnRH-Analoga auf einen ovariellen Leydigzelltumor. *Geburtsh Frauenheilk* 52(8):487-93
- Emons G, Ortmann O, Schulz KD (1993): Rolle der endokrinen Therapie beim Ovarialkarzinom. *Der Gynäkologe* 26(2):123-30
- Emons G, Ortmann O, Becker M, Irmer G, Springer B, Laun R, Hölzel F, Schulz KD, Schally AV (1993): High Affinity Binding and Direct Antiproliferative Effects of LHRH Analogues in Human Ovarian Cancer Cell Lines. *Cancer Res* 53(22):5439-46
- Emons G, Schröder B, Ortmann O, Westphalen S, Schulz KD, Schally AV (1993): High Affinity Binding and Direct Antiproliferative Effects of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Analogs in Human Endometrial Cancer Cell Lines. *J Clin Endocrinol Metab* 77(6):1458-64

Emons G, Schally AV (1994): The use of luteinizing hormone releasing hormone agonists and antagonists in gynaecological cancers. *Human Reprod* 9(7):1364-79

Emons G, Müller V, Ortmann O, Schulz KD (1998): Effects of LHRH-analogues on mitogenic signal transduction in cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65(1-6):199-206

Emons G, Kavanagh JJ (1999): Hormonal interactions in ovarian cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 13(1):145-61

Emons G, Weiß S, Ortmann O, Gründker C, Schulz KD (2000): LHRH might act as a negative autocrine regulator of proliferation of human ovarian cancer. *Eur J Endocrinol* 142(6):665-70

Emons G, Weiss S, Ortmann O, Gründker C, Schulz KD (2000): LHRH might act as a negative autocrine regulator of proliferation of human ovarian cancer. *Eur J Endocrinol* 142(6):665-70

Emons G, Fleckenstein G, Hinney B, Huschmand A, Heyl W (2000): Hormonal interactions in endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer* 7(4):227-42

Emons G, Heyl W (2000): Hormonal treatment of endometrial cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 126(11):619-23

Emons G, Gründker C, Günthert AR, Westphalen S, Kavanagh J, Verschraegen C (2003): GnRH antagonists in the treatment of gynecological and breast cancers. *Endocr Relat Cancer* 10(2):291-9

Emons G (2006): Endometriumkarzinom – Anregungen für die neue Leitlinienversion. *Zentralbl Gynäkol* 128:18-22

Fekete M, Bajusz S, Groot K, Csernus J, Schally AV (1989): Comparison of different agonists and antagonists of luteinizing hormone-releasing hormone for receptor binding ability to rat pituitary and human breast cancer membrane. *Endocrinology* 124(2):946-55

Fister S, Günthert AR, Emons G, Gründker C (2007): Gonadotropin-releasing hormone type II antagonists induce apoptotic cell death in human endometrial and ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 67(4):1750-6

Gallagher CJ, Oliver RT, Oram DH, Foxler CG, Blake PR, Mantell BS, Slevin ML, Hope-Stone HF (1991): A new treatment for endometrial cancer with gonadotropin releasing-hormone analog. *Br J Obstet Gynecol* 98(10):1037-41

Gapstur SM, Morrow M, Sellers TA (1999): Hormone Replacement Therapy and Risk of Breast Cancer With a Favorable Histology. Results of the Iowa Women`s Health Study. *JAMA* 281(22):2091-7

Gründker C, Schulz K, Günthert AR, Emons G (2000): Luteinizing hormone-releasing hormone induces nuclear factor kappaB-activation and inhibits apoptosis in ovarian cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85(10):3815-20

Gründker C, Völker P, Schulz KD, Emons G (2000): Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Agonist Triptorelin and Antagonist Cetrorelix Inhibit EGF-Induced c-fos Expression in Human Gynecological Cancers. *Gynecol Oncol* 78(2):194-202

Gründker C, Völker P, Emons G (2001): Antiproliferative signaling of luteinizing hormone-releasing hormone in human endometrial and ovarian cancer cells through G protein alpha(I)-mediated activation of phosphotyrosine phosphatase. *Endocrinology* 142(6):2369-80

Gründker C, Günthert AR, Westphalen S, Emons G (2002): Biology of the gonadotropin hormone system in gynecological cancers. *Eur J Endocrinol* 146(1):1-14

Gründker C, Günthert AR, Millar RP, Emons G (2002): Expression of gonadotropin-releasing hormone II (GnRH-II) receptor in human endometrial and ovarian cancer cells and effects of GnRH-II on tumor cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 87(3):1427-30

Gründker C, Emons G (2003): Role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol* 1:65

Gründker C, Schlotawa L, Viereck V, Eicke N, Horst A, Kairies B, Emons G (2004): Antiproliferative effects of the GnRH antagonist cetrorelix and of GnRH-II on human endometrial and ovarian cancer cells are not mediated through the GnRH type I receptor. *Eur J Endocrinol* 151(1):141-9

Harbeck N, Eiermann W, Engel J, Funke I, Lebeau A, Permanetter W, Untch M (2001): Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom. Manual: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Mammakarzinome, 2001

Horn F, Bilezikjian LM, Perrin MH, Bosma MM, Windle JJ, Huber KS, Blount AL, Hille B, Vale W, Mellon PL (1991): Intracellular Response to Gonadotropin-Releasing-Hormone in a Clonal Cell Line of the Gonadotrope Lineage. *Mol Endocrinol* 5(3):347-54

Hsieh KP, Martin TFJ (1992): Thyrotropin-Releasing Hormone and Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors Activate Phospholipase C by Coupling to the Guanosine Triphosphate-Binding Proteins Gq and G11. *Mol Endocrinol* 6(10):1673-81

Hulley S, Furberg C, Barrett-Connor E, Cauley J, Grady D, Haskell W (2002): Noncardiovascular diseases outcomes during 6,8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 288:58-66

Imai A, Ohno T, Furui T, Takahashi K, Matsuda T, Tamaya T (1993): Gonadotropin-releasing hormone stimulates phospholipase C but not protein phosphorylation/dephosphorylation in plasma membrane from human epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 3(5):311-17

Imai A, Ohno T, Iida K, Fuseya T, Furui T, Tamaya T (1994): Presence of Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor and Its Messenger Ribonucleic Acid in Endometrial Carcinoma and Endometrium. *Gynecol Oncol* 55(1):144-8

Imai A, Ohno T, Takahashi K, Furui T, Tamaya T (1994): Lack of evidence for aromatase expression in human ovarian epithelial carcinoma. *Ann Clin Biochem* 31(Pt 1):65-71

Imai A, Takagi A, Horibe S, Takagi H, Tamaya T (1998): Evidence for tight coupling of gonadotropin-releasing hormone receptor to stimulated Fas ligand expression in reproductive tract tumors: possible mechanism for hormonal control of apoptotic cell death. *J Clin Endocrinol Metab* 83(2):427-31

Irmer G, Bürger C, Müller R, Ortmann O, Peter U, Kakar SS, Neill JD, Schulz KD, Emons G (1995): Expression of the Messenger RNAs for Luteinizing Hormone-releasing Hormone (LHRH) and Its Receptor in Human Ovarian Epithelial Carcinoma. *Cancer Res* 55(4):817-22

Irmer G, Bürger C, Ortmann O, Schulz KD, Emons G (1994): Expression Of Luteinizing Hormone And Its mRNA In Human Endometrial Cancer Cell Lines. *J Clin Endocrinol Metab* 79(3):916-9

Kakar SS, Grizzle WE, Neill JD (1994): The nucleotide sequences of human GnRH receptors in breast and ovarian tumors are identical with that found in pituitary. *Mol Cell Endocrinol* 106(1-2):145-9

Kang SK, Cheng KW, Nathwani PS, Choi KC, Leung PC (2000): Autocrine role of gonadotropin-releasing hormone and its receptor in ovarian cancer cell growth. *Endocrine* 13(3):297-304

Kammerman S, Demopoulos RI, Raphael C, Ross J (1981): Gonadotropic hormone binding to human ovarian tumors. *Hum Pathol* 12(10):886-90

Kavanagh JJ, Roberts W, Townsend P, Hewitt S (1989): Leuprolide Acetate in the Treatment of Refractory or Persistent Epithelial Ovarian Cancer. *J Clin Oncol* 7(1):115-8

Khodr GS, Siler-Khodr T (1978): Localization of luteinizing hormone-releasing factor in the human placenta. *Fertil Steril* 29(5):523-6

Kiesel L, Runnebaum B (1992): Gonadotropin-releasing-Hormon und Analoga. *Gynäkol Geburtsh Rundsch* 32:22-30

Klijn JG, Blamey RW, Boccardo F, Tominaga T, Duchateau L, Sylvester (2001): Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer: a meta-Analysis of four randomized trials. *J Clin Oncol* 19(2):343-53

- Lee MT, Liebow C, Kamer AR, Schally AV (1991): Effects of epidermal growth factor and analogues of luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin on phosphorylation and dephosphorylation of tyrosine residues of specific protein substrates in various tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(5):1656-60
- Limonta P, Dondi D, Moretti RM, Maggi R, Motta M (1992): Antiproliferative Effects of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Agonists on the Human Prostatic Cancer Cell Line LNCaP. *J Clin Endocrinol Metab* 75(1):207-12
- Manetta A, Gamboa-Vujigic G, Paredes P, Emma D, Liao S, Leong L, Asch B, Schally A (1995): Inhibition of growth of human ovarian cancer in nude mice by luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix (SB-75). *Fertil Steril* 63(2):282-7
- Mangia A, Tommasi S, Reshkin SJ, Simone G, Stea B, Schittulli F, Paradiso A (2002): Gonadotropin releasing hormone receptor expression in primary breast cancer: comparison of immunohistochemical, radioligand and Western blot analyses. *Oncol Rep* 9(5):1127-32
- Merz WE, Erlewein C, Licht P, Harbarth P (1991): The secretion of human chorionic gonadotropin as well as the alpha- and beta messenger ribonucleic acid levels are stimulated by exogenous gonadoliberin pulses to first trimester placenta in a superfusion culture system. *J Clin Endocrinol Metab* 73(1):84-92
- Millar RP (2003): GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends Endocrinol Metab* 14(1):35-43
- Miller WR, Scott WN, Morris R, Fraser HM, Sharpe RM (1985): Growth of human breast cancer cells inhibited by a luteinizing hormone-releasing hormone agonist. *Nature* 313(5999):231-3
- Million Women Study Collaborators (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362:419-27
- Motta M, Dondi D, Moretti RM, Montagnani Marelli M, Pimpinelli F, Maggi R, Limonta P (1996): Role of growth factors, steroid and peptide hormones in the regulation of human prostatic tumor growth. *J Steroid Biochem Mol Biol* 56(1-6):107-11
- Nicholsons RI, Walker KJ (1989): GnRH Agonists In Breast And Gynaecologic Cancer Treatment. *J Steroid Biochem* 33(4B):801-4
- Noci I, Borri P, Bonferraro G, Chieffi O, Arcangeli A, Cherubini A, Dabizzi S, Buccoliero AM, Paglierani M, Taddei GL (2001): Longstanding survival without cancer progression in a patient affected by endometrial carcinoma treated primarily with leuprolide. *Br J Cancer*.85(3):333-6
- Ohno T, Imai A, Furui T, Takahashi K, Tamaya T (1993): Presence of gonadotropin-releasing hormone and his messenger ribonucleic acid in human ovarian epithelial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 169(3):605-10

Pahwa GS, Vollmer G, Oberheuser F, Kruppen R, Emons G (1991): Specific low affinity binding sites for gonadotropin-releasing hormone in human endometrial carcinomata. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 41(2):133-42

Parmar H, Nicoll J, Stockdale A, Cassoni A, Philipps RH, Lightman SL, Schally AV (1985): Advanced ovarian carcinoma: Response to the agonist D-Trp-6-LHRH. *Cancer Treat Rep* 69(11):1341-2

Parmar H, Elder MG, White JO (1988): Oestrogen Receptor Activation and Molecular Forms in Human Breast Cancer. *J Steroid Biochem* 31(4A):359-64

Parmar H, Phillips RH, Rustin G, Lightman SL, Schally AV (1988): Therapy of advanced ovarian cancer with D-Trp-6-LH-RH (decapeptyl) microcapsules. *Biomed Pharmacother* 42(8):531-8

Petraglia F, Vaughan J, Vale W (1990): Steroid hormones modulate the release of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone from cultured human placental cells. *J Clin Endocrinol Metab* 70(4):1173-8

Piver MS, Baker TR, Piedmonte M, Sandecki AM (1991): Epidemiology and Etiology of Ovarian Cancer. *Semin Oncol* 18(3):177-85

Rajaniemi HJ, Keinanen KP, Kellokumpu S, Petaja-Repo UE, Metsikko MK (1989): Molecular structure of the luteinizing hormone receptor. *Biol Reprod* 40(1):1-12

Rao BR, Slotman BJ (1991): Endocrine Factors in Common Epithelial Ovarian Cancer. *Endocr Rev* 12(1):14-26

Reissmann T, Klenner T, Deger W, Hilgard P, McGregor GP, Voigt K, Engel J (1996): Pharmacological Studies with Cetrorelix (SB-75), a Potent Antagonist of Luteinising Hormone-releasing Hormone. *Eur J Cancer* 32A(9):1574-9

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Womens` Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288:321-33

Schally AV, Arimura A, Baba J, Nair RM, Matsuo H, Redding TW, Debeljuk L (1971): Isolation and properties of the FSH- and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 43(2):393-9

Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Reeding TW, Nair RGM, Debeljuk L (1971): Gonadotropin-Relaensing Hormone: One Polypeptide Regulates Secretion of Luteinizing and Follicle-Simulating Hormones. *Science* 173(4001):1036-8

Schally AV, Arimura A, Carter WH, Redding TW, Geiger R, Konig W, Wissman H, Jaeger G, Sandow J, Yanaihara N, Yanaihara C, Hashimoto T, Sakagami M (1972): Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) activity of some synthetic polypeptides. I. Fragments shorter than decapeptide. *Biochem Biophys Res Commun* 48(2):366-75

- Schally AV, Nagy A (1999): Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic conjugates to their receptor on tumors. *Eur J Endocrinol* 141(1):1-14
- Schally AV, Comaru-Schally AM, Hollander V (1993): Hypothalamic and other peptide hormones. In: Wulf KH, Schmidt-Matthiesen H (eds.): *Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe I. Gynäkologische Endokrinologie*. Urban&Schwarzenberg, pp. 97-121
- Schally AV, Skralovic G, Szende B, Redding TW, Janaky T, Juhasz A, Korkut E, Cai RZ, Szepeshazi K, Radulovic S, Bokser L, Groot K, Serfozo P, Comaru-Schally AM (1990): Antitumor Effects of Analogs of LHRH and Somatostatin: Experimental and Clinical Studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37(6):1061-7
- Scharier C, Lubin J (2000): Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA* 283(4):485-91
- Segal-Abramson T, Kitroser H, Levy J, Schally AV, Sharoni Y (1992): Direct effects of luteinizing hormone-releasing hormone agonists and antagonists on MCF-7 mammary cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(6):2336-9
- Seppälä M, Wahlström T (1980): Identification of luteinizing hormone-releasing factor and alpha subunit of glycoprotein hormones in ductal carcinoma of the mammary gland. *Int J Cancer* 26(3):267-8
- Shaeffer DT, Randall ME (2005): Adjuvant radiotherapy in endometrial carcinoma. *Oncologist* 10(8):623-31
- Sica G, Iacopino F, Marini L, Robustelli della Cuna G (1992): Antiproliferative Effect of Leuprorelin Acetate, Alone or Combined with Tamoxifen or Medroxyprogesterone Acetate, on Human Breast Cancer Cell Lines. *Clin Ther* 14(Suppl A):87-96
- Sica G, Iacopino F, Robustelli della Cuna G, Marchetti P, Marini L (1994): Combined effects of estradiol, leuprorelin, tamoxifen and medroxyprogesterone acetate on cell growth and steroid hormone receptors in breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 120(10):605-9
- Silverberg SG (2000): Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol* 19(1):7-15
- Skralovic G, Schally AV, Wittliff JL, Day TG, Jenison EL (1998): Presence and characteristics of receptors for [D-Trp⁶]luteinizing hormone releasing hormone and epidermal growth factor in human ovarian cancer. *Int J Oncol* 12(3):489-98
- Skralovic G, Wittliff JL, Schally AV (1990): Detection and partial characterization of receptors for [D-Trp⁶]-luteinizing hormone-releasing hormone and epidermal growth factor in human endometrial carcinoma. *Cancer Res* 50(6):1841-6
- Stanford JL, Weiss NS, Voigt LF, Daling JR, Habel LA, Rossing MA (1995): Combined estrogen and progestin hormone replacement therapy in relation to risk of breast cancer in middle-aged women. *JAMA* 274(2):137-42

Taylor CW, Green S, Dalton WS, Martino S, Rector D, Ingle JN, Robert NJ, Budd GT et al (1998): Multicenter randomized clinical trial of goserelin versus surgical ovariectomy in premenopausal patients with receptor-positive metastatic breast cancer: an intergroup study. *J Clin Oncol* 16(3):994-9

Tensen C, Okuzawa K, Blomenröhr M, Rebers F, Leurs R, Bogerd J, Schulz R, Goos H (1997): Distinct efficacies for two endogenous ligands on a single cognate gonadoliberin receptor. *Eur J Biochem* 243(1-2):134-40

Thigpen T, Brady MF, Omura GA, Creasman WT, McGuire WP, Hoskins WJ, Williams S (1993): Age as a Prognostic Factor in Ovarian Carcinoma. The gynecologic Oncology Group Experience. *Cancer* 71(Suppl 2):606-14

Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, Vermorken JB, Mangioni C, Madronal C, Franchi M, Tateo S, Zanetta G, Scarfone G, Giurgea L, Timmers P, Coens C, Pecorelli S (2003): Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J Natl Cancer Inst* 95(2):113-25

Torrise R, Bagnardi V, Pruneri G, Ghisini R, Bottiglieri L, Magni E, Veronesi P, D'Alessandro C, Luini A, Dellapasqua S, Viale G, Goldhirsch A, Colleoni M (2007): Antitumour and biological effects of letrozole and GnRH analogue as primary therapy in premenopausal women with ER and PgR positive locally advanced operable breast cancer. *Br J Cancer* 97(6):802-8

U.S. Preventive Services Task Force (2005): Hormone Therapy for the Prevention of Chronic Conditions in Postmenopausal Women: Redommendations from the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 142:855-60

Von Alten J, Fister S, Schulz H, Viereck V, Frosch KH, Emons G, Gründker C: (2006): GnRH analogs reduce invasiveness of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 100(1):13-21

Von Georgi R, Franke FE, Münstedt K. (2003): Influence of surgery and postoperative therapy and tumor characteristics on patient prognosis in advanced ovarian carcinomas. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 111(2):189-96

Völker P, Gründker C, Schmidt O, Schulz KD, Emons G (2002): Expression of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in human ovarian and endometrial cancers: frequency, autoregulation, and correlation with direct antiproliferative activity of luteinizing hormone-releasing hormone analogues. *Am J Obstet Gynecol* 186(2):171-9

Wang CB, Wang CJ, Huang HJ, Hsueh S, Chou HH, Soong YK, Lai CH (2002): Fertility-preserving treatment in young patients with endometrial adenocarcinoma. *Cancer* 94(8):2192-8

Weiderpass E, Adami HO, Baron JA, Magnusson C, Bergström R, Lindgren A, Correia N, Persson I (1999): Risk of endometrial cancer following estrogen replacement with and without progestins. *J Natl Cancer Inst* 91(13):1131-7

Yano T, Pinski J, Halmos G, Szepeshazi K, Schally AV (1994): Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancer xenografts in nude mice by treatment with Luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75. Proc Natl Acad Sci USA 91(15):7090-4

Zanetta G, Chiari S, Rota S, Bratina G, Maneo A, Torri V, Mangioni C (1997): Conservative surgery for stage I ovarian carcinoma in women of childbearing age. Br J Obstet Gynaecol 104(9):1030-5

Eigenständige Werke:

Brinton LA, Devesa SS (1996): Etiology and Pathogenesis of Breast Cancer. In: Harris J [HRSG]: Disease of the Breast. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Brinton L, Hoover R (1992): Epidemiology of gynecologic cancers. In: Gynecologic oncology: principles and practice (ed. W. Hoskins), pp 3-26, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Runnebaum B. und Rabe T (1987): Gynäkologische Endokrinologie. Springer, Berlin.

Leitlinien:

Leitlinien für Diagnostik und Therapie, Science-based Guidelines for Diagnostics and Therapy, Leitlinien von Fachgesellschaften in der AWMF der **Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG)**.

Endometriumkarzinom - Erstellungsdatum: Dezember 1999, letzte Überarbeitung: Juni 2006. Register-Nr. 032/034.

Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumore - Erstellungsdatum: 10. Januar 2000, letzte Überarbeitung: Mai 2007, veröffentlicht 2007: Zuckerschwerdt Verlag, München, Wien, New York.

Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Frau - Erstellungsdatum: Juni 2004, Register-Nr. 032/045.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von GnRH-I und -II und der in dieser Arbeit verwendeten Analoga..... | 19 |
| Abbildung 2: Signaltransduktion von GnRH in gynäkologischen Karzinomen..... | 23 |
| Abbildung 3: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie MCF-7..... | 35 |
| Abbildung 4: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie MCF-7..... | 35 |
| Abbildung 5: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie MCF-7..... | 36 |
| Abbildung 6: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie EFO-21..... | 39 |
| Abbildung 7: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie EFO-21..... | 39 |
| Abbildung 8: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie EFO-21..... | 40 |
| Abbildung 9: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie EFO-27..... | 43 |
| Abbildung 10: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie EFO-27..... | 43 |
| Abbildung 11: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie EFO-27..... | 44 |
| Abbildung 12: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie HEC-1A..... | 47 |
| Abbildung 13: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie HEC-1A..... | 47 |
| Abbildung 14: Balkendiagramm der Versuche der Zelllinie HEC-1A..... | 48 |

8 TABELLENVERZEICHNIS

| | | |
|------------|------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: | Chemikalienliste..... | 26 |
| Tabelle 2: | Zusammensetzung des Mediums | 27 |
| Tabelle 3: | Zusammensetzung der Pufferlösung | 27 |
| Tabelle 4: | Zusammensetzung der Trypsin-Lösung..... | 28 |
| Tabelle 5: | Ergebnisse der Proliferationsassays der Zelle MCF-7 | 34 |
| Tabelle 6: | Ergebnisse der Proliferationsassays der Zelle EFO-21 | 38 |
| Tabelle 7: | Ergebnisse der Proliferationsassays der Zelle EFO-27 | 42 |
| Tabelle 8: | Ergebnisse der Proliferationsassays der Zelle HEC-1A | 46 |

10 AKADEMISCHE LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

In Marburg:

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Christiansen, Daut, Emons, Engel, Fruhstorfer, Fuhrmann, Geus, Gotzen, Gressner, Griss, Grone, Habermehl, Happle, Hesse, Kälble, Kern, Klenk, Koolman, Krieg, Mävers, Müller, Oertel, Remschmidt, Schachtschabel, Schäfer, Schulz, Schulze, Schweigerer, Seifart, Stinner, Thomas, Vohland, von Wichert, Werner

In Baden-Baden:

Augustin

In Utersum:

Spiecker

In Valens/Schweiz:

Kesselring

11 ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Effekte und Wirksamkeitsvergleich verschiedener Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Analoga in gynäkologischen Karzinomzelllinien“ am Medizinischen Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe unter Leitung von Prof. Dr. med. G. Emons ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, im Juli 2008

12 DANKSAGUNG

Für die wissenschaftliche intensive Betreuung dieser Arbeit, besonders während der experimentellen Phase, danke ich Herrn Professor Dr. med. G. Emons und Frau Dr. med. S. Westphalen, die mich durch zahlreiche Gespräche und Diskussionen unterstützten.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meiner Mutter Helma Metz und meiner Schwester Isabel Metz, die mir während eines wichtigen Abschnittes dieser Arbeit durch ihre Unterstützung zur Seite standen. Danke.