

Aus dem Medizinischen Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Geschäftsführende Direktoren: Prof. Dr. U. Wagner und Prof. Dr. S. Schmidt

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

**Effekte des LHRH-Agonisten Triptorelin  
auf die in vitro Proliferation  
verschiedener Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien**

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

vorgelegt von Oswald Schmidt aus Markt Indersdorf

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 01.12.2005.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

**Dekan:** Prof. Dr. B. Maisch

**Referent:** Prof. Dr. G. Emons

**Korreferent:** Prof. Dr. S. Schmidt

## Inhaltsangabe

	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Das Ovarialkarzinom, seine Epidemiologie und Therapie	1
1.2. Das Endometriumkarzinom, seine Epidemiologie und Therapie	7
1.3. Das Luteinisierende Hormon Releasing-Hormon (LHRH) und seine Analoga	13
1.3.1. LHRH-Analoga und ihre Wirkung auf Ovarial- und Endometriumkarzinome	15
1.4. Fragestellung und Versuchsplanung	19
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1. Die Zellkultur	20
2.1.1. Kultivierung der Zellen	20
2.1.2. Zelllinien	20
2.1.3. Lösungen und Reagenzien	22
2.2. Versuchsbeschreibungen	23
2.3. Statistische Auswertung	25
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>26</b>
3.1. Antiproliferativer Effekt unter LHRH (zeit- und dosisabhängig)	26
3.1.1. Ovarial-Ca-Zelllinien NIH:OVCAR-3 und BG-1	28
3.1.1. Endometrium-Ca-Zelllinien HEC-1B, KLE, und AN-3-CA	30
3.2. Ausbleibender antiproliferativer Effekt unter LHRH (zeit- und dosisabhängig)	33
3.2.1. Ovarial-Ca-Zelllinien SK-OV-3, CA-OV-3 und SW 626	34
3.2.2. Endometrium-Ca-Zelllinie MFE-296	37
<b>4. Diskussion</b>	<b>38</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>46</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>48</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>62</b>

## **1. EINLEITUNG**

### **1.1. Das Ovarialkarzinom, seine Epidemiologie und Therapie**

Das Ovarialkarzinom gehört immer noch zu den häufigsten Todesursachen unter den malignen Tumorerkrankungen der Frau. Unter diesen macht es zwar lediglich 4% aus und ist das dritthäufigste Malignom des weiblichen Genitale, stellt aber auch die vierthäufigste Todesursache durch Krebs bei Frauen überhaupt dar. Es ist prognostisch das ungünstigste Genitalkarzinom und nach dem Mammakarzinom die häufigste Todesursache, die auf bösartige Genitalerkrankungen zurückzuführen ist (Parazzini et al. 1991). In den Industriestaaten Europas und in den USA kommt es jährlich zu 15 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen, wobei die Inzidenz langsam, aber konstant ansteigt. Eine Frau hat im Laufe ihres Lebens eine Wahrscheinlichkeit von 1:70, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken; die Wahrscheinlichkeit daran zu sterben beträgt 1:100 (Schmidt-Matthiesen und Bastert 2000).

Für den Verlauf und die Prognose der Erkrankung ist die meist relativ späte Erstdiagnose, die in mehr als 70 % aller Fälle im fortgeschrittenen Stadium gestellt wird, entscheidend. Aus diesem Grunde sind die 5-Jahres-Überlebensraten trotz neuer Behandlungsstrategien nach wie vor schlecht. Zu den prognostischen Faktoren gehört die Differenzierung und der histologische Subtyp des Tumors, die Tumorausbreitung, der Ploidiegrad (Schueler et al. 1993), der verbliebene Tumorrest nach dem Primäreingriff, sowie Alter und Allgemeinzustand der Patientin. Der letztgenannte Faktor limitiert die Möglichkeiten einer notwendigerweise aggressiven Chemotherapie. Der Altersgipfel für die Inzidenz des Ovarialkarzinoms liegt bei 58-65 Jahren, bis dahin steigt sie mit dem Lebensalter.

Die hohe Letalität der Erkrankung zeigt sich bei Betrachtung der Überlebensraten: nur 5-15% im fortgeschrittenen Stadium (FIGO IIIa-IV, siehe unten) überleben 5 Jahre oder länger; demgegenüber liegt das 5-Jahres-Überleben für FIGO II bei 45%, für FIGO Ia sogar bei über 70%. Das immer wieder neu überdachte Behandlungskonzept radikale Chirurgie kombiniert mit aggressiver Chemotherapie verlängert das mittlere Überleben, führt jedoch selten zu einer Heilung (Emons et al. 1993a, Emons und Schulz 1995, Emons et al. 1996a und b, Emons und Kavanagh 1999). Dabei wird heute bereits in den frühen Stadien FIGO I und II die retroperitoneale Lymphonodektomie zunehmend als obligat erachtet (Jänicke 2004) und die Kombination etablierter Zytostatika, gerade beim Rezidiv, als Hoffnungsträger angesehen (Pfisterer und du Bois 2004).

Risikofaktoren, die für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms verantwortlich gemacht werden, sind vor allem familiäre Disposition und zunehmendes Alter, getriggert durch endokrine Faktoren. Die Hypothese, daß die Anzahl der Ovulationen und die dadurch bedingte Ruptur des Follikelepithels mit seinen Heilungsvorgängen ursächlich sein könne für erhöhte Entstehungswahrscheinlichkeiten, basiert auf folgender Beobachtung: Die erhöhten Östrogenspiegel während der Ovulation fördern mitogene Stimuli in der Ovarialflüssigkeit (Godwin et al. 1993, Emons und Kavanagh 1999); Nulliparität und fehlende hormonelle Antikonception erhöhen, Multiparität und längere Einnahme von Ovulationshemmern verringern das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (Lee et al. 1987, Kvale et al. 1988, Rao und Slotman 1991). Dagegen konnten Laktation, Menopausenalter oder Hormonersatztherapie weder als protektive noch als Risikofaktoren eingeordnet werden (Emons und Kavanagh 1999).

Die genetische Basis für eine familiäre Disposition stellt die Mutation der BRCA-Gene 1 und 2 (Breast Cancer Gene 1 and 2) auf den Chromosomen 17 bzw. 13 dar, welche in 5-10% der Erkrankungsfälle vorliegt. Zusätzlich haben diese Frauen auch ein erhöhtes Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken (Engel und Schubert-Fritschle 2001).

### ***Histologie und Stadieneinteilung***

Das Ovarialgewebe besteht aus Coelomepithel, gonadalem Stroma, mesenchymalen Zellen und aus Keimzellen. Die epithelialen Tumoren stellen etwa 70 % aller Ovarialtumoren dar. Der Rest verteilt sich mit 15-25 % auf die Keimzell- und 6 % auf die Ovarialstromatumoren.

Die Ovarialtumoren epithelialer Herkunft werden histologisch in benigne Tumoren, Karzinome mit niedrigem Malignitätsgrad (sogenannte Borderline-Tumoren) und Karzinome unterschieden. Entsprechend ihrer karzinomatösen Differenzierungsformen teilt man sie in papillär-seröse (40-45%), muzinöse (10%), endometroide (10-20%) und hellzellige (5-10%) Karzinome ein. Die Keimzelltumoren sind meist Dermoidzysten (benigne) und Dysgerminome (maligne) bzw. maligne Teratome; die Stromatumoren teilen sich auf in Granulosazelltumoren, Thekazelltumoren, Androblastome, Fibrome und Sarkome (Klassifizierung nach den Richtlinien der WHO).

Zusätzlich wird das Karzinom in drei Differenzierungsgrade, das histologische Grading eingeteilt. Die Grade 1-3 beschreiben histologisch gut, mäßig, gering differenzierte Karzinome. Bei den Grad 3 bzw. entdifferenzierten Karzinomen werden größtenteils atypische Zellformen mit gesteigerter mitotischer Aktivität gefunden (Ozols et al. 1992).

Die klinische Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms beruht auf den Kriterien der Internationalen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (FIGO, Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique). Diese basiert auf der durch operatives Staging und histologische Untersuchung bestimmten Ausbreitung des Tumors und stellt ein notwendiges Prognosekriterium dar.

**Tab.I-1:** Stadien primärer Karzinome des Ovars nach Kriterien der FIGO (1986)

Stadium I	Der Tumor ist auf eines oder beide Ovarien beschränkt.
Ia	Der Tumor ist auf ein Ovar beschränkt; kein Aszites. Kein Tumor auf der äußeren Oberfläche. Kapsel intakt.
Ib	Der Tumor ist auf beide Ovarien beschränkt, kein Aszites. Kein Tumor auf der äußeren Oberfläche. Kapsel intakt.
Ic	Tumor im Stadium Ia oder Ib mit der Ausdehnung auf die äußere Oberfläche eines oder beider Ovarien und/oder rupturierter Kapsel. Aszites enthält maligne Zellen oder solche werden bei Peritonealspülungen gefunden.
Stadium II	Der Tumor hat eines oder beide Ovarien überschritten und dehnt sich im Becken aus.
Ila	Tumor mit Ausdehnung und/oder Metastasen zum Uterus und/oder einer der beiden Tuben.
Ilb	Tumorausbreitung in anderen Geweben des Beckens und/oder des viszeralen Peritoneums, kein Aszites.
Ilc	Tumor im Stadium Ila oder Ilb; Aszites enthält maligne Zellen oder solche werden bei Peritonealspülungen gefunden.
Stadium III	Der Tumor hat eines oder beide Ovarien überschritten. Histologisch nachweisbare Metastasen außerhalb des kleinen Beckens und/oder positive retroperitoneale Lymphknoten
IIIa	Histologisch gesicherte Mikrometastasen auf der Oberfläche des Peritoneums außerhalb des kleinen Beckens. Lymphknoten negativ

- IIIb Histologisch gesicherte Metastasen auf der Oberfläche des Peritoneums, nicht größer als 2 cm im Durchmesser. Lymphknoten negativ.
- IIIc Größere abdominale Metastasen und/oder positive retroperitoneale oder inguinale Lymphknoten.

---

Stadium IV Befall eines oder beider Ovarien mit Fernmetastasen.

---

### ***Therapie***

Die primäre Behandlung des Ovarialkarzinoms besteht in der möglichst radikalen operativen Tumorreduktion mit anschließender Chemotherapie. Die Radikalität und Aggressivität dieses Vorgehens muß selbstverständlich dem Alter und Allgemeinzustand der jeweiligen Patientin angepaßt werden.

Die Strahlentherapie (klassisch: Ganzabdomenbestrahlung) ist der Chemotherapie weit unterlegen und wird in Anbetracht ihrer Nebenwirkungen heute nur in Ausnahmesituationen angewandt.

Dagegen haben endokrine Therapien in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen und gehören mittlerweile zu palliativen und supportiven Behandlungsregimen von Ovarialkarzinomen.

Der wesentliche Bestandteil der Therapie des Ovarialkarzinoms, meist erste Maßnahme, ist die Operation, die dabei gleichermaßen diagnostische und therapeutische Bedeutung hat, denn nur so kann das notwendige genaue Tumor-Staging vorgenommen werden. Die Zytoreduktionsoperation hat das Ziel, das Tumorgewebe möglichst vollständig zu entfernen, da eine kurative Zielsetzung keine Tumorreste in situ vor Beginn einer nachfolgenden Chemotherapie erlaubt (Ozols et al. 1992, Jänicke 2004).

Beim heute typischen radikalen Vorgehen werden, abgesehen von Ausnahmen, grundsätzlich beide Ovarien entfernt, auch wenn sich der Tumor auf ein Ovar beschränkt. Notwendig ist dabei die Hysterektomie. Das Omentum majus muß aufgrund der Häufigkeit von Mikrometastasen auch bei unverdächtigem klinischen Befund entfernt werden (Pfleiderer 1989, Jänicke 2004). Zusätzlich wird heute auch die Entfernung der pelvinen und paraaortalen Lymphknoten bis zum Nierenstiel sowie die Resektion des Beckenperitoneums empfohlen (Burg-

hardt et al. 1991). Hat sich das Karzinom typischerweise transperitoneal ausgebreitet, wird versucht, möglichst alle Tumorreste quantitativ zu resezieren oder, wenn dies nicht möglich ist, zu verkleinern (operative Zytoreduktion). Von dem größten zurückbleibenden Tumorrest hängt dann die weitere Prognose ab (Hand et al. 1993, Hoskins 1993, Jänicke 2004). Die nach erfolgter Chemotherapie bis vor wenigen Jahren häufig empfohlene Second-Look-Laparotomie ist heute wieder verlassen worden, da die Frührezidiverkennung wahrscheinlich keinen Vorteil für die Folgetherapie bringt.

Die Chemotherapie ist die zweite Säule der Behandlung des Ovarialkarzinoms. Die Überlebenszeiten korrelieren neben der Qualität der Erstoperation mit den Remissionsraten des Tumorgewebes durch die Zytostase. Das Ausmaß des verbliebenen Tumorrestes ist dabei von großer Bedeutung. Wie bereits erwähnt, ist die Verfassung und Belastbarkeit der jeweiligen Patientin ausschlaggebend für die Wahl des Therapieregimes und der Dosis. Als Chemotherapeutika werden Kombinationen aus Carboplatin und Taxanen eingesetzt. Bei guten Remissionsrate (größer 70%), sind die Remissionszeiten jedoch oft gering und die Überlebenszeiten trotz des anfänglichen Erfolgs kurz. Die Zytostatika weisen oft eine erhebliche Toxizität sowohl akut als auch chronisch auf. Zudem sind Langzeitfolgen wie erhöhtes Leukämierisiko und zytostatikabedingte Knochenmarksaplasie zu bedenken (Cheruku et al. 1993, Colon-Otero et al. 1993).

Endokrine Therapieansätze bei der Behandlung von Ovarialkarzinomen scheinen in den letzten Jahren wichtiger zu werden, da die üblichen Therapiestrategien (radikale Tumorsektion und anschließende Polychemotherapie) in ihren Langzeitergebnissen ausgeschöpft scheinen und die Häufigkeit von primären Progressionen und Rezidiven hoch ist. Sie erscheinen auch deshalb so wichtig, weil eingehende Untersuchungen ergaben, daß Ovarialkarzinome Rezeptoren für Steroid-, Proteo- und Peptidhormone aufweisen. Etwa 60 % der Ovarialkarzinome enthalten Östrogenrezeptoren, 50 % Progesteronrezeptoren und 69 % Androgenrezeptoren (Rao und Slotman 1991). In 36 % der Ovarialkarzinome wurden sowohl Östrogen- als auch Progesteronrezeptoren gefunden, während lediglich 25 % der Tumoren weder Östrogen- noch Progesteronrezeptoren und 12 % nur Progesteronrezeptoren und keine Östrogenrezeptoren enthielten. Da man bei Mammakarzinomen ein vergleichbares Vorkommen und eine ähnliche Verteilung der Steroidrezeptoren findet und dort die endokrine Therapie einen festen Platz einnimmt, könnte die endokrine Therapie des Ovarialkarzinoms heute einen guten Therapieansatz bilden. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurden zahlreiche Versuche unternommen, durch Steroide und/oder mit auf die jeweiligen Rezeptoren abzielenden Antihormonen das Wachstum von Ovarialkarzinomen zu manipulieren (zur Übersicht: Rao und Slotman



1991, Emons et al. 1993a, Emons und Kavanagh 1999), wobei in den meisten Studien die Wirksamkeit von Antiöstrogenen, Gestagenen oder Östrogen-Gestagen-Kombinationen untersucht wurden. Die Wirksamkeit des Antiöstrogens Tamoxifen wurde in mehreren Arbeitsgruppen untersucht, wobei im Durchschnitt Remissionsraten von 10 % erzielt wurden (Hatch et al. 1991). Der Einsatz von Gestagenen an Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom erzielte nur unwesentlich bessere Ergebnisse (Remissionsraten 15 %, zur Übersicht: Rao und Slotman 1991, Emons et al. 1993a). Hochdosierte Gestagene tragen unabhängig von ihrer Wirkung auf den Tumor dazu bei, den Allgemeinzustand der Patientinnen zu verbessern, aufgrund ihrer starken Nebenwirkungen ist ihr Einsatz allerdings begrenzt (Schmidt-Rhode 1991). Eine Therapie-Kombination von Östrogen und Progesteron - basierend auf der Grundlage, daß Östrogene in Ovarialkarzinomen Progesteronrezeptoren induzieren können - erreichte in einer Studie von Freedmann et al. (1986) eine objektive Remission in 14 % der Fälle, während sich bei 13 % der Frauen die Krankheit stabilisierte. Eine Untersuchung mit der Kombination von Gestagen und Tamoxifen (induziert ebenfalls Progesteronrezeptoren) erbrachte keine objektiven Remissionen. Ebenso zeigten Aromatasehemmer wie Aminoglutethimid (Rothschild et al. 1987) und das Androgen Fluoxymestron (Kavanagh et al. 1987) keine Wirkung.

In mehreren Untersuchungen wurde die Existenz von Gonadotropinrezeptoren und eine spezifische Gonadotropinbindung im Tumorgewebe nachgewiesen und ferner gezeigt, daß die Proliferation in vitro durch Gonadotropine stimuliert werden kann (zur Übersicht Emons et al. 1992a und b, Emons und Schally 1994). Auch im Tiermodell zeigte sich in experimentellen Ovarialtumoren und heterotransplantierten menschlichen Ovarialkarzinomen eindeutig eine Gonadotropinabhängigkeit im Wachstum der Ovarialtumoren (zur Übersicht: Emons et al. 1992a, 1992b). In der Folge beschrieben mehrere Autoren, daß die Suppression der endogenen LH- und FSH-Spiegel durch LHRH-Analoga bei 10-50 % der Patientinnen mit fortgeschrittenem, rezidiviertem Ovarialkarzinom zur Remission (partiell, in wenigen Fällen sogar komplett) oder zur Stable-disease führen kann (Bruckner und Motwani 1989, Jäger et al. 1989, Kavanagh et al. 1989, Lindt et al. 1992, Emons et al. 1992a, Emons und Kavanagh 1999).

In rund 80 % der Ovarialtumoren konnten spezifische Bindungsstellen für LHRH nachgewiesen werden (Emons et al. 1989, Pahwa et al. 1989). In der Folge wurden die Einflüsse sogenannter LHRH-Analoga auf die Proliferation von Ovarialkarzinomen untersucht. Diese Untersuchungen werden später gesondert vorgestellt, da sich diese Arbeit unter anderem speziell

mit der Bedeutung dieses Hormons und dessen Rezeptoren auch im Hinblick auf die Möglichkeiten zur Manipulation von Ovarial- und Endometriumkarzinomen beschäftigt.

## **1.2. Das Endometriumkarzinom, seine Epidemiologie und Therapie**

Das Endometrium- oder Corpuskarzinom ist mit einem Anteil von etwa 10 % aller malignen Erkrankungen der Frau das häufigste weibliche Genitalkarzinom (Onnis et al. 1993, Emons et al. 2003). Als Todesursache durch Krebs bei Frauen rangiert es weltweit an siebter, in Schweden gar an dritter Stelle, und trotz moderner operativer und strahlentherapeutischer Maßnahmen sterben über 30 % der erkrankten Frauen an diesem Karzinom. In den letzten Jahren wird eine allgemeine Zunahme der Inzidenz registriert, wobei die USA und Kanada die Länder mit dem höchsten Risiko darstellen. Demgegenüber liegen die Erkrankungsraten in Entwicklungsländern und Japan um das Vier- bis Fünffache niedriger. Deutschland und die Schweiz weisen in Europa die höchsten Erkrankungsraten auf. Weltweit werden jährlich etwa 150.000 neue Fälle diagnostiziert, wobei auffällt, daß das Endometriumkarzinom eine typische Erkrankung westlicher prosperierender Gesellschaften ist (Parazzini et al. 1991). Derzeit wird bei der Inzidenz des Endometriumkarzinoms in den Industrieländern ein kontinuierlicher Anstieg beobachtet, der fast die Häufigkeit des Zervixkarzinoms erreicht (Onnis et al. 1993). Da das Endometriumkarzinom vorwiegend eine Erkrankung älterer Frauen ist, spielt hier sicherlich auch die in den letzten Jahrzehnten deutlich angestiegene Lebenserwartung eine Rolle. Es entwickelt sich überwiegend bei älteren Frauen, wobei der Erkrankungsgipfel zwischen dem 65. und 75. Lebensjahr liegt. Die größte Anzahl der Frauen ist im Klimakterium und in der Postmenopause, etwa 20-25 % erkranken bereits in der Prämenopause, während 2-14 % der Patientinnen jünger als 45 Jahre sind (Schmidt-Matthiesen und Bastert 2000, Emons et al. 2003).

Gegenüber dem Ovarialkarzinom ist die Prognose für Patientinnen mit dem Endometriumkarzinom relativ günstig, da etwa 70 % der Erkrankungen bereits im FIGO-Stadium I erkannt werden und damit eine 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 80 und 90 % verbunden ist (Emons 2003). Das klassische Leitsymptom ist dabei eine Blutungsstörung, insbesondere die Blutung in der Postmenopause, aber auch Zwischenblutungen und prä- oder postmenstruellen Schmierblutungen bei Frauen über 35 Jahren. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist in 70%

der Fälle das Karzinom auf das Corpus uteri beschränkt. Wird ein Endometriumkarzinom in einem späteren Stadium diagnostiziert, und/oder ist bereits eine extrauterine Aussaat von Tumormaterial erfolgt, steigt die Letalität rapide an. Die 5-Jahres-Überlebensraten liegen bei einem Endometriumkarzinom im Stadium IIa bei 80 %, im Stadium IIIc bei 50 % und im Stadium IV nur noch bei knapp 20 % (Emons et al. 2003).

In der Ätiologie werden zwei Entitäten grundlegend unterschieden: Das *östrogen-* und das *nichtöstrogenassoziierte* Endometriumkarzinom (Typ I bzw. Typ II).

Beim Typ I dominiert die langandauernde Östrogeneinwirkung auf das Endometrium. Vergesellschaftet mit einem fehlenden Progesteroneinfluß auf die Gebärmutter Schleimhaut, kann es zum Auftreten unterschiedlicher Formen einer Endometriumhyperplasie führen, die wiederum in ein Endometriumkarzinom einmünden kann. Vor diesem Hintergrund werden auch Amenorrhö und irreguläre menstruelle Zyklen als Risikofaktor betrachtet (Parazzini et al. 1991, Emons et al. 2003). Als sicher gilt der Bezug zwischen der Einnahme von reinen Östrogenpräparaten in der Peri- und Postmenopause und der Entwicklung eines Endometriumkarzinoms (Parazzini et al. 1991). Es wurde ein bis zu zwölfmal erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Endometriumkarzinoms ermittelt, wobei die Größe dieses Risikos proportional zu der Dauer und Dosis der Östrogenzufuhr ist (Jelovsek et al. 1989). Der Typ I ist charakterisiert durch Adipositas, Infertilität, anovulatorische Zyklen, PCO-Syndrom, metabolisches Syndrom und Östrogensubstitution ohne ausreichenden Gestagenschutz. Dem Karzinom gehen eine Endometriumhyperplasie, zuerst ohne, dann mit Atypien und meist eine Langzeitöstrogenzufuhr voraus, wodurch die Prognose für diesen Karzinomtyp eher gut ist.

Der Typ II weist diese Kennzeichen nicht auf. Statt dessen ist er charakterisiert durch einen geringen Gehalt an Progesteronrezeptoren und ein entdifferenziertes, tief invasives und metastasierendes Karzinom mit einer sehr ungünstigen Prognose. Wahrscheinlich entsteht er durch eine maligne Transformation des atrophischen Endometriums der älteren Frau (Schmidt-Matthiesen und Bastert 2000, Emons et al. 2003).

### ***Histologie und Stadieneinteilung***

Zur Zeit der Geschlechtsreife unterliegt das Endometrium einem regelmäßigen Auf- und Abbau. Aufgrund ovarieller Dysfunktion kommt es in den letzten Jahren vor der Menopause zu überschießenden Proliferationen des Endometriums, denen bei bestimmter Ausprägung im Klimakterium besondere prognostische Bedeutung zukommen. Um die Abgrenzung einzelner

Hyperplasieformen untereinander unter Berücksichtigung deren prämaligener Potenz zu erleichtern, haben die WHO und die International Society of Gynecological Pathologists eine Klassifikation der Endometriumhyperplasien vorgeschlagen (1994). Danach zeigt die einfache Hyperplasie (zystisch, ohne Atypien) in 1%, die komplexe Hyperplasie (adenomatös, ohne Atypien) in 2%, die einfache Hyperplasie mit Atypien in 8% und die komplexe Hyperplasie mit Atypien in 30% eine Progredienz zum Endometriumkarzinom.

Allerdings ist in Deutschland auch die ältere Klassifikation noch gebräuchlich, welche die glandulär-zystische Hyperplasie und die adenomatöse Hyperplasie Grad I-III unterscheidet.

Bei den Endometriumkarzinomen handelt es sich hauptsächlich um endometroide Adenokarzinome (60 %). Weiterhin unterscheidet man Adenokankroid (20 %), adenosquamöse Karzinome (7 %), serös-papilläre Karzinome (5-10 %) und Klarzellkarzinome (6 %). Darüber hinaus wird neben dieser histopathologischen Typisierung auch eine Zuordnung der Karzinome aufgrund ihrer verschiedenen Differenzierungsgrade vorgenommen. Dabei unterscheidet man gut differenzierte (Grad 1), mäßig differenzierte (Grad 2) und gering differenzierte bzw. undifferenzierte Karzinome (Grad 3). Mit abnehmender Differenzierung sinkt der Östrogen- und Progesteronrezeptorgehalt, die DNA-Diploidie geht zunehmend in Aneuploidie über und die Aggressivität des Tumors steigt an (Schmidt-Matthiesen und Bastert 2000).

Die klinische Stadieneinteilung beruht genauso wie bei dem Endometriumkarzinom auf den Kriterien der FIGO und basiert seit 1988 ausschließlich auf dem postoperativen Status und der histologischen Untersuchung.

**Tab. I-2:** Stadieneinteilung des Endometriumkarzinoms nach Kriterien der FIGO (1988)

Stadium I	
Ia	Der Tumor ist auf das Endometrium beschränkt
Ib	Invasion des Tumors bis zu 50 % der Myometriumdicke
Ic	Invasion des Tumors über 50 % der Myometriumdicke
Stadium II	
	Befall der Zervix uteri
IIa	Der Tumor ist auf endozervikale Drüsen beschränkt
IIb	Invasion des Tumors in das Stroma der Zervix

---

### Stadium III

IIIa	Befall der Uterus – Serosa und/oder Befall der Adnexe und/oder positive Peritonealzytologie
IIIb	Befall der Vagina
IIIc	Befall der pelvinen und/oder paraaortalen Lymphknoten

---

### Stadium IV

IVa	Invasion des Tumors in die Blasen- und/oder Darmmukosa
IVb	Fernmetastasen einschließlich intraabdominaler Metastasen und/oder Leistenlymphknoten

---

### *Therapie*

Für die Primärtherapie des Endometriumkarzinoms existieren verschiedene Konzepte, wobei sich der Therapieansatz nach der Ausdehnung und Differenzierung des Karzinoms, dem Lymphknotenstatus, dem Zustand der Patientin und weiteren Prognosefaktoren richtet. Abgesehen von wenigen relativ seltenen und weit fortgeschrittenen Fällen, steht primär die operative Behandlung (Fuchtnet al. 1993) kombiniert mit einer, je nach Stadium, postoperativen Strahlentherapie im Vordergrund. Zur Planung einer eventuellen adjuvanten Radiatio wird heute das operative Staging einschließlich der pelvinen und paraaortalen Lymphonodektomie (Ausnahme: FIGO-Stadium Ia, G1, G2) als wichtigste Komponente der Primärtherapie angesehen (Hanf et al. 2004).

Bei Patientinnen mit sogenannten low-risk-Tumoren ist die Hysterektomie unter Mitnahme der Adnexe die typische Vorgehensweise. Bei pN0 und zusätzlichen Risikofaktoren wie G2, G3, pT1b, c, also intermediate und high-risk wachsenden Tumoren, wird zusätzlich zur pelvinen und paraaortalen Lymphonodektomie die vaginale Brachytherapie empfohlen. Eine perkutane Teletherapie ist bei tumorbefallenen Lymphknoten (FIGO IIIc) durchzuführen; Befall der Zervix uteri macht die erweiterte radikale Hysterektomie erforderlich (Emons et al. 2003, Hanf et al. 2004).

Unter kombinierter Radiotherapie ist dabei die vaginale Brachytherapie (Afterloading) sowie die perkutane Teletherapie mit Beckenbestrahlung und ggf. Paraaortalfeld zu verstehen. Bei

diffuser intraabdominaler Tumorausbreitung kann eine Abdomenganzbestrahlung in Betracht gezogen werden. Die Indikation einer Teletherapie des Endometriumkarzinoms ist jedoch nur bei nachgewiesenem Befall der retroperitonealen Lymphknoten (FIGO IIIc) gegeben (Hanf et al. 2004).

Endometriumkarzinome reagieren in der Regel wenig sensitiv auf eine Therapie mit Zytostatika. Bei Patientinnen in fortgeschrittenem Stadium kann nach möglichst kompletter operativer Sanierung die Radiotherapie durch eine Chemotherapie ergänzt werden, doch ist eine adjuvante Chemotherapie beim nicht-disseminierten Endometriumkarzinom in der Regel nicht indiziert. In der Monotherapie sind Cisplatin und Doxorubicin die potentesten Chemotherapeutika, ihre Kombination war bisher alter Standard im Stadium III-IV, die Ergänzung durch Taxol bildet (G-CSF-unterstützt) möglicherweise den neuen. Auch über Docetaxel existieren interessante Fallberichte zu Remissionen beim metastasierten Endometriumkarzinom (Günthert et al. 1999). Über die besser vertragene Kombination Carboplatin/Taxol liegen bislang noch keine Daten aus randomisierten Studien vor (Hanf et al. 2004).

Ob die konventionelle Strategie (Operation und Strahlentherapie) zusätzlicher chemotherapeutischer Maßnahmen bei fortgeschritteneren Stadien bedarf, wird sich nach Auswertung der Studien zeigen. Momentan bleibt der Einsatz von Zytostatika weitgehend dem rezidivierten und metastasierten Endometriumkarzinom vorbehalten. Die zum Teil schweren Nebenwirkungen und typischen internistischen Begleiterkrankungen bei den vorwiegend älteren Patientinnen, welche die Therapie negativ belasten oder sogar zum Therapieabbruch zwingen, sind dabei immer zu bedenken.

Der Einfluß von Östrogen und Progesteron auf das Wachstum von hormonsensitiven Endometriumkarzinomen ist hinlänglich bekannt (zur Übersicht: Schulz und Emons 1995). Seit langem werden dabei Gestagene eingesetzt, um die Proliferation steroidabhängiger Tumoren zu antagonisieren. Voraussetzung einer Therapie ist dabei in erster Linie der Rezeptorstatus des Karzinoms, da progesteronrezeptor-negative Tumoren kaum auf Gestagene ansprechen. Ist der Progesteron-Rezeptorstatus jedoch positiv, so wird bei etwa 70 % der Patientinnen der Allgemeinzustand verbessert und eine Tumorremission vorübergehend oder anhaltend bei 10-37 % der Fälle erreicht (Schulz et al. 1991, Park et al. 1992, Schulz und Emons 1995, Emons et al. 2003).

Der Nachweis von Östrogenrezeptoren verbessert die Prognose gegenüber rezeptor-negativen Patientinnen nicht (Kleine 1991). Jedoch besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem Steroidrezeptorgehalt und dem Differenzierungsgrad des Karzinoms: mit fortschreitender

Entdifferenzierung nimmt der Rezeptorgehalt und damit die Ansprechrate auf eine Gestagen-therapie ab (zur Übersicht Schulz und Emons 1995, Emons et al. 2003). Hat sich so der Gestageneffekt erschöpft oder ist eine Gestagentherapie mit Risiken behaftet (Patientinnen mit Adipositas, Diabetes, Hypertonie und Thrombosegefährdung) kann die zusätzliche Gabe des Antiöstrogens Tamoxifen Erfolg haben. Ob reine Antiöstrogene (Fulvestrant) ihre Wirkungen wie im experimentellen Modell besitzen, wird derzeit in einer Phase-II Studie geprüft (Emons et al. 2003, Hanf et al. 2004).

Bereits seit über 20 Jahren werden Gestagene in der adjuvanten Therapie primär kurativ behandelter Endometriumkarzinome eingesetzt. Mittlerweile liegen 6 randomisierte Studien mit insgesamt 4350 Patientinnen vor, deren Metaanalyse eine Beeinflussung des Gesamtüberlebens nicht nachweisen konnte. Zwar konnte unter Gestagentherapie ein nicht signifikanter Trend zu Verringerung von Rezidiven und Todesfällen beobachtet werden, doch starben diese Frauen signifikant häufiger an anderen Ursachen als ihrem Endometriumkarzinom. Wenn auch der Nutzen einer adjuvanten endokrinen Therapie somit nicht belegt werden konnte, so bleiben Gestagene (200 mg Medroxyprogesteronacetat täglich) heute vor allem beim fortgeschrittenen Endometriumkarzinomen eine wichtige Option, zumal keines der genannten Chemotherapieregimes ihre Überlegenheit demonstrieren konnte (Emons et al. 2003, Hanf et al. 2004).

Die äußerst nebenwirkungsarme Therapie mit Luteinisierenden Hormon-Releasing Hormon-Analoga bietet eine hoffnungsvolle Möglichkeit für Patientinnen, bei denen Zytostatika oder Gestagene nicht in Frage kommen oder unwirksam sind (Emons et al. 2000/2003). Dieser Therapieansatz wird unterstützt von der Tatsache, daß 80% der Endometriumkarzinome LHRH-Rezeptoren exprimieren und das Wachstum humaner Endometriumkarzinomzelllinien in vitro durch LHRH-Analoga gehemmt wird (Völker et al. 2002). Unter LHRH-Analagon-Therapie des disseminierten Endometriumkarzinoms konnten 12% objektive Remissionen und 31% sogenannte stable diseases beobachtet werden (Emons et al. 2003).

Eine fertilitätserhaltende Therapie mit einer Kombination aus Megestrolacetat, Tamoxifen und einem LHRH-Analagon zeigte Erfolg bei jungen Frauen in frühem Stadium (Wang et al. 2002).

### 1.3. Das Luteinisierende Hormon-Releasing Hormon und seine Analoga

Das Luteinisierenden Hormon-Releasing Hormon (LHRH), synonym auch Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) genannt, ist ein hypothalamisches Dekapeptid, dessen Struktur 1971 erstmals charakterisiert wurde (Schally et al. 1971; Aminosäuresequenz siehe Abb. I-1). Es wird in den Neuronen des Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis im Hypothalamus gebildet und pulsatil in das Portalvenensystem der Hypophyse freigesetzt. Dort reguliert es im Hypophysenvorderlappen die Synthese und Sekretion der Gonadotropine Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH). FSH und LH steuern schließlich über die Hypophysen-Gonaden-Achse die Funktion von Ovarien und Testes. Bereits nach der Strukturaufklärung des LHRH sind seit den 70er Jahren agonistisch und antagonistisch wirksame Analoga entwickelt worden, die in ihrem Effekt dem LHRH weit überlegen sind (Schally 1999).

LHRH	pGlu –His-Trp-Ser–Tyr - Gly - Leu–Arg–Pro–Gly - NH <sub>2</sub>
<b><u>Agonisten</u></b>	
Triptorelin	pGlu - D-Trp <sup>6</sup> - NH <sub>2</sub>
Leuprorelin	pGlu - D-Leu <sup>6</sup> - Ethylamid
Buserelin	pGlu - D-Ser(Bu <sup>t</sup> ) <sup>6</sup> - Ethylamid
Goserelin	pGlu - D-Ser(Bu <sup>t</sup> ) <sup>6</sup> - Az-Gly-NH <sub>2</sub>
<b><u>Antagonisten</u></b>	
Cetrorelix	[Ac-D-Nal(2) <sup>1</sup> , D-Phe(4Cl) <sup>2</sup> , D-Pal(3) <sup>3</sup> , D-Cit <sup>6</sup> , D-Ala <sup>10</sup> ]LHRH
Ramorelix	[Ac-D-Nal(2) <sup>1</sup> , D-Phe(4Cl) <sup>2</sup> , D-Pal(3) <sup>3</sup> , D-Ser <sup>6</sup> , Azagly <sup>10</sup> ]LHRH

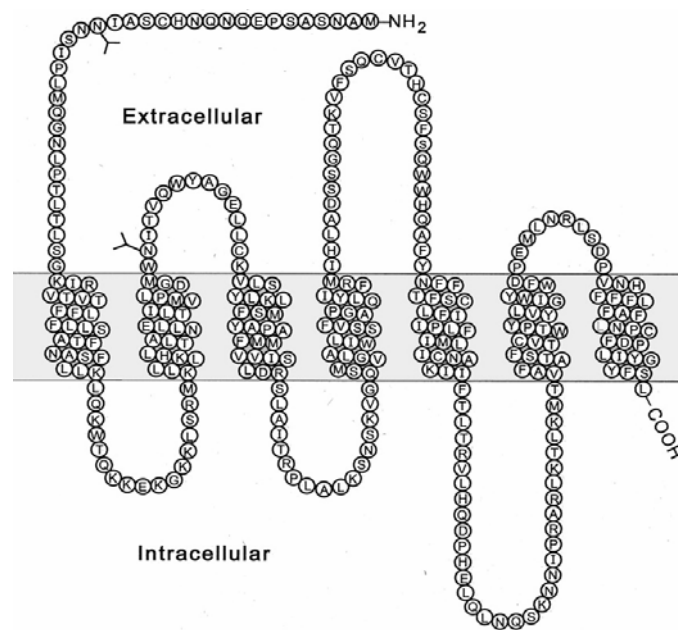
**Abb. I-1:** Aminosäuresequenz des nativen LHRH und einiger seiner klinisch relevanten Analoga (Agonisten und Antagonisten).

So war eine der ersten Beobachtungen, dass bei kontinuierlicher Gabe von LHRH-Agonisten es nach einer initialen Steigerung („flare up“) der Gonadotropinfreisetzung zum Absinken der im Kreislauf zirkulierenden Gonadotropine kommt. Zusätzlich werden die spezifischen hypophysären Bindungsstellen, die LHRH-Rezeptoren (Abb.I-2), down-reguliert, man nannte dies die selektive medikamentöse Hypophysektomie. Da durch das Fehlen der Gonadotropine



die Sexualsteroiden in ihrer Produktion unterdrückt wurden, entstand der Begriff „reversible, medikamentöse Kastration“ (Schally et. al. 1989 und 1993, Emons und Schally 1994).

Im Gegensatz dazu kommt es bei der Gabe von LHRH-Antagonisten nicht zum initialen Flair-up-Effekt, sondern durch kompetitive Besetzung des LHRH-Rezeptors zur sofortigen Hemmung der LHRH-Freisetzung (Schally et. al. 1989 und 1993).



**Abb. I-2:** Schematische Darstellung des membranständigen LHRH-Rezeptors in Struktur und Topographie. Y: mögliche Glycosylierungsstellen.

(aus: Neill J D, GnRH and GnRH Receptor Genes in the Human Genome, Endocrinology, 2002)

Die Bindung von LHRH und die damit verbundene Aktivierung des hypophysären LHRH-Rezeptors initialisiert eine Reihe von Reaktionen, die zu einer Kaskade von intrazellulären Antworten führt (Übersicht: Stojilkovic et al. 1994, Stanislaus et al. 1998). Der erste Schritt dieser Reaktionskaskade ist eine G-Protein vermittelte Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse des Zellmembranbausteins Phosphatidylinositoldiphosphat, woraus die Abbauprodukte Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin

(DAG) resultieren. Diese initialen Veränderungen determinieren den zweiten Schritt der Signaltransduktion.  $IP_3$  induziert eine Steigerung der zytosolischen Calciumkonzentrationen, wodurch unter Mitwirkung von DAG die Protein Kinase C (PKC) aktiviert wird. Nachfolgend wirken  $Ca^{2+}$  und PKC als interagierende Signale in der Regulation verschiedener zellulärer Reaktionen. Dabei haben sie unter anderem Einfluß auf die Expression von primären und sekundären Genen. Weiterhin sind die Signalmoleküle der PLC-abhängigen Reaktionskaskade in positive und negative Kontrollmechanismen des Signaltransduktionsweges involviert.

Diese Rückkopplungsmechanismen erhöhen die Komplexität der Signaltransduktion und spielen eine Rolle bei der Verstärkung, Dauer und Beendigung einzelner Aspekte des Signals (Sealfon und Millar 1995). Es wird vermutet, daß solche Mechanismen ebenfalls bei der Desensitivierung der Zellen, die einer kontinuierlich hohen LHRH-(Analog-)Konzentration ausgesetzt sind, wirksam sind. Unter bestimmten Bedingungen induziert LHRH einen moderaten Anstieg der zytosolischen Konzentrationen an zyklischen Adenosin- und Guanosinmonophosphat (Liu et al. 1981). Diese zyklischen Nukleotide scheinen jedoch nicht in die akute, LHRH-induzierte Sekretion der Gonadotropine involviert zu sein, spielen aber möglicherweise eine Rolle bei der LHRH-induzierten Gonadotropinsynthese (Liu et al. 1981, Chiu et al. 1993).

Emons et al. (1989) erbrachten den Nachweis, daß Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien den LHRH-Rezeptor exprimieren und durch nanomolare Konzentrationen von LHRH-Analoga gehemmt werden können.

Hsieh und Martin (1992) zeigten die Kopplung des LHRH-Rezeptors über ein G-Protein an die Phospholipase C in Ovarialkarzinomen. Ebenso konnten Ohno et al. (1993) die Stimulation der Phospholipase C und die nachfolgende Produktion von Inositolphosphaten in Ovarialkarzinomen nachweisen.

### **1.3.1. LHRH-Analoga und ihre Wirkung auf Ovarial- und Endometriumkarzinome**

Wie bereits eingangs erwähnt, hat man die potenzierte Wirksamkeit von LHRH-Analoga schon bald nach der Strukturaufklärung des LHRH entdeckt (Schally et al. 1971, 1989 und 1993, Emons und Schally 1994) und bald in recht großem Umfang therapeutisch eingesetzt. Die Hemmung der hypophysären Gonadotropinsekretion wird in der Reproduktionsmedizin, in der Therapie der Pubertas praecox, der Endometriose und des Uterus myomatosus einge-

setzt, da es bei erniedrigten Gonadotropinen auch zum Östrogenabfall kommt. Aber auch in der Tumortherapie haben LHRH-Analoga ihren festen Platz: der Effekt der Suppression von Gonadotropinen und Sexualsteroiden wird beim Mamma- und Prostatakarzinom bereits seit längerem genutzt (Schally et al. 1989 und 1993, Emons und Schally 1994, Loop et al. 1995, Schally 1999).

In den letzten Jahren konnten darüber hinaus überzeugende Beweise dafür erbracht werden, daß LHRH eine Reihe von extrahypophysären menschlichen Organen beeinflusst. Es ist wahrscheinlich, daß LHRH eine autokrine beziehungsweise parakrine Funktion, unter anderem in der Plazenta, im Ovar, im Myometrium sowie in lymphatischen Zellen hat (zur Übersicht: Lin et al. 1995, Chegini et al. 1995, Emons et al. 1997 und 1998, Raga et al. 1998, Chen et al. 1999, Casan et al. 2000).

Zahlreiche Experimente zeigen, daß LHRH-Analoga direkte Effekte auf die Proliferation von Tumorzellen ausüben können. Das Wachstum von Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien kann sowohl durch LHRH-Agonisten als auch durch Antagonisten sowohl zeit- als auch dosisabhängig inhibiert werden (Thompson et al. 1991, Emons et al. 1993b und 1993c, Yano et al. 1994a, Imai et al. 1994a und b). Bereits bei einer Konzentration von  $10^{-9}$  mol/L des LHRH-Agonisten Triptorelin konnte eine signifikante Reduktion der Zellzahlen in den Ovarial- (EFO-21, EFO-27) und Endometriumkarzinomzelllinien (Ishikawa, HEC-1A) von Emons et al. (1993b, 1993c) beobachtet werden. Maximale Effekte wurden mit Triptorelin in der Konzentration  $10^{-5}$  mol/L (30-40 % der Kontrollen) erzielt. Vergleichbare dosisabhängige antiproliferative Effekte wurden ebenso bei der Behandlung der Tumorzelllinien EFO-21, Ishikawa und HEC-1A mit dem LHRH-Antagonisten Cetrorelix gefunden, während diese Substanz (auch mit dem LHRH-Antagonisten Ramorelix) bei der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27 keinen Einfluß auf die Proliferation nahm. Die Annahme, daß die Proliferation von Ovarial- und Endometriumkarzinomen durch LHRH-Analoga direkt beeinflusst werden könnte, wird darüber hinaus durch die Tatsache gestützt, daß in Biopsien dieser beiden Tumoren zu einem hohen Prozentsatz (75-80 %) spezifische Bindungsstellen für LHRH und dessen Analoga gefunden werden konnten. Außerdem konnte die Expression der mRNA für den hypophysären LHRH-Rezeptor in mehr als 80 % dieser Biopsien detektiert werden (Emons et al. 1989, Imai et al. 1994a und b, Irmer et al. 1995, Srkalovic et al. 1998). Die Tatsache, daß antiproliferative Wirkungen in vitro bereits bei Konzentrationen des Analogons im nanomolaren Bereich signifikant werden, bekräftigt die Vermutung, daß diese Effekte über die hochaffinen Bindungsstellen vermittelt werden.

Mit der veröffentlichten Übereinstimmung des LHRH-Rezeptors in den Tumorzelllinien und Tumoren mit den hypophysären LHRH-Rezeptoren schien es angebracht, zu spekulieren, daß der Signaltransduktionsweg in den Tumoren dem der hypophysären gonadotropen Zellen entspricht (Stojilkovic und Catt 1995). Allerdings konnten Emons et al. (1996b) anschaulich zeigen, daß der klassische hypophysäre LHRH-Rezeptor Signaltransduktionsweg (Phospholipase C, Phosphokinase C) nicht unmittelbar in die Weiterleitung der antiproliferativen Effekte von LHRH-Analoga involviert ist. Vielmehr interagieren LHRH-Analoga mit dem mitogenen Signaltransduktionsweg der Wachstumsfaktorrezeptoren und entsprechenden Onkogenprodukten, die mit einer Tyrosin-Kinase-Aktivität assoziiert sind (zur Übersicht siehe Emons et al. 1997). Es zeigte sich, daß die EGF-induzierte Aktivierung der MAP-Kinase (Mitogen activated protein Kinase), ein Enzym, daß sich weit unten in der Wachstumsfaktorsignalkaskade befindet (zur Übersicht: Hunter 1995) eindeutig mit Hilfe des LHRH-Agonisten Triptorelin in Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien blockiert wird (Emons et al. 1996b).

Außerdem wurde herausgefunden, daß die EGF-induzierte Expression des immediate early gene *c-fos*, Signalmoleküle noch weiter „downstream“ der mitogenen Signalkaskade, mittels LHRH-Agonisten blockiert werden kann (Moretti et al. 1996, Gründker et al. 2000b, Gründker et al. 2002). Andere Arbeitsgruppen zeigten bereits, daß durch LHRH-Analoga zusätzlich die Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren (EGF, IGF-1) selbst und ihrer mRNA reduziert wird (Yano et al. 1994b, Shirahige et al. 1994, Moretti et al. 1996).

Eine weitere wichtige Entdeckung war, dass die wachstumsfaktorinduzierte Tyrosinkinase-Aktivität heruntergesetzt wird (Imai et al. 1996a, Imai et al. 1996b, Furui et al. 1995, Emons et al. 1996b, Moretti et al. 1996). Wahrscheinlich wird die wachstumsfaktorinduzierte Tyrosinphosphorylierung durch eine von den LHRH-Analoga aktivierten Phosphotyrosinphosphatase konteragiert (Lee et al. 1991, Imai et al. 1996a, Furui et al. 1995, Emons et al. 1996c, Moretti et al. 1996), die an den LHRH-Rezeptor über ein Gi- Protein gekoppelt ist (Imai et al. 1996b).

Bei der Untersuchung der Unterschiede in der Signaltransduktion zwischen hypophysären LHRH-Rezeptoren und denen der Endometriumtumorzellen HEC-1A und Ishikawa wurde die Nukletidsequenz verglichen. Es fanden sich keine Unterschiede die Hinweise auf Mutationen hätten sein können (Gründker et al. 2001a und b). Das LHRH-Analoga Triptorelin entfaltet seine antiproliferative Wirkung auf HEC-1A und Ishikawa über Pertussis-Toxin sensible G-Proteine. Die EGF induzierte *c-fos* Gen Expression wurde nach der Bindung von Triptorelin an den LHRH-Rezeptor der Zelle gehemmt. Der LHRH-Agonist bewirkte so durch Aktivierung der Phosphotyrosinphosphatase eine Hemmung der EGF-induzierten Tyrosin-

Autophosphorylierung der EGF-Rezeptoren. Dies führte zur Hemmung der mitogenen-Signaltransduktion und damit auch der Proliferation der beiden Zelllinien HEC-1A und Ishikawa (Gründker et.al 2001a, b und 2002).

Auch andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß der typische intrazelluläre Kalziumkonzentrationsanstieg nach LHRH-Behandlung ausblieb, was andere Wege der Signaltransduktion vermuten ließ, als den der Hypophysenzelle (Borri et al. 1998).

Desweiteren konnte die Arbeitsgruppe um Gründker bei zwei LHRH-Rezeptor positiven Ovarialkarzinomzelllinien (EFO-21 und EFO-27) durch das Analogon Triptorelin eine Induktion der Nuklearfaktor(NF)-kappa-B Aktivierung und Hemmung der Apoptose nachweisen. Die Induktion der Apoptose durch Triptorelin konnte dagegen nicht gezeigt werden (Gründker et al. 2000a).

Neben den ermutigenden experimentellen Daten liegen leider bis heute bezüglich des Ovarialkarzinoms nur vereinzelte klinische Informationen über die direkte Wirkung von LHRH-Analoga vor (Foekens und Klijn 1992, zur Übersicht Emons und Schally 1994). Bei Pat. mit Ovarialkarzinom brachte die zusätzliche Gabe zur leitlinienorientierten Chemotherapie keinen Vorteil, doch gab es unter rezidierten fortgeschrittenen Verläufen objektive Remissionen (Emons et al. 1996b).

Für das Endometriumkarzinom existieren im Zusammenhang mit LHRH-Analoga noch weniger klinische Studien und Veröffentlichungen. Gallagher erreichte bei Pat. mit rezidiertem Endometrium-Ca (nach operativer, Strahlen- und Chemotherapie) mit LHRH-Agonisten (Leuprorelin oder Goserelin) in 35% Partial- oder Komplettremissionen (Gallagher et al. 1991). Andere Gruppen konnten dies nicht bestätigen (Markman et al. 1997, Covens et al.1997).

#### 1.4. Fragestellung und Versuchsplanung

Arbeitsgruppen, die sich bisher mit dem Luteinisierenden Hormon-Releasing Hormon-System in gynäkologischen Karzinomen beschäftigten, haben mit ihren Daten und Befunden nachgewiesen, daß in Ovarial- und Endometriumkarzinomen ein autokrines Regulationssystem existieren muß, welches auf der Expression von LHRH und seinem Rezeptor basiert. Bei einzelnen Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien konnte in vitro die Proliferation mit LHRH-Agonisten und -Antagonisten effektiv gehemmt werden (Thompson et al. 1991, Emons et al. 1993a und b, Yano et al. 1994a und b, Gründker et al. 2002).

Allerdings konnten andere Arbeitsgruppen diesen Effekt nicht nachweisen (Connor et al. 1994, Manetta et al. 1995, Chatzaki et al. 1996), was für die Untersucher, die deutliche antiproliferative Effekte fanden, zunächst viele Fragen aufwarf.

Die grundlegende Frage, ob die unterschiedlichen Ergebnisse auf unterschiedliches Zellmaterial zurückzuführen ist, soll hier beantwortet werden, indem ein größeres Panel in der Literatur etablierter Zelllinien der beiden Karzinome untersucht wird.

Daten über die Expression von LHRH-Rezeptoren in Zelllinien lagen bisher nur begrenzt vor. Möglicherweise hatten Zellen, bei denen keine Wirksamkeit von LHRH-Analoga nachweisbar war, auch keine LHRH-Rezeptoren (Emons et al. 1996b und c).

In der vorliegenden Arbeit werden nun systematische Proliferationsversuche an humanen Zelllinien durchgeführt, die als experimentelle Modelle für Ovarial- und Endometriumkarzinome gelten. Der zeit- und dosisabhängige Effekt des LHRH-Agonisten Triptorelin auf ihr Wachstum in vitro wird dabei mit der LHRH-Rezeptorexpression der jeweiligen Zelllinie in Korrelation gesetzt. So soll im Hinblick auf die Signaltransduktion in der Zelle der antiproliferative Effekt erklärt werden.

Zu diesem Zweck wurden nun die Zellen von fünf etablierten Ovarial- und von vier etablierten Endometriumkarzinomzelllinien mit dem LHRH-Agonisten Triptorelin in unterschiedlichen Konzentrationen und über unterschiedliche Zeiträume inkubiert.

Diese Daten über die zeit- und dosisabhängige Beeinflussung der Proliferation dieser Zelllinien durch LHRH-Analoga sollten dann korreliert werden mit der Expression von LHRH-Rezeptoren.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1. Zellkultur**

#### **2.1.1. Kultivierung der Zellen**

Die Karzinomzellen (siehe unten, Tabelle II-1) wurden in Zellkulturflaschen mit 250 ml Volumen und 75 cm<sup>2</sup> Bodenfläche (Becton/ Dickinson, Franklin Lakes, USA) im Brutschrank (Haereus, Hanau) bei 37° C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Es erfolgten tägliche Kontrollen. Der Zellrasen je einer Flasche wurde mit 20-25 ml Nährmedium (sog. Reduziertes Medium, s.u. Reagenzien) versorgt, welches alle drei Tage zu wechseln war, um optimale Bedingungen zu schaffen.

Sobald ein konfluierender Zellrasen den Boden der Kulturflaschen bedeckte, wurde ein Passagieren der Zellen erforderlich, um überschießendes Wachstum mit Absterben der Zellen zu verhindern. Hierzu entfernte man das alte Nährmedium, inkubierte die Zellkultur 10-15 min. mit 0,5 %iger Trypsinlösung bei 37° C und versetzte die so vom Boden abgelösten Zellen mit neuem Medium. Die so entstandene neue Zellpassage konnte nun weiterverarbeitet werden, indem man eine weitere Kultur anlegte, die Zellen nach Zugabe von 10 %igem Dimethylsulfoxid bei -80° C kryokonservierte oder einen neuen Versuch begann.

Bei Versuchsbeginn wurde auf diese Art eine definierte Zellzahl (5.000.000/ 25 ml Nährmedium) angelegt, die nach drei Tagen abgelöst und auf Multiwell-Versuchsplatten mit je vier Schalen (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) „ausgesät“ wurden. In jeder Schale befanden sich dann 10.000 Zellen, inkubiert im reduzierten Medium, was den Ausgangspunkt für die Behandlung darstellte. Die Zellzählung erfolgte in Fuchs-Rosenthal- oder Neubauer-Zählkammern unter dem Phasenkontrastmikroskop (ID 03, Fa. Zeiss, Jena).

Sämtliche Versuche wurden an sterilen Werkbänken mit vertikaler Luftströmung (Modelle DFOP 18 IIS und DFOP 12S, Fa. Cryo-Technik, Hamburg) durchgeführt.

#### **2.1.2. Zelllinien**

Die für diese Arbeit verwendeten, in der Literatur eingehend charakterisierten Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien, werden bezüglich ihrer Histologie und Herkunft, sowie ihrer Etablierung in folgender tabellarischer Übersicht (Tabelle II-1) vorgestellt:

**Tabelle II-1:** Übersicht verwendeter Zelllinien

<b>Name</b>	<b>Histologie / Herkunft</b>		<b>etabliert durch</b> (und überlassen von bzw. bezogen über)
<b>OVARIALKARZINOMZELLINIEN</b>			
BG-1	Adenokarzinom, gering differenziert	Primärtumor	Geisinger et al. 1988 (ATCC*)
CA-OV-3	Adenokarzinom	Primärtumor	Fogh et al. 1976 (ATCC*)
EFO-21	Adenokarzinom, serös, wenig differenziert	Aszites	Simon et al. 1983 (F. Hölzel, Hamburg)
NIH: OVCAR-3	Adenokarzinom, gering differenziert	Aszites	Hamilton et al. 1983 (ATCC*)
SK-OV-3	Adenokarzinom	Aszites	Fogh et al. 1977 (ATCC*)
SW 626	Adenokarzinom	Primärtumor	Leibovitz et al. 1974 (ATCC*)
<b>ENDOMETRIUMKARZINOMZELLINIEN</b>			
AN-3-CA	Adenokarzinom, gering differenziert	Lymph- metastase	Dawe et al. 1964 (ATCC*)
HEC-1A	Adenokarzinom, papillär, gering differenziert	Primärtumor	Kuramoto et al. 1972 (T. Bauknecht, Freiburg)
HEC-1B	Adenokarzinom, papillär, gering differenziert	Subkultur von HEC-1A	Kuramoto et al. 1972b (ATCC*)
KLE	Adenokarzinom	Primärtumor	Richardson et al. 1984 (ATCC*)
MFE-296	Adenokarzinom, gering differenziert	Primärtumor	Hackenberg et al. 1992 (R. Hackenberg, Marburg)
Ishikawa	Adenokarzinom, gut differenziert	Primärtumor	Nishida et al. 1985 (E. Gurspide, New York)

---

ATCC\*: American Type Culture Collection



### 2.1.3. Lösungen und Reagenzien

#### Reduziertes Medium

Das Reduzierte Medium stellt die Nährlösung dar, in dem die Zellen wuchsen.

Die Pulvergrundlage, Minimal Essential Medium (von Instamed MEM-Earle, Biochrom, Berlin), wurde in bidestilliertem Wasser gelöst und steril filtriert. Dieses Grundmedium enthält Earle's Salze (NaCl: 6800 mg/l; KCl: 400 mg/l; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O: 140 mg/l; MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O: 200 mg/l; CaCl: 200mg/l; D-Glucose 1000 mg/l; NaHCO<sub>3</sub>: 2200 mg/l), essentielle und nicht essentielle Aminosäuren, sowie die zweifache MEM-Konzentration an Vitaminen. Folgende Substanzen wurden noch zugesetzt:

2,5	mg/L	Transferrin (Fa. Sigma, München)
67,0	mg/L	Gentamycinsulfat (Fa. Biochrom, Berlin)
2,2	g/L	NaHCO <sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat, Fa. Biochrom, Berlin)
40	IU/L	Insulin (Fa. Hoechst-Behring, Frankfurt)

und 10 % fötales Kälberserum (FCS, Fa. Boehringer, Mannheim). Dieses Wachstumsmedium wurde vor der sterilen Filtration mittels Natriumhydrogencarbonatlösung auf einen pH-Wert von 7,4 - 7,6 eingestellt.

#### PBS

Phosphate buffered saline (PBS) ist ein isotoner Phosphatpuffer, der zur Herstellung von entsprechenden Verdünnungsreihen mit den Testsubstanzen benutzt wurde und setzte sich folgendermaßen zusammen:

140	mmol/L	NaCl (Natriumchlorid, Fa. Merck, Darmstadt)
3	mmol/L	KCl (Kaliumchlorid, Fa. Merck, Darmstadt)
8	mmol/L	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat, Fa. Merck, Darmstadt)
1,5	mmol/L	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat, Fa. Merck, Darmstadt)
3	g/L	Rinderserumalbumin (BSA) (Fa. Sigma, Aldrich, GB)

### **EDTA-Trypsin-Lösung (0,5%)**

Die Zellen mussten in bestimmten Zeitabständen, die sich nach ihren individuellen Wachstumseigenschaften richteten, passagiert werden. Zu diesem Zweck wurden sie mit einer Trypsinlösung über 5-10 min. im Brutschrank inkubiert, was zum Ablösen des Zellrasens vom Boden der Kulturflasche führte. Die Grundlösung bestand aus PBS und BSA (s.o.), welchem

2,5	mmol/L	EDTA (Fa. Merck, Darmstadt)
2000	U/L	Trypsin (Fa. Serva, Heidelberg)

zugemischt wurde.

### **Triptorelin**

Triptorelin (Ferring, Kiel), Handelsname Decapeptyl, ist ein LHRH-Agonist, [D-Trp<sup>6</sup>]-LHRH, mit einem Molekulargewicht von 1311 g/mol. Es wurde als weißes Pulver in wenigen µl 0,1-molarer Essigsäure gelöst und mit PBS-Lösung auf  $5 \times 10^{-4}$  ml/l verdünnt. Der pH-Wert wurde mittels 0,1 molarer Salzsäure oder Natronlauge auf 7,6 eingestellt. Die so hergestellte Triptorelinlösung konnte bei -20°C eingefroren werden. Aufgetaut war sie sofort zu verwenden und kein zweites Mal einzufrieren.

## **2.2. Versuchsbeschreibungen**

Die antiproliferative Wirkung des LHRH-Agonisten Triptorelin auf die in Tabelle II-1 angeführten Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien wurde in zwei verschiedenen Proliferationsassays sowohl zeit- als auch dosisabhängig untersucht.

Die drei in Tabelle II-1 enthaltenen Zelllinien EFO-21, HEC-1A und Ishikawa tauchen im Ergebnisteil nicht mehr auf, da die mit ihnen durchgeführten Proliferationsassays nur zu Übungszwecken am Anfang der Versuchsreihen standen. Die Hemmbarkeit ihrer Proliferation durch LHRH-Analoga ist zudem hinreichend bekannt und beschrieben.

Zu Beginn einer Versuchsreihe musste die jeweilige Kulturflasche zu 70-80% mit einem gleichmäßigen Zellrasen bewachsen sein. Dann wurde das Medium abgesaugt und eine zweimalige Spülung mit Trypsin zur Entfernung von Zellschutt und Mediumresten angeschlossen.

Der nächste Schritt bestand in der Aussaat einer definierten Zellzahl in 4-Well-Kulturschalen (Clusterplatten mit 4 Schalen von je 16 mm Durchmesser, Fa. Nunc, Roskilde, DK), die für 24-Std. im Brutschrank inkubiert wurden. Die Aussaatkonzentration der Zellen zu diesem Zeitpunkt, der Tag -1 genannt wurde, war abhängig vom Proliferationsverhalten der jeweiligen Zelllinie und variierte zwischen 2.000 Zellen (BG-1) und 20.000 Zellen (SW 626) pro ml. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Adhärenz der Zellen an den Böden der Kulturschalen im Phasenkontrastmikroskop überprüft. Der Abschluß dieser Anwachsphase wurde als Tag 0 definiert, an dem die Testsubstanz zugegeben wurde. Vorher wurden die Zellen einer 4-Well Kulturschale trypsinisiert, um die Ausgangszellzahl zu bestimmen, die der Anzahl an Zellen entsprach, die während der Anwachsphase am Boden der Schalen adhärent festgewachsen waren.

Die weitere Behandlung der Zellen entsprach dann der Intention des Proliferationsassays:

**A:** Für die Untersuchung der *zeitabhängigen* Wirkungen von Triptorelin auf die Proliferation der Tumorzellen wurde ein Zusatz von  $10^{-5}$  mol/L Triptorelin auf die definierte Zellzahl und die anschließende Inkubation für 1-5 Tage im Brutschrank vorgesehen. An den Tagen 1 bis 5 wurde jeweils die Zellzahl in einer behandelten 4-Well- und einer Kontrollschale (mit PBS versetzt) bestimmt. Die Zellzahlen der Kontrollschalen wurden als 100% definiert.

Diese Versuche wurden dreimal (mit Vierfach-Bestimmung) in unterschiedlichen Zellpassagen wiederholt.

**B:** Die Untersuchung der *dosisabhängigen* Wirkung von Triptorelin auf die Proliferation der Tumorzellen erforderte die Behandlung der Zellen mit Triptorelin in den Konzentrationen  $10^{-11}$  mol/L,  $10^{-9}$  mol/L,  $10^{-7}$  mol/L und  $10^{-5}$  mol/L am Tag 0. Anschließend wurden die Kulturplatten für 5 Tage im Brutschrank inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit ermittelte man die Zellzahlen in den behandelten 4-Well-Schalen und der mit PBS versetzten Kontrollschale. Dabei wurde wiederum der Inhalt der Kontrollschalen als 100% bezogen auf die behandelten Zellen angesehen.

Auch diese Versuche wurden in unterschiedlichen Zellpassagen dreimal mit Vierfach-Bestimmung ausgeführt.

### 2.3. Statistische Auswertung

Die Versuchsauswertung basiert auf den Tumorzellzahlen der einzelnen Versuchstage. Wie oben erwähnt, wurden pro Versuchstag und zu untersuchender Testsubstanz eine Versuchplatte mit je vier Schalen ausgezählt. Da nun sämtliche Versuche dreimal durchgeführt wurden, lagen alle Werte in zwölfacher Bestimmung vor.

Diese Einzelwerte wurden als erstes auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (=100%) standardisiert. Die Mittelwerte aus den zwölf Werten der jeweiligen Versuchstage gingen in das Ergebnis ein. Zu jedem dieser Werte wurde der Standardfehler (Standard error of mean = SEM) angegeben.

Bei den Versuchen, in denen vier verschiedene Wirkstoffkonzentrationen gegen die Kontrolle verglichen wurden, prüfte der Bartlett-Test innerhalb jeder Gruppe von zwölf Einzelwerten auf Homogenität. Waren ihre Varianzen homogen, so konnte die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgendem Student-Newman-Keuls Test prüfen, ob Unterschiede zwischen den fünf Gruppen bestanden.

In den Versuchsreihen mit zeitabhängigem Verlauf der Proliferationskurven mussten jeweils zwei Gruppen von zwölf Einzelwerten zu einem Zeitpunkt miteinander verglichen werden: Kontrolle versus Wirkstoffkurve. Der nicht parametrische Test nach Mann-Whitney prüfte, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Medianen der beiden Gruppen bestand. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde Signifikanz angenommen.

Die statistischen Tests wurden mit dem Programm InStat von GraphPad Software (Copyright 1993) erhoben.

### 3. ERGEBNISSE

Im folgenden werden die Ergebnisse der Proliferationsversuche gezeigt. Dabei wird das Wachstum der jeweiligen Zelllinie grafisch zuerst als zeit- dann als dosisabhängige Funktion dargestellt. Die Abbildungen III-1 bis III-9 zeigen die beiden Proliferationsanalysen jeweils einer Tumorzelllinie nebeneinander, um eine bessere Übersicht zu geben.

#### 3.1. Antiproliferativer Effekt unter LHRH (zeit- und dosisabhängig)

Als erstes werden die Versuchsergebnisse der Zelllinien betrachtet, die in ihrer Proliferation signifikant durch Triptorelin gehemmt werden konnten. Dies betrifft die Ovarialkarzinomzelllinien NIH:OVCAR-3 und BG-1, sowie die Endometriumkarzinomzelllinien HEC-1B, KLE und AN-3-CA.

Bei der Ovarialkarzinomzelllinie NIH:OVCAR-3 war das Weiterwachstum der behandelten Zellen bereits am ersten Tag auf 88,3% reduziert ( $p < 0,05$ ). Bis Tag 5 konnte es sogar auf 71,6% weitergehemmt werden ( $p < 0,01$ ). Im dosisabhängigen Versuch liegen die Verminderungen der Zellzahl bereits bei niedrigen Triptorelindosen von  $10^{-11}$  mol/L und  $10^{-9}$  mol/L vor ( $p < 0,001$ ). In den beiden höheren Konzentrationen  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$  besteht dieser deutliche Effekt auch zwischen den Gruppen, die Proliferationsinhibition geht bis 58,4%.

Die Zellzahlverminderung der Ovarialkarzinomzelllinie BG-1 äußert sich in den Gruppen unterschiedlicher Triptorelinkonzentration ähnlich: ihre Hemmbarkeit mit  $10^{-9}$  und  $10^{-7}$  M Triptorelin geht bereits bis 80,3 bzw. 76,8% der Ausgangszellzahl ( $p < 0,001$ ), mit  $10^{-5}$  M Triptorelin sogar bis auf 69,7% ( $p < 0,001$ ). In der zeitabhängigen Inkubation ist die Zellzahl nach einem Tag auf 88,9% gesunken ( $p < 0,05$ ), nach 3 Tagen auf 80,9% ( $p < 0,01$ ) und nach 5 Tagen auf 70,8% ( $p < 0,01$ ).

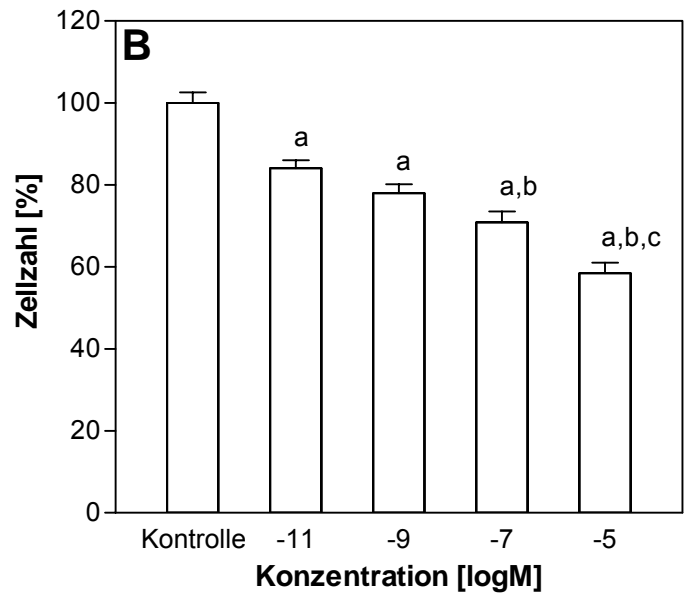
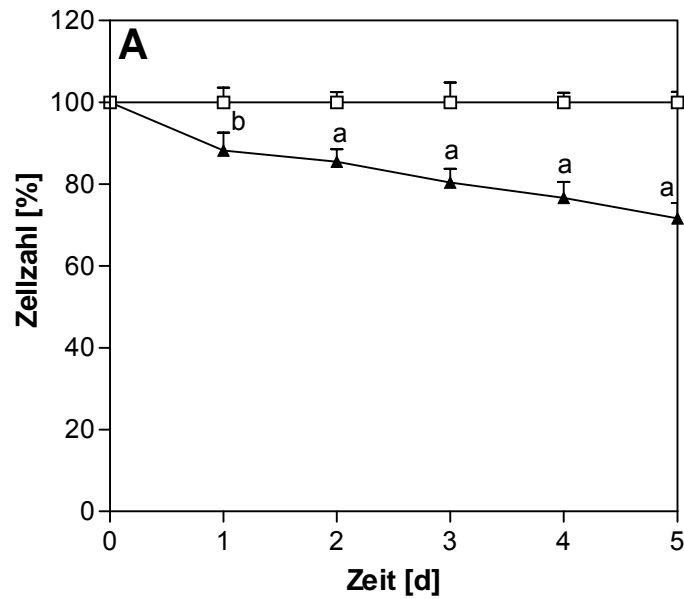
Bei den Endometriumkarzinomzelllinien ist die Proliferationsinhibition der HEC-1B sowohl am ersten Tag unter  $10^{-5}$  M Triptorelin mit 72,1%, als auch nach 5 Tagen unter  $10^{-11}$  M Triptorelin mit 93,0% verbliebenen Karzinomzellen ( $p < 0,001$ ) sehr deutlich. Nach 4 Tagen Inkubation mit  $10^{-5}$  M Triptorelin ist das Wachstum gar auf 52,5% ( $p < 0,001$ ) zurückgedrängt worden. Deutlicher konnte die Proliferationshemmung an keiner anderen der untersuchten Zelllinien gezeigt werden.

Die Zelllinie AN-3-CA spricht in ihrer Hemmbarkeit unter  $10^{-5}$  M Triptorelin an den ersten drei Tagen weniger gut als an den letzten beiden: 62% der Zellen sind am 5. Tag der Inkubation noch am Leben; dagegen ist bei den niedrigeren Wirkstoffkonzentrationen von  $10^{-11}$  mol/L und  $10^{-9}$  mol/L bereits eine deutliche Wachstumshemmung vorhanden: 89,8 bzw. 77,6% verbleibende Karzinomzellen.

Ähnliche Ergebnisse liegen bei der Zelllinie KLE vor: Zwar findet sich beim zeitabhängigen Verlauf am ersten Tag keine und am zweiten keine wesentliche Proliferationshemmung durch  $10^{-5}$  mol/L Triptorelin, jedoch lässt sich das Zellwachstum auf 67,1% am 5. Tag zurückdrängen. Bei Betrachtung der verschiedenen Triptorelinkonzentrationen liegen bei  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$  noch 75,3 bzw. 70,1% der Ausgangszellzahl vor.

Zur Verdeutlichung folgen nun die Grafiken mit antiproliferativem Effekt durch Triptorelin.

## NIH-OVCAR-3

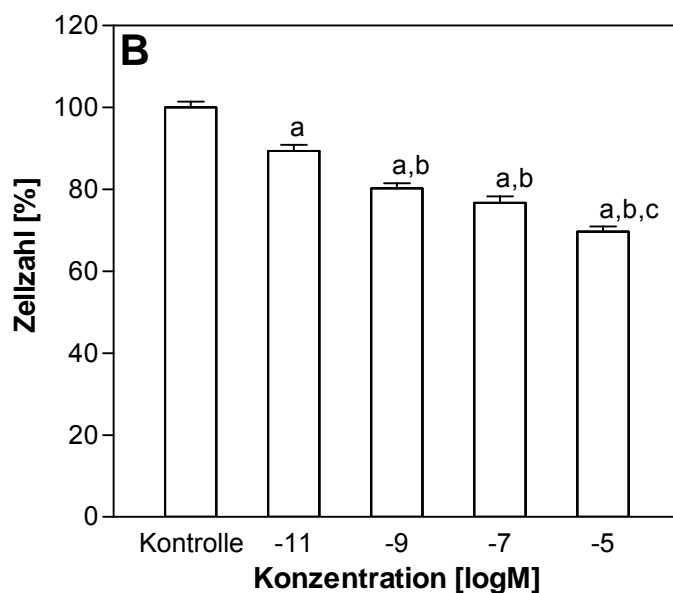
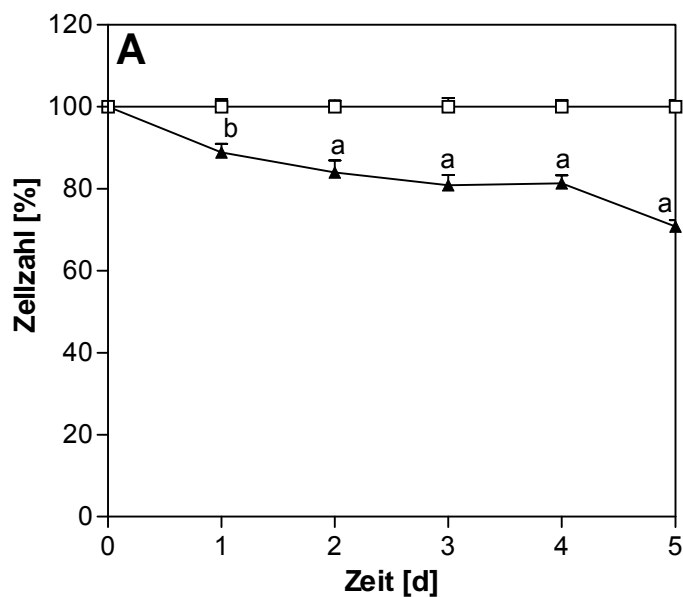


**Abb.III-1:** Zeit- und dosisabhängiger Effekt von Triptorelin auf das Wachstum der Ovarialkarzinomzelllinie NIH-OVCAR-3. Es sind die Ergebnisse von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen in verschiedenen Zellpassagen repräsentiert.

**A)** Proliferation mit (▲) und ohne (□) Triptorelin 10<sup>-5</sup> mol/L über 5 Tage in Prozent der Kontrollen (=100%), angegeben mit dem SEM. Inkubation mit Triptorelin ab Tag 0. Mann Whitney U Test. a: p<0,01 versus Kontrolle, b: p<0,05 versus Kontrolle.

**B)** Proliferation nach 5 Tagen Behandlung mit ansteigenden Triptorelinkonzentrationen 10<sup>-11</sup> bis 10<sup>-5</sup> mol/L in Prozent der Kontrolle als Säulen mit dem SEM. ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test. a: p<0,001 versus Kontrolle, b: p<0,001 versus 10<sup>-11</sup>, c: p<0,001 versus 10<sup>-9</sup> und 10<sup>-7</sup>.

## BG-1



**Abb.III-2:** Zeit- und dosisabhängiger Effekt von Triptorelin auf das Wachstum der Ovarialkarzinomzelllinie BG-1. Es sind die Ergebnisse von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen in verschiedenen Zellpassagen repräsentiert.

**A)** Proliferation mit (▲) und ohne (□) Triptorelin  $10^{-5}$  mol/L über 5 Tage in Prozent der Kontrollen (=100%), angegeben mit dem SEM. Inkubation mit Triptorelin ab Tag 0. Mann Whitney U Test.

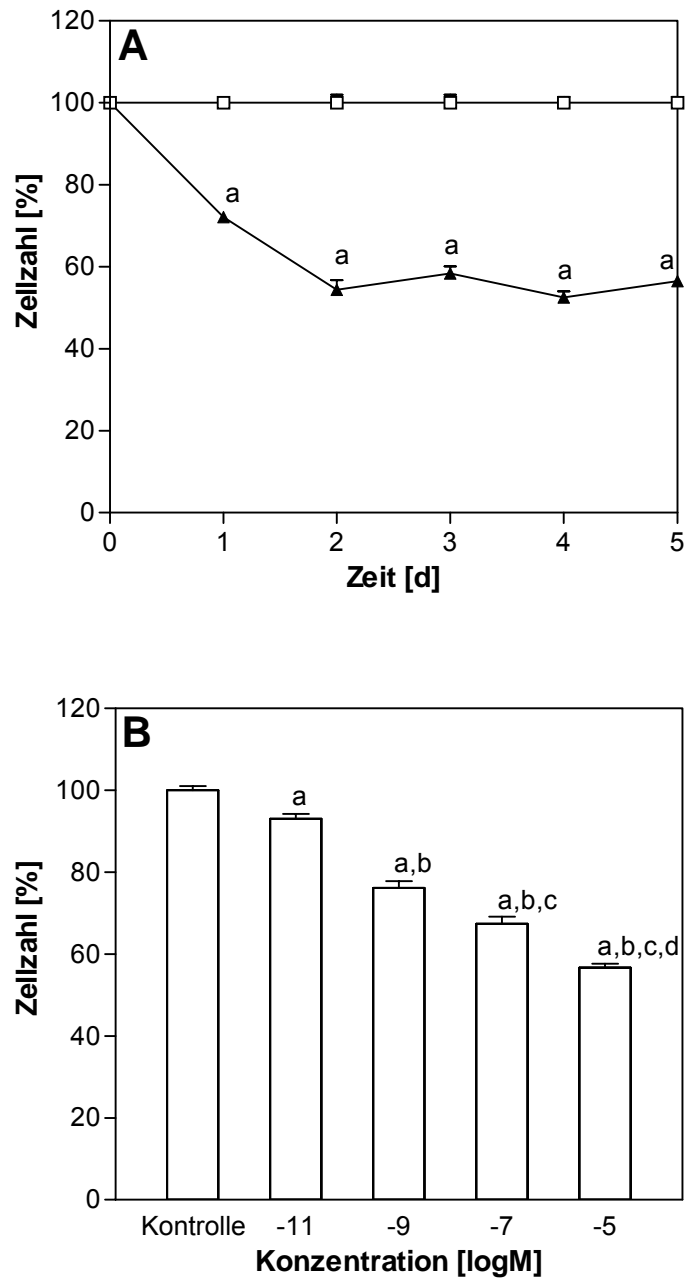
a:  $p < 0,001$  versus Kontrolle, b:  $p < 0,01$  versus Kontrolle.

**B)** Proliferation nach 5 Tagen Behandlung mit ansteigenden Triptorelinkonzentrationen  $10^{-11}$  bis  $10^{-5}$  mol/L in Prozent der Kontrolle als Säulen mit dem SEM. ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test.

a:  $p < 0,001$  versus Kontrolle, b:  $p < 0,001$  versus  $10^{-11}$ , c:  $p < 0,001$  versus  $10^{-9}$  und  $10^{-7}$ .



## HEC-1B



**Abb.III-3:** Zeit- und dosisabhängiger Effekt von Triptorelin auf das Wachstum der Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B. Es sind die Ergebnisse von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen in verschiedenen Zellpassagen repräsentiert.

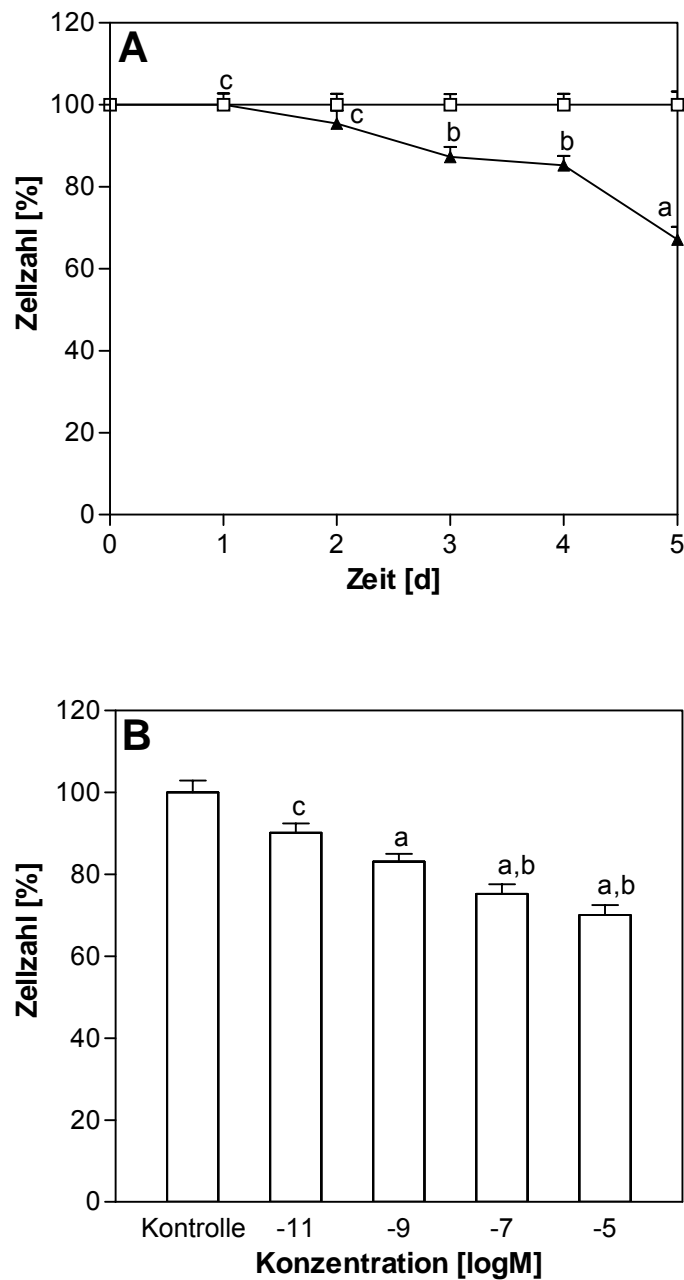
**A)** Proliferation mit (▲) und ohne (□) Triptorelin  $10^{-5}$  mol/L über 5 Tage in Prozent der Kontrollen (=100%), angegeben mit dem SEM. Inkubation mit Triptorelin ab Tag 0. Mann Whitney U Test.

a:  $p < 0,001$  versus Kontrolle.

**B)** Proliferation nach 5 Tagen Behandlung mit ansteigenden Triptorelinkonzentrationen  $10^{-11}$  bis  $10^{-5}$  mol/L in Prozent der Kontrolle als Säulen mit dem SEM. ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test.

a:  $p < 0,001$  versus Kontrolle, b:  $p < 0,001$  versus  $10^{-11}$ , c:  $p < 0,001$  versus  $10^{-9}$ , d:  $p < 0,001$  versus  $10^{-7}$ .

## KLE



**Abb.III-4:** Zeit- und dosisabhängiger Effekt von Triptorelin auf das Wachstum der Endometriumkarzinomzelllinie KLE. Es sind die Ergebnisse von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen in verschiedenen Zellpassagen repräsentiert.

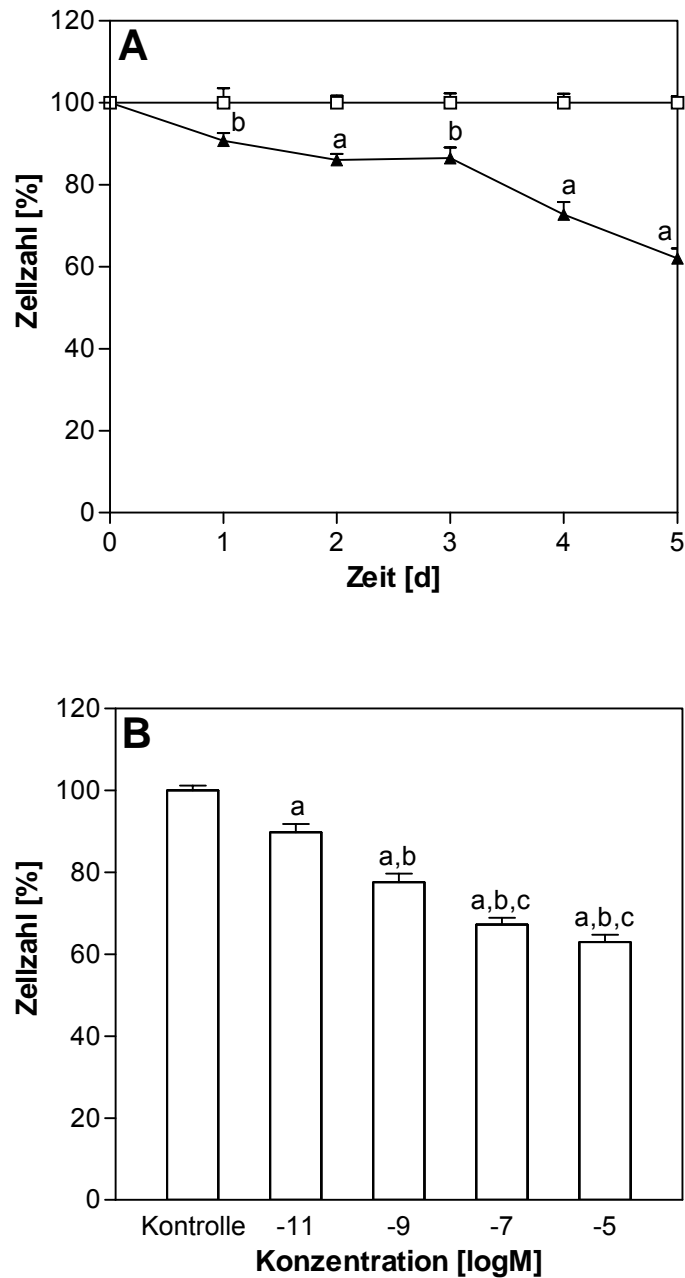
**A)** Proliferation mit (▲) und ohne (□) Triptorelin  $10^{-5}$  mol/L über 5 Tage in Prozent der Kontrollen (=100%), angegeben mit dem SEM. Inkubation mit Triptorelin ab Tag 0. Mann Whitney U Test.

a:  $p < 0,001$  versus Kontrolle, b:  $p < 0,01$  versus Kontrolle, c:  $p > 0,05$  versus Kontrolle.

**B)** Proliferation nach 5 Tagen Behandlung mit ansteigenden Triptorelinkonzentrationen  $10^{-11}$  bis  $10^{-5}$  mol/L in Prozent der Kontrolle als Säulen mit dem SEM. ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test.

a:  $p < 0,001$  versus Kontrolle, b:  $p < 0,001$  versus  $10^{-11}$ , c:  $p < 0,01$  versus Kontrolle.

### AN-3-CA



**Abb.III-5:** Zeit- und dosisabhängiger Effekt von Triptorelin auf das Wachstum der Endometriumkarzinomzelllinie AN-3-CA. Es sind die Ergebnisse von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen in verschiedenen Zellpassagen repräsentiert.

**A)** Proliferation mit (▲) und ohne (□) Triptorelin  $10^{-5}$  mol/L über 5 Tage in Prozent der Kontrollen (=100%), angegeben mit dem SEM. Inkubation mit Triptorelin ab Tag 0. Mann Whitney U Test.

a:  $p < 0,001$  versus Kontrolle, b:  $p < 0,01$  versus Kontrolle.

**B)** Proliferation nach 5 Tagen Behandlung mit ansteigenden Triptorelinkonzentrationen  $10^{-11}$  bis  $10^{-5}$  mol/L in Prozent der Kontrolle als Säulen mit dem SEM. ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test.

a:  $p < 0,001$  versus Kontrolle, b:  $p < 0,001$  versus  $10^{-11}$ , c:  $p < 0,001$  versus  $10^{-9}$ .

### **3.2. Ausbleibender antiproliferativer Effekt unter LHRH (zeit- und dosisabhängig)**

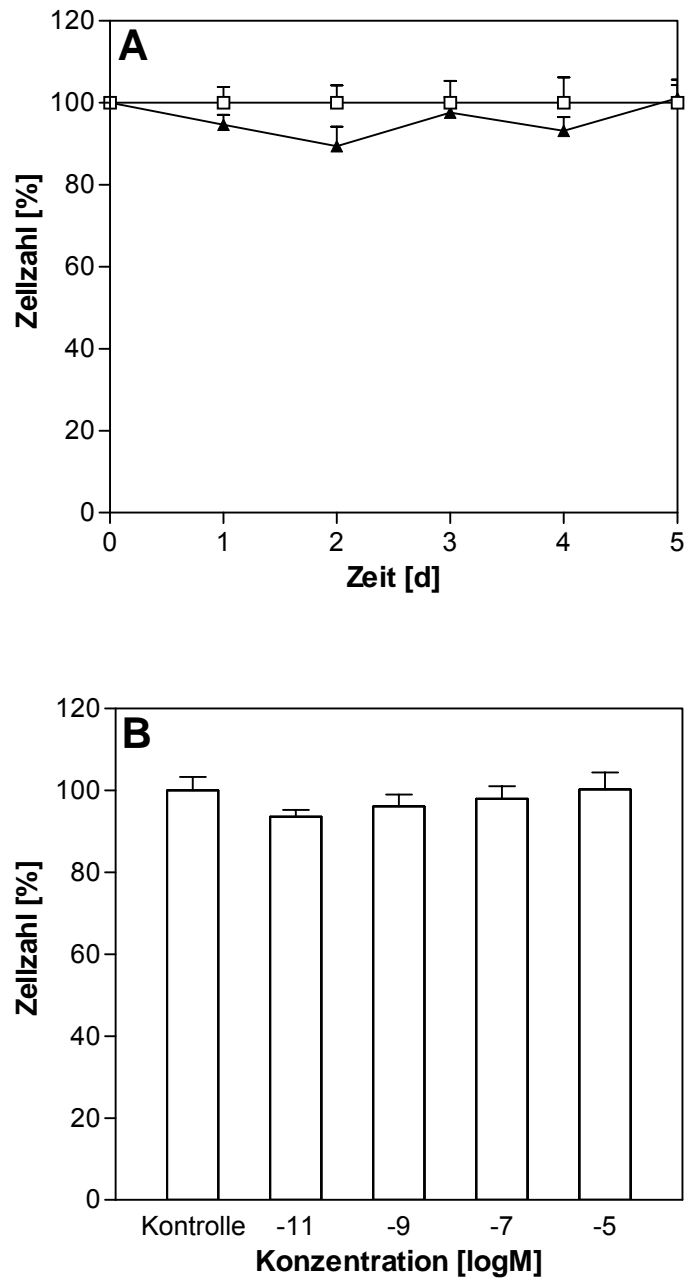
In den bisher gezeigten Versuchen kam es zum Teil schon unter den niedrigen Triptorelindosen  $10^{-11}$  und  $10^{-9}$  mol/L, deutlich jedoch unter den höheren ( $10^{-7}$  und  $10^{-5}$  mol/L) zu einer Wachstumshemmung bei zwei Ovarial- und drei Endometriumkarzinomzelllinien. So signifikant diese Versuche den antiproliferativen Effekt des LHRH-Agonisten beschreiben, so deutlich zeigen die folgenden Versuche das Ausbleiben eines derartigen Effektes:

Bei den Ovarialkarzinomzelllinien SK-OV-3, CA-OV-3 und SW 626, sowie bei der Endometriumkarzinomzelllinie MFE-296 konnte keine signifikante antiproliferative Wirkung durch Triptorelin gezeigt werden.

Während bei den drei Ovarialkarzinomzelllinien sämtliche Werte im zeit- und dosisabhängigen Verlauf weder Hinweise auf eine Hemmung, noch auf eine Steigerung der Zellproliferation geben, so bietet die Endometriumkarzinomzelllinie MFE-296 eine kleine Auffälligkeit: Am 3. Tag nach Behandlung mit  $10^{-5}$ M Triptorelin und bei den beiden höheren Konzentrationen mit  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$  mol/L findet sich eine geringfügige Hemmung gegenüber der Kontrolle zwischen 7 und 10% ( $p < 0,05$  versus Kontrolle). In der eingangs erwähnten Paralleluntersuchung dieser Zelllinien wurde in der MFE-296 keine hochaffine LHRH-Bindungsstelle detektiert, wohl aber die mRNA für den hypophysären LHRH-Rezeptor. Bei den im Proliferationsassay klar negativen Zelllinien für Triptorelin konnte weder die hochaffine Bindungsstelle, noch die Rezeptor-mRNA gefunden werden. Möglicherweise ist die geringfügige Hemmung der MFE-296 also Ausdruck einer fraglichen LHRH-Sensibilität.

Zur Verdeutlichung folgen nun wieder die grafischen Darstellungen des ausbleibenden proliferativen Effektes von Triptorelin.

## SK-OV-3



**Abb.III-6:** Zeit- und dosisabhängiger Effekt von Triptorelin auf das Wachstum der Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3. Es sind die Ergebnisse von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen in verschiedenen Zellpassagen repräsentiert.

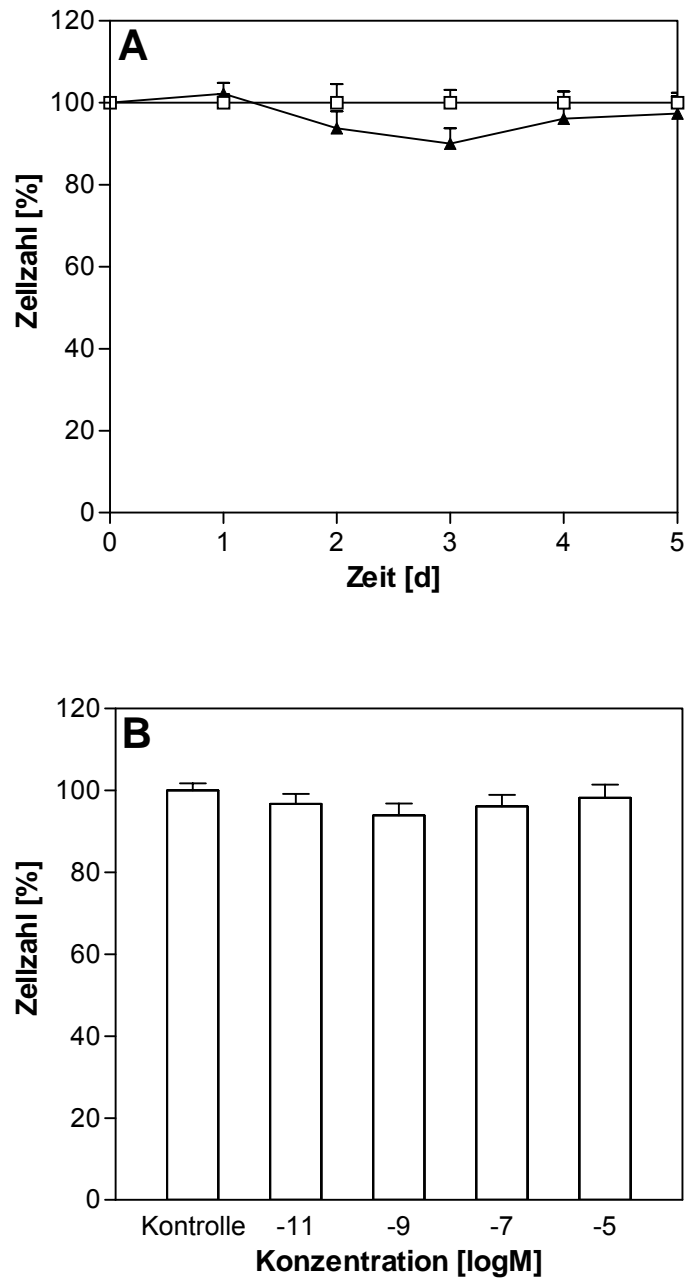
**A)** Proliferation mit (▲) und ohne (□) Triptorelin  $10^{-5}$  mol/L über 5 Tage in Prozent der Kontrollen (=100%), angegeben mit dem SEM. Inkubation mit Triptorelin ab Tag 0. Mann Whitney U Test.

p jeweils  $>0,05$ , das heißt es kam zu keiner signifikanten Proliferationsinhibition.

**B)** Proliferation nach 5 Tagen Behandlung mit ansteigenden Triptorelinkonzentrationen  $10^{-11}$  bis  $10^{-5}$  mol/L in Prozent der Kontrolle als Säulen mit dem SEM. ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test.

p jeweils  $>0,05$ , das heißt es kam zu keiner signifikanten Proliferationsinhibition.

## CA-OV-3



**Abb.III-7:** Zeit- und dosisabhängiger Effekt von Triptorelin auf das Wachstum der Ovarialkarzinomzelllinie CA-OV-3. Es sind die Ergebnisse von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen in verschiedenen Zellpassagen repräsentiert.

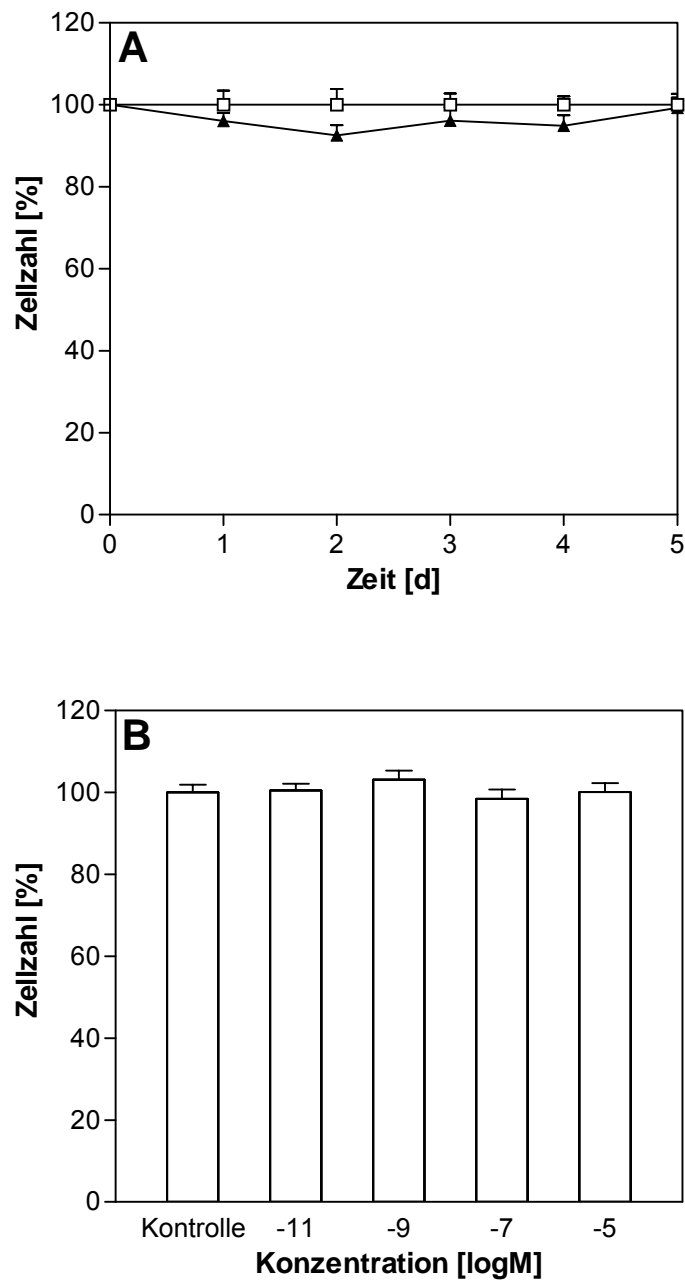
**A)** Proliferation mit (▲) und ohne (□) Triptorelin  $10^{-5}$  mol/L über 5 Tage in Prozent der Kontrollen (=100%), angegeben mit dem SEM. Inkubation mit Triptorelin ab Tag 0. Mann Whitney U Test.

p jeweils  $>0,05$ , das heißt es kam zu keiner signifikanten Proliferationsinhibition.

**B)** Proliferation nach 5 Tagen Behandlung mit ansteigenden Triptorelinkonzentrationen  $10^{-11}$  bis  $10^{-5}$  mol/L in Prozent der Kontrolle als Säulen mit dem SEM. ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test.

p jeweils  $>0,05$ , das heißt es kam zu keiner signifikanten Proliferationsinhibition.

## SW 626



**Abb.III-8:** Zeit- und dosisabhängiger Effekt von Triptorelin auf das Wachstum der Ovarialkarzinomzelllinie SW 626. Es sind die Ergebnisse von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen in verschiedenen Zellpassagen repräsentiert.

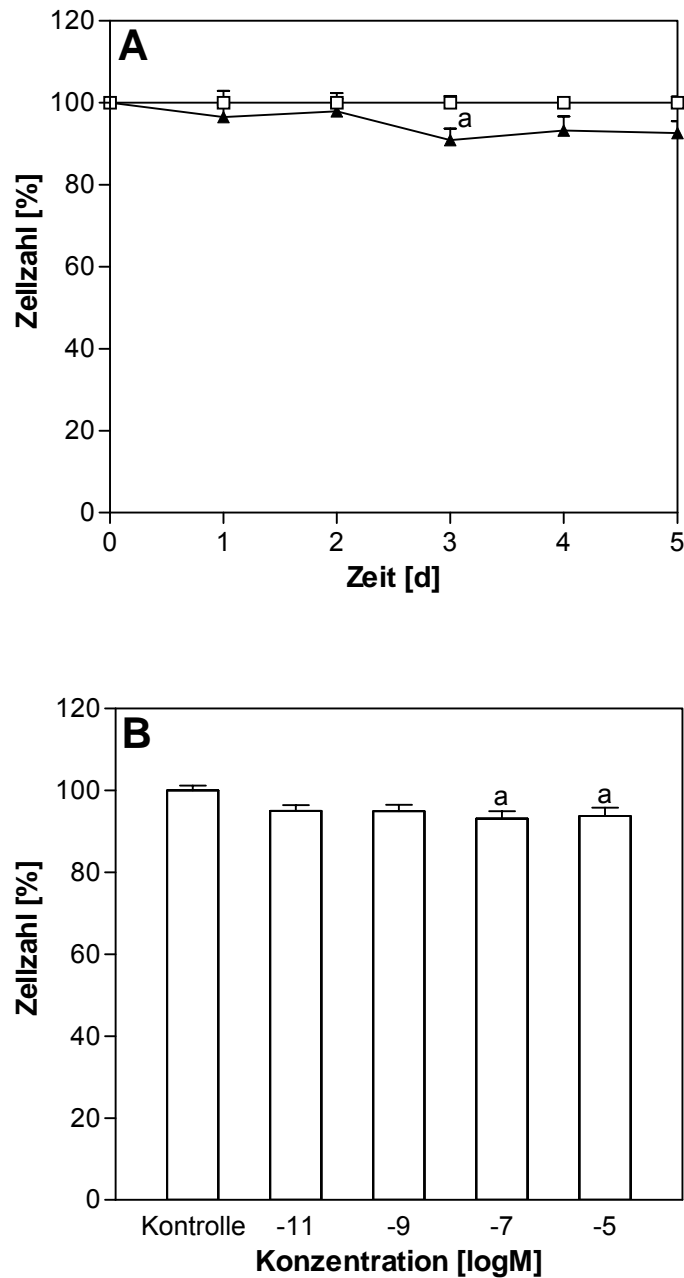
**A)** Proliferation mit (▲) und ohne (□) Triptorelin  $10^{-5}$  mol/L über 5 Tage in Prozent der Kontrollen (=100%), angegeben mit dem SEM. Inkubation mit Triptorelin ab Tag 0. Mann Whitney U Test.

p jeweils  $>0,05$ , das heißt es kam zu keiner signifikanten Proliferationsinhibition.

**B)** Proliferation nach 5 Tagen Behandlung mit ansteigenden Triptorelinkonzentrationen  $10^{-11}$  bis  $10^{-5}$  mol/L in Prozent der Kontrolle als Säulen mit dem SEM. ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test.

p jeweils  $>0,05$ , das heißt es kam zu keiner signifikanten Proliferationsinhibition.

## MFE-296



**Abb.III-9:** Zeit- und dosisabhängiger Effekt von Triptorelin auf das Wachstum der Endometriumkarzinomzelllinie MFE-296. Es sind die Ergebnisse von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen in verschiedenen Zellpassagen repräsentiert.

**A)** Proliferation mit (▲) und ohne (□) Triptorelin  $10^{-5}$  mol/L über 5 Tage in Prozent der Kontrollen (=100%), angegeben mit dem SEM. Inkubation mit Triptorelin ab Tag 0. Mann Whitney U Test.

a:  $p < 0,05$  versus Kontrolle; ansonsten  $p > 0,05$  versus Kontrolle, d.h. keine signifikante Inhibition.

**B)** Proliferation nach 5 Tagen Behandlung mit ansteigenden Triptorelinkonzentrationen  $10^{-11}$  bis  $10^{-5}$  mol/L in Prozent der Kontrolle als Säulen mit dem SEM. ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test.

a:  $p < 0,05$  versus Kontrolle; ansonsten  $p > 0,05$  versus Kontrolle, d.h. keine signifikante Inhibition.



#### 4. DISKUSSION

Gynäkologische Malignome wie das Ovarial- und das Endometriumkarzinom lassen sich durch LHRH-Analoga in ihrer Proliferation hemmen. Seit Anfang der 90er Jahre wurden in Arbeiten über diesen Effekt Erkenntnisse gewonnen (Emons et al. 1992a und b, Emons et al. 1993b und c), die Hinweise auf mögliche Therapieansätze liefern. Da diese Ergebnisse exemplarisch an einzelnen etablierten Zelllinien erhoben wurden, stellt sich die wichtige Frage, ob antiproliferative Effekte durch LHRH-Analoga auch an anderen bereits charakterisierten Zelllinien beobachtet werden können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit müssen zum einen vor dem Hintergrund des breiten Wissens betrachtet werden, das sich vor allem im letzten Jahrzehnt ergeben hat. Zum anderen muß ein Zusammenhang mit Resultaten anderer Mitarbeiter hergestellt werden, die zur gleichen Zeit an den hier untersuchten Zelllinien mit anderen Methoden Ergebnisse erzielt haben, die absolut im Einklang mit den beobachteten Effekten stehen (Völker et al 2002).

Da die Entstehung eines Tumors und seine Entwicklung mit multiplen genetischen Veränderungen einhergeht, ist es denkbar, daß autokrine und/oder parakrine Rückkopplungsmechanismen von Hormonen synergistisch mit molekularen Defekten einhergehen. Auf diesem Wege werden möglicherweise Proliferationsvorteile für Tumorzellen vermittelt. Ein wichtiger Schritt in der Beurteilung der Wirkweise von Peptidhormonen ist die Signalweiterleitung über Rezeptoren und spezifische Effektoren in der humanen Zelle. Während dieser Signaltransduktionsmechanismus für LHRH in Hypophysenzellen weitgehend untersucht ist (Naor 1990, Stojilkovic und Catt 1995), liegen über die Mechanismen in Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen auch heute noch keine vollständigen Erkenntnisse vor.

Das Vorhandensein von LHRH und LHRH-Rezeptoren in Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien, sowie entsprechenden Tumorgewebe, aber auch die proliferationshemmende Wirkung von GnRH-Analoga wie z.B. dem LHRH-Agonisten Triptorelin an etablierten Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien (EFO 21 und EFO 27 bzw. HEC1-A und Ishikawa) konnte bereits vor einigen Jahren gezeigt werden (Emons et al. 1993b und c, Irmer et al 1994 und 1995).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich nun zum einen mit der Überprüfung weiterer Ovarial- und Endometrium-Ca-Zellen auf ihr antiproliferatives Verhalten nach Einwirken des LHRH-Agonisten Triptorelin in Zeit- und Dosisabhängigkeit. Zum anderen soll versucht werden, Rückschlüsse bezüglich der Wirkungsweise zu ziehen: Zeitgleich wurden an denselben Zelllinien mit Radioliganden-assays hochaffine Bindungsstellen für LHRH-Analoga untersucht und mit Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)-Amplifikationen die Expression der LHRH-Rezeptor m-RNA überprüft (Völker et al. 2002).

Dies bedeutet, dass widersprüchliche Ergebnisse vergangener Versuchsreihen durch die Korrelation von antiproliferativem Effekt mit dem Vorhandensein hochaffiner Bindungsstellen erklärt werden können.

Zu Beginn der Versuchsreihen wurden die bereits untersuchten Zelllinien EFO 21, HEC-1A und Ishikawa zum Überprüfen der Methodik auf ihr Proliferationsverhalten nach Zugabe des LHRH-Agonisten Triptorelin getestet. Es konnten die hochsignifikanten Wachstumshemmkurven nachvollzogen werden, wie sie die Arbeitsgruppen um Thompson, Emons und Irmer Anfang der 90er Jahre gezeigt hatten.

Fortgesetzt wurden die Versuche dann wie unter 2.3. beschrieben als zeit- und dosisabhängige Proliferationsassays mit fünf weiteren Ovarial- und vier Endometriumkarzinomzelllinien:

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten weisen einen durch Triptorelin signifikant verursachten antiproliferativen Effekt bei den Endometrium-Ca-Zelllinien HEC-1B, KLE und AN-3-CA nach, während MFE-296 unbeeinflusst wächst. Bei den Ovarial-Ca-Zelllinien werden NIH:OVCAR-3 und BG-1 im Wachstum signifikant gehemmt, während SK-OV-3, CA-OV-3 und SW 626 keinen antiproliferativen Effekt durch Triptorelin zeigen.

Bei sämtlichen durch den LHRH-Agonisten in der Proliferation gehemmt Zelllinien konnte sowohl die Expression der m-RNA für den hypophysären LHRH-Rezeptor als auch hochaffine LHRH-Bindungsstellen nachgewiesen werden (Völker et al. 2002). SK-OV-3 und SW 626 dahingegen exprimierten weder diese Bindungsstellen, noch die LHRH-Rezeptor-m-RNA, korrelierend blieb die Zellproliferation unbeeinflusst von Triptorelin. Bei der Endometriumkarzinomzelllinie MFE-296 wurde keine hochaffine LHRH-Bindungsstelle gefunden, obwohl die m-RNA für den hypophysären LHRH-Rezeptor exprimiert wurde. Am 3. Tag nach Behandlung mit  $10^{-5}$ M Triptorelin und bei den beiden höheren Konzentrationen mit  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$  mol/L war eine geringfügige Hemmung gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen (zwischen 7 und 10% mit  $p < 0,05$  versus Kontrolle). In dieser Zelllinie konnte somit lediglich eine margi-

nale Hemmung erreicht werden, die deutlich geringer ausfiel als in den Zelllinien mit messbarer Expression des hochaffinen Rezeptorproteins.

Parallel dazu untersuchten weitere Mitarbeiter die Reaktion der Tumorzellen auf den LHRH-Antagonisten Cetrorelix. Dabei wurden die inhibitorischen Effekte von LHRH-Agonisten und LHRH-Antagonisten, die von Emons et al. (1993b und c) gezeigt werden konnten, für die in unserem Labor etablierten Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien als Tumormodell reproduziert. Die zeit- und dosisabhängigen antiproliferativen Wirkungen des LHRH-Agonisten [D-Trp<sup>6</sup>]LHRH (Triptorelin) und des LHRH-Antagonisten SB-75 (Cetrorelix) konnten bestätigt werden, wobei Triptorelin und Cetrorelix in Dosen von 10 µmol/L bis 1 nmol/L signifikante inhibitorische Effekte ausübten. Außer bei der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27 konnten bei allen anderen Zelllinien keine Unterschiede der inhibitorischen Effekte zwischen dem Agonisten Triptorelin und dem Antagonisten Cetrorelix gefunden werden. In EFO-27 Zellen nahm Cetrorelix selbst bei einer Konzentration von 10 µmol/L keinen Einfluß auf die Zellproliferation, während durch Triptorelin die erwähnten zeit- und dosisabhängigen Effekte hervorgerufen wurden. Einen weiteren Hinweis auf den Wirkmechanismus der verschiedenen LHRH-Analoga konnte von Emons et al. (1993a) und Irmer et al. (1995) durch eine simultane Behandlung der Zelllinien EFO-27 mit Triptorelin und Cetrorelix geliefert werden. Dabei erfolgte die Antagonisierung der antiproliferativen Wirkung von Triptorelin eindeutig in Abhängigkeit der eingesetzten Agonisten- und Antagonistendosis.

Die Interaktionen der beiden LHRH-Analoga können so offensichtlich nicht mit einfachen Verdrängungsreaktionen an den spezifischen Bindungsstellen erklärt werden. Es muß ein komplexer Mechanismus zugrunde liegen, bei dem über Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion spezifische zelluläre Funktionen hervorgerufen werden. Unter der Berücksichtigung der Ergebnisse anderer Forschergruppen kann davon ausgegangen werden, daß die inhibitorische Aktivität eine direkte Wirkung der LHRH-Analoga auf die Tumorzellen darstellt.

Da seit Ende der 1990er Jahre ein zweites GnRH-System, GnRH-II und sein Rezeptor, bekannt ist (White et al. 1998, Blumenrohr et al. 1999, Neill et al. 2001, Sun et al. 2001, Gründer et al. 2002), wurde in einer neueren Untersuchung die antiproliferative Wirkung von Triptorelin, Cetrorelix und GnRH-II an Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien überprüft. Nachdem der GnRH-I-Rezeptor ausgeschaltet war, hatte der GnRH-I-Agonist Triptorelin keinen antiproliferativen Effekt mehr, wohl aber der GnRH-I-Antagonist Cetrorelix und GnRH-II. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass in Ovarial- und Endometriumkarzinomzel-

len die wachstumshemmende Wirkung von Cetrorelix und GnRH-II nicht über den GnRH-I-Rezeptor vermittelt werden (Gründker et al. 2004).

Bereits sehr viel früher konnte demonstriert werden, daß die Hemmung der Proliferation in einer Ovarialkarzinomzelllinie, die durch den LHRH-Agonisten Leuprorelin induziert wird, nicht auf zytotoxische Effekte des Pharmakons oder auf eine erhöhte Apoptoserate in den Kulturen zurückzuführen ist. Tatsächlich geht die Behandlung der Zellen mit einer verminderten DNA-Synthese einher, die sich in einer abnehmenden Zahl an Zellen in der Synthesephase des Zellzyklus äußert (Thompson et al. 1991).

Limonta et al. (1992) beobachteten signifikante antiproliferative Effekte der LHRH-Agonisten Buserelin und Goserelin in Konzentrationen von 1 nmol/L bis zu 1 µmol/L an Zellen der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP. Die angeführten Untersuchungen legen die Vermutung nahe, daß die inhibitorische Aktivität von LHRH-Agonisten ein generelles Prinzip bei der Behandlung von hormonsensitiven Tumorzellen darstellt, die zudem in den Plasmamembranen spezifische LHRH-Bindungsstellen aufweisen, die diese Wirkung vermitteln können. Limonta et al. (1992) berichteten zunächst über antiproliferative Wirkungen eines LHRH-Antagonisten in hohen Konzentrationen (1 µmol/L) auf Prostatakarzinomzellen, während in einer späteren Studie der Gruppe (Limonta et al. 1993) stimulierende Effekte dieser Substanz aufgezeigt wurden. Man versuchte, diesen Widerspruch mit unterschiedlichen Kulturbedingungen (Abwesenheit von Steroiden) zu erklären (Montagnani-Marelli et al. 1997).

Um solche Effekte auszuschließen, wurden die antiproliferativen Effekte von Triptorelin auf Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen unter serum- und phenolrotfreien Bedingungen nachgewiesen (Emons et al. 1994, 1996a).

Diese Erkenntnisse und die eigenen Untersuchungen führen zu der Erkenntnis, daß sowohl Triptorelin als auch Cetrorelix generelle antiproliferative Eigenschaften hinsichtlich ihrer Wirkungen auf Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen *in vitro* vermitteln. Der LHRH-Agonist Triptorelin führte in 4 von 6 Ovarialkarzinomzelllinien und in 5 von 6 Endometriumkarzinomzelllinien zu einer signifikanten Proliferationsinhibition (Völker et al. 2002). Entscheidend dabei ist, daß die Proliferationsinhibition mit der Expression von LHRH-Rezeptoren einhergeht. Die LHRH-Analoga wirken nur auf die Karzinomzelllinien antiproliferativ, die auch hochaffine LHRH-Bindungsstellen exprimieren. In den Zelllinien, die keine LHRH-Bindungsstellen aufweisen, konnten keine wachstumshemmenden Effekte durch LHRH demonstriert werden. Bis auf die bereits erwähnte Diskrepanz bei der Ovarialkarzinomzelllinie EFO-27 zeigt der LHRH-Antagonist Cetrorelix bei allen Zelllinien eine ebenfalls signifikante Wachstumsreduktion zwischen 30 und 40 %. Dennoch scheint aber der Wirkme-

chanismus von LHRH-Analoga keinem einheitlichen Prinzip allgemein für Karzinomzellen zu folgen und es liegen offensichtlich unterschiedliche Reaktionsmechanismen in unterschiedlichen Geweben vor.

Diese Tatsachen können Grund zu der Annahme geben, dass LHRH-Agonisten die Proliferation von menschlichen Ovarial- und Endometriumzellen auf direktem Wege hemmen.

Ebenfalls unsere Arbeitsgruppe (Gründker et al. 2000a) konnte keinen Anstieg der Apoptose rate in Ovarial- oder Endometriumzellen nach Behandlung mit Triptorelin nachweisen. Es wurde gezeigt, dass Triptorelin die Apoptose in Zellsystemen reduzieren konnte, die vorher mit dem Zytostatikum Doxorubicin behandelt worden waren. Dies deckt sich wiederum mit der oben beschriebenen Entdeckung von Thompson et al. 1991, dessen Arbeitsgruppe bereits die Verursachung der Apoptose durch LHRH-Analoga ausschloß.

Daß bei der Untersuchung der Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 in unseren Versuchen kein antiproliferativer Effekt bei fehlender Rezeptorexpression gefunden wurde und im Gegensatz dazu die Arbeitsgruppe Imai solche Effekte zu verzeichnen hatte, da ihre Zelllinie offenbar den LHRH-Rezeptor besaß, scheint nun nachvollziehbar (Imai et al. 1994a und b). Mutationen innerhalb der Zelllinien, z.B. in hohen Passagen, können hierfür eine Erklärung darstellen. Auch können die fehlenden antiproliferativen Effekte anderer Labore, die Zelllinien ohne LHRH-Rezeptor eingesetzt haben, teilweise so hergeleitet werden (Chatzaki et al. 1996).

Die offensichtlich in größerem Umfang bestehenden biologischen Aktivitäten der LHRH-Analoga bei der Beeinflussung von Ovarial- und Endometriumkarzinomen lassen vermuten, daß LHRH selbst durch die Tumorzellen produziert wird. Da die Wirksamkeit eines autokrinen Botenstoffes erst eintritt, wenn die gebildete Substanz durch die Zellen sezerniert wird, wurde das Vorhandensein von LHRH in Tumorgewebe untersucht. Erfolgreiche Versuche konnten LHRH-Aktivität in Extrakten aus Zellen der Tumorzelllinien sowie primärem Tumorgewebe demonstrieren. Ohno et al. (1993) und Irmer et al. (1994, 1995) konnten LHRH in Extrakten von Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien nachweisen. Diese Befunde stehen im Einklang mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen an den im Labor etablierten Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien. Insgesamt wurde in allen untersuchten Zelllinien sowie in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 die Existenz von LHRH immunologisch nachgewiesen. Unter der Berücksichtigung der Tatsache, daß außerdem 32 der 32 Proben (100 %) von Ovarialkarzinomgewebe und 8 der 8 Endometriumkarzinomproben, die im

Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, LHRH-Aktivität produzierten, muß man annehmen, daß Karzinomzellen in vivo LHRH bilden und auch sezernieren (Völker et al. 2002).

Ohno et al. (1993) in Rattengranulosazellen und Irmer et al. (1994, 1995) in Rattenhypophysenzellen konnten darüber hinaus demonstrieren, daß sich die angereicherte LHRH-Immunreaktivität in der Wirkung von authentischem LHRH nicht unterscheiden läßt und ebenso funktional ist.

Nachdem eine immunologisch reaktive und biologisch wirksame LHRH-Aktivität in Tumorzelllinien und in Proben von Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien gezeigt werden konnte, mussten als nächstes die etablierten Zelllinien und Proben solider Tumoren hinsichtlich der Expression spezifischer LHRH-Bindungsstellen überprüft werden: Emons et al. (1993b und c) gelang der Nachweis einer hochaffinen Bindungsstelle mit niedriger Kapazität und einer niedrigaffinen Bindungsstelle mit hoher Affinität in Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien. Auch Imai et al. (1994a und b) detektierten hochaffine Bindungsstellen in Proben aus Ovarialkarzinomgeweben. Da die Dissoziationskonstanten der nachgewiesenen hochaffinen Bindungsstelle im nanomolaren Bereich liegen und biologische Wirkungen von LHRH-Agonisten bereits bei diesen Konzentrationen signifikant werden, erscheint die Annahme gerechtfertigt, daß es sich bei dieser Bindungsstelle um einen Rezeptor handelt, durch den die antiproliferativen Effekte der LHRH-Agonisten *direkt* vermittelt werden. Außerdem sind die beobachteten Bindungseigenschaften vergleichbar mit denen der gonadotropen Hypophysenzellen (Kakar et al. 1994, Gründker und Emons 1999).

Die Authentizität des beschriebenen LHRH-Rezeptors und die genetische Übereinstimmung mit dem hypophysären LHRH-Rezeptor gelang Kakar et al. (1992) und konnte von Irmer et al. (1994, 1995) durch den Nachweis der LHRH-Rezeptor mRNA in Tumorgewebe und Karzinomzelllinien untermauert werden. Es kann somit davon ausgegangen werden, daß diesem Typ der Bindungsstellen bei der Manipulation von Tumorzellen mit LHRH-Analoga eine besondere Bedeutung zukommt. Und weil es sich um einen spezifischen Rezeptor handelt, scheint die Expression von LHRH-Bindungsstellen bei gynäkologischen Tumoren ein überwiegendes Prinzip zu sein.

Unklarheiten über die Identität der nachgewiesenen LHRH-Aktivität und der spezifischen Bindungsstellen sollten weitere Versuche auf molekularbiologischer Ebene erbringen. Mithilfe dieser Methoden konnte gezeigt werden, dass der klassische Weg der LHRH-Rezeptor-Signaltransduktion wie er aus der Hypophyse bekannt ist, nicht an der Übermittlung antiproliferativer Effekte in Tumorzelllinien beteiligt ist. Es konnte vielmehr gezeigt werden, dass

LHRH-Analoga in die mitogene Signaltransduktion des Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-R) eingreifen (Arencibia und Schally 2000, Gründker et al.2002).

Daß der mitogene Effekt des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) durch Triptorelin down-reguliert werden kann, wurde bereits beschrieben (Emons et al. 1997). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der Erkenntnis, dass über den Weg der EGF-Inhibition durch LHRH-Analoga die EGF-abhängige Tyrosinkinase-Aktivität reduziert wird, indem eine Phosphotyrosinphosphatase aktiviert wird (Imai et al. 1996a und 2000, Gründker et al 2002).

Die Tatsache, dass direkt antiproliferative Effekte durch LHRH-Analoga und ihre assoziierte Modulation der EGF-Signaltransduktion von unterschiedlichen Arbeitsgruppen nicht nur in Ovarial- und Endometriumkarzinomen gefunden wurden, sondern auch in anderen LHRH-Rezeptor exprimierenden Geweben wie Mamma- und Prostatakarzinom, weist auf ein LHRH-basiertes autokrines System im Ovarial- und Endometriumkarzinom hin (Motta et al 1996, Montagnani-Marelli et al. 1999, Kang et al. 2000 und 2001).

Um die Daten, die durch die Untersuchung der Karzinomzelllinien entstanden waren, durch in vivo Daten zu stützen, untersuchte unsere Arbeitsgruppe zusätzlich die Biopsien frisch operierter Ovarial- und Endometriumkarzinome mit den eingangs erwähnten molekularbiologischen Methoden (Völker et al. 2002). Hierbei konnte in 70% der Ovarialkarzinom- und in 83% der Endometriumkarzinom-Biopsien die Expression des LHRH-Rezeptors nachgewiesen werden. Nun kann spekuliert werden, dass diese Tumoren durch LHRH-Analoga-Behandlung beeinflusst werden können. Diese Untersuchungen an frischem Tumormaterial könnten einen weiteren Schritt zur zielgerichteten hormonellen Behandlung mit LHRH-Analoga bedeuten, denn angesichts der Häufigkeit seiner Inzidenz in frischen Tumorgeweben ist anzunehmen, dass in den meisten Ovarial- und Endometriumkarzinomen der LHRH-Rezeptor exprimiert wird.

Erste klinische Daten lieferte eine Phase-II-Studie, die von uns mit einer texanischen Arbeitsgruppe durchgeführt wurde. Der LHRH-Antagonist Cetrorelix wurde bei Patientinnen mit platinresistentem Ovarialkarzinom eingesetzt. 3 von 17 Patientinnen hatten Partialremissionen bis zu 17 Wochen. Von 7 entnommenen Tumorproben waren 6 LHRH-Rezeptor positiv, eine negativ. Zwei der Patientinnen mit Remissionen war Rezeptor positiv, die Rezeptor negative Patientin zeigte keinen Therapieerfolg. Die antiproliferative Wirkung von Cetrorelix ist somit auch in vivo demonstriert, wenn auch unklar bleibt, über welchen Mechanismus (Verschraegen et al. 2003).

Zukünftige Therapieformen wären im Sinne eines sogenannten Drug-Targeting zu sehen, mit dem zielgerichtet zytotoxische oder radiogene Substanzen über LHRH-Analoga die Tumor-

zelle in wesentlich höherem Maße schädigen könnten, als das Peptidhormon alleine. Eine so ausgerichtete Phase-II-Studie mit dem zytotoxischen LHRH-Analogon AN-152 hat unter der Arbeitsgruppe um Emons im Frühjahr 2005 begonnen.



## 5. Zusammenfassung

Ovarial- und Endometriumkarzinome sind in den weiter fortgeschrittenen, rezidivierten oder gar metastasierten Stadien schwierig zu behandeln.

Seit Ende der achtziger Jahre konnten antiproliferative Effekte von LHRH und seinen Analoga auf Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen gezeigt werden. Daneben wurden sowohl in verschiedenen Karzinomzelllinien als auch in Tumorgewebeprobe die Expression von LHRH und seinem Rezeptor nachgewiesen. Diese Ergebnisse sprechen für ein lokal autokrines System, welches auf LHRH basierend direkten Einfluß auf Proliferation und Differenzierung der Tumorzellen nimmt.

Die Experimente und die davon abgeleiteten Überlegungen der vorliegenden Arbeit lassen den antiproliferativen Effekt des LHRH-Analogons Triptorelin in direktem Zusammenhang mit der Expression des LHRH-Rezeptors erscheinen. An einer Reihe von neun bislang nicht untersuchten, etablierten Tumorzelllinien konnte hier ein eindeutiger antiproliferativer Effekt des LHRH-Agonisten Triptorelin in Zelllinien gezeigt werden, die den LHRH-Rezeptor exprimierten. In Zelllinien ohne Expression des LHRH-Rezeptors war Triptorelin wirkungslos.

Bei den Ovarialkarzinomzelllinien NIH:OVCA-3 und BG-1, sowie den Endometriumkarzinomzelllinien HEC-1B, KLE und AN-3-CA konnten deutliche Zellzahlreduktionen durch das Einwirken von Triptorelin erreicht werden. Im zeitabhängigen Versuch ließen sich die Zahlen der Ovarialkarzinomzellen mit einer Dosis von  $10^{-5}$  mol/L Triptorelin über 5 Tage um bis zu 30,3% reduzieren ( $p < 0,01$ ), die dosisabhängige Reduktion belief sich sogar auf 41,6% ( $p < 0,001$ ). Die Zellzahl der Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B konnte am vierten Tag um 47,5% ( $p < 0,001$ ) reduziert werden, dosisabhängig gelang dies um 43,3% ( $p < 0,001$ ) mit der höchsten Konzentration Triptorelin von  $10^{-5}$  mol/L. Auch konnte bereits in niedrigen Dosierungen von 1 nmol/L Triptorelin bei vier dieser fünf Zelllinien eine signifikante Wachstumshemmung nachvollzogen werden.

Bei drei der fünf Ovarialkarzinomzelllinien (SK-OV-3, CA-OV-3 und SW 626) sowie bei einer der vier Endometriumkarzinomzelllinien (MFE-296) konnte keine signifikante antiproliferative Wirkung durch Triptorelin gefunden werden.

Werden diese Ergebnisse mit denen anderer Mitarbeiter korreliert, so kann festgestellt werden, daß die Zelllinien, die LHRH-Bindungsstellen und mRNA für LHRH und seinen Rezeptor exprimieren, auch durch den LHRH-Agonisten gehemmt wurden. Diese Ergebnisse erklären möglicherweise die unterschiedlichen Auffassungen der verschiedenen Arbeitsgruppen

bezüglich der antiproliferativen Wirkung von LHRH-Analoga auf Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien.

Zusammenfassend lassen diese Erkenntnisse annehmen, dass Tumoren, die LHRH-Rezeptoren exprimieren können, möglicherweise in naher Zukunft mit LHRH-Analoga zu therapieren sind.

## 6. Literatur

Arencibia JM & Schally AV. Luteinizing hormone-releasing hormone as an autocrine growth factor in ES-2 ovarian cancer cell line. *International Journal of Oncology* 2000 **16** 1009-1013.

Bast RC, Boyer CM, Jacobs I, Xu FJ, Wu S, Wiener J, Kohler M, Berchuk A. Cell growth regulation in epithelial ovarian cancer. *Cancer* 1993 **71** 1597-1601

Blomenrohr M, Heding A, Sellar R, Lewis R, Bogerd J, Eidne KA et al. Pivotal role for the cytoplasmic carboxyl-terminal tail of a nonmammalian gonadotropin-releasing hormone receptor in cell surface expression, ligand binding, and receptor phosphorylation and internalization. *Molecular Pharmacology* 1999 **56** 1229-1237.

Borri P, Coronello M, Noci I, Pesciullesi A, Peri A, Caligiani R, Maggi M, Torricelli F, Scarselli G, Chieffi O, Mazzei T, Mini E. Differential inhibitory effects on human endometrial carcinoma cell growth of luteinizing hormone-releasing hormone analogues. *Gynecologic Oncology* 1998 **71** 396-403.

Borroni R, Di Blasio AM, Gaffuri B, Santorsola R, Busacca M, Vigano P et al. Expression of GnRH receptor gene in human ectopic endometrial cells and inhibition of their proliferation by leuprolide acetate. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2000 **159** 37-43.

Bruckner HW, Motwani BT. Treatment of advanced refractory ovarian cancer with a gonadotropin-releasing hormone analogue. *Am J Obstet Gynecol* 1989 **161** 1216.

Burghardt E, Girardi F, Lahousen M, Tamussino K, Stettner H. Patterns of pelvic and paraaortic lymph node involvement in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1991 **40** 103-106.

Casan EM, Raga F, Bonilla-Musoles F & Polan ML. Human oviductal gonadotropin-releasing hormone: possible implications in fertilization, early embryonic development, and implantation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000 **85** 1377-1381.

Chatzaki E, Bax CMR, Eidne KA, Anderson L, Grudzinskas JG & Gallagher CJ. The expression of gonadotropin-releasing hormone and its receptor in endometrial cancer and its relevance as an autocrine growth factor. *Cancer Research* 1996 **56** 2055-2065.

Chegini N, Rong H, Dou Q, Kipersztok C & Williams RS. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in human myometrium and leiomyomata and the direct action of GnRH analogs on myometrial smooth muscle cells and interaction with ovarian steroids in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996 **81** 3215-3221.

Chen HF, Jeung EB, Stephenson M & Leung PC. Human peripheral blood mononuclear cells express gonadotropin-releasing hormone (GnRH), GnRH receptor, and interleukin-2 receptor gamma-chain messenger ribonucleic acids that are regulated by GnRH in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999 **84** 743-750.

Cheruku R, Hussain M, Tyrkus M, Edelstein M. Myelodysplastic syndrome after cisplatin therapy. *Cancer* 1993 **72** 213-218.

Chi L, Zhou W, Prikhozan A, Flanagan C, Davidson KJS, Golembo M et al. Cloning and characterization of the human gonadotropin-releasing hormone receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1993 **91** R1-R6.

Colon-Otero G, Malkasian GP, Edmonson JH. Secondary myelodysplasia and acute leukemia following carboplatin-containing combination chemotherapy for ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993 **85** 1858-1860.

Connor JP, Buller RE & Conn PM. Effects of GnRH analogs on six ovarian cancer cell lines in culture. *Gynecologic Oncology* 1994 **54** 3215-3221.

Covens A, Thomas G, Shaw P, Ackermann I, Osborne R, Lukka H, Carey M, Franssen E, Roche K. A phase II study of leuprolide in advanced/recurrent endometrial cancer. *Gynecol Oncologic Oncology* 1997 **64** 126-129.

Emons G, Pahwa GS, Brack C, Sturm R, Oberheuser F, Knuppen R. Gonadotropin releasing hormone binding sites in human epithelial ovarian carcinomata. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989 **25** 215-221.

Emons G, Ortmann O, Pahwa GS, Oberheuser F, Schulz KD. LH-RH agonists in the treatment of ovarian cancer. In: *Höffken K (ed.): Peptides in Oncology I, LH-RH agonists and antagonists. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo* 1992a, p55.

Emons G, Ortmann O, Pahwa GS, Hackenberg R, Oberheuser F, Schulz KD. Intracellular actions of gonadotropic and peptide hormones and the therapeutic value of the GnRH-agonists in ovarian cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1992b, Suppl **155** 31.

Emons G, Ortmann O, Schulz KD. Rolle der endokrinen Therapie beim Ovarialkarzinom. *Gynäkologe* 1993a **26** 123-130.

Emons G, Ortmann O, Becker M, Irmer G, Springer B, Laun R et al. High affinity binding and direct antiproliferative effects of LHRH analogues in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Research* 1993b **54** 5439-5446.

Emons G, Schröder B, Ortmann O, Westphalen S, Schulz KD & Schally AV. High affinity binding and direct antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone analogs in human endometrial cancer cell lines. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1993c **77** 1458-1464.

Emons G & Schally AV. The use of luteinizing hormone-releasing hormone agonists and antagonists in gynecological cancers. *Human Reproduction* 1994 **9** 1364-1379.

Emons G, Schulz KD. New developments in the hormonal treatment of endometrial and ovarian cancer. In: Jonat W, Kaufmann M, Munk K (eds.): *Hormone dependent tumors, basic research and clinical studies. Contrib Oncol, Karger, Basel* 1995 **50** 277-297.

Emons G, Ortmann O, Irmer G, Müller V, Schulz KD & Schally AV. Treatment of ovarian cancer with LHRH antagonists. In: *M Filicori & C Flamigni (Eds.) Treatment with GnRH Analogs: Controversies and Perspectives. Carnforth: Parthenon Publishing 1996a pp.165-172.*

Emons G, Müller V, Ortmann O, Grossmann G, Trautner U, von Stuckrad B et al. Luteinizing hormone-releasing hormone agonist triptorelin antagonizes signal transduction and mitogenic activity of epidermal growth factor in human ovarian and endometrial cancer cell lines. *International Journal of Oncology* 1996b **9** 1129-1137.

Emons G, Ortmann O, Schulz KD & Schally AV. Growth-inhibitory actions of analogues of luteinizing hormone releasing hormone on tumor cells. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 1997 **8** 155-362.

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

Emons G & Kavanagh JJ. Hormonal Interactions in Ovarian Cancer. *Gynecologic Cancer* 1999 **13** 145-161.

Emons G, Weiß S, Ortmann O, Gründker C & Schulz KD. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) might act as a negative autocrine regulator of proliferation of human ovarian cancer. *European Journal of Endocrinology* 2000 **142** 665-670.

Emons G, Günthert A, Viereck V, Hanf V. Endokrine Therapie des Endometriumkarzinoms und seiner Präkanzerosen. *Gynäkologe* 2003 **36** 86-96.

Engel J, Schubert-Fritschle G. Epidemiologie maligner Ovarialtumoren. *Manual Maligne Ovarialtumoren* 2001 **6. Auflage** 1-9.

Foekens JA, Klijn JGM. Direct antitumor effects of LH-RH analogs. *Recent Results Cancer Res* 1992 **124** 7-17.

Freedman RS, Saul PB, Edwards CL, Jolles CJ, Gershenson DM, Jones LA, Atkinson EN, Dana WJ. Ethinyl estradiol and medroxyprogesterone acetate in patients with epithelial ovarian carcinoma: A phase II study. *Cancer Treat Rep* 1986 **70** 369.

Fuchtnner C, Manetta A, Walker JL, Emma D, Berman M, Di Saia PJ. Radical hysterectomy in the elderly patient: analysis of morbidity. *Am J Obstet Gynaecol* 1992 **166** 593-597.

Furui T, Imai A, Takagi H, Horibe S, Fuseya T & Tamaya T. Phosphotyrosine phosphatase activity in membranes from endometrial carcinoma. *Oncology Reports* 1995 **2** 1055-1057.

Gallagher CJ, Oliver RTD, Oram DH, Fowler CG, Blake PR, Mantell BS, Slevin ML, Hope-Stone HF. A new treatment for endometrial cancer with gonadotropin releasing hormone analogue. *Cancer* 1991 **63** 280-288.

Godwin AK, Testa JR, Hamilton TC. The biology of ovarian cancer development. *Cancer* 1993 **71** 530-536.

Gründker C & Emons G. GnRH - Mechanisms of Action. In: *B Lunenfeld (Ed.) GnRH analogues, The State of the Art at the Millennium. Carnforth: Parthenon Publishing* 1999 pp 95-120.

Gründker C, Schulz K, Günthert AR & Emons G. Luteinizing hormone-releasing hormone induces nuclear factor kappaB-activation and inhibits apoptosis in ovarian cancer cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000a **85** 3815-3820.

Gründker C, Völker P, Schulz KD, Emons G. Luteinizing Hormone-releasing Hormone (LHRH) Agonist Triptorelin and Antagonist Cetrorelix inhibit EGF-induced *c-fos* Expression in Human Gynecological Cancers. *Gynecologic Oncology* 2000b **78** 194-202.

Gründker C, Schlotawa L, Viereck V, Emons G. Protein kinase C (PKC)-independent stimulation of activator protein-1 (AP-1) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activity in human endometrial cancer cells by luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist Triptorelin. *European Journal of Endocrinology* 2001a **145** 651-658.

Gründker C, Völker P, Günthert AR & Emons G. Antiproliferative signaling of LHRH in human endometrial and ovarian cancer cells through G-protein  $\alpha_i$ -mediated activation of phosphotyrosine phosphatase. *Endocrinology* 2001b **142** 2369-2380.

Gründker C, Günthert A, Westphalen S, Emons G. Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers. *European Journal of Endocrinology* 2002 **146** 1-14

Gründker C, Schlotawa L, Viereck V, Eicke N, Horst A, Kairies B, Emons G. 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. *European Journal of Endocrinology* 2004 **151** 141-149.

Günthert AR, Pilz S, Kuhn W, Emons G, Meden H. Docetaxel is effective in the treatment of metastatic endometrial cancer. *Anticancer Res* 1999 **19** 3459-3461.

Hand R, Fremgen A, Chmiel JS, Recant W, Berk R, Sylvester J, Sener S. Staging procedures, clinical management, and survival outcome for ovarian carcinoma. *JAMA* 1993 **269** 1119-1122.

Hanf V, Günthert A R, Hawighorst T, Emons G. Endometriumkarzinom. *Gynäkologe* 2004 **37** 907-915.

Hatch KD, Beecham JB, Blessing JA, Creasman WT. Responsiveness of patients with advanced ovarian carcinoma to tamoxifen. *Cancer* 1991 **68** 269-271.

Hoskins WJ. Surgical staging and cytoreductive surgery of epithelial ovarian cancer. *Cancer* 1993 **71** 1534-1540.

Hsieh KP, Martin TFJ. Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins  $G_q$  and  $G_{11}$ . *Mol Endocrinol* 1992 **6** 1673-1681.



Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 1995 **80** 243-236.

Imai A, Ohno T, Iida K, Fuseya T, Furui T & Tamaya T. Gonadotropin-releasing hormone receptors in gynecological tumors. *Cancer* 1994a **74** 2555-2561.

Imai A, Ohno T, Iida K, Fuseya T, Furui T & Tamaya T. Presence of gonadotropin-releasing hormone receptor and its messenger ribonucleic acid in endometrial carcinoma and endometrium. *Gynecologic Oncology* 1994b **55** 114-118.

Imai A, Takagi H, Furui T, Horibe S, Fuseya T & Tamaya T. Evidence for coupling of phosphotyrosine phosphatase to gonadotropin-releasing hormone receptor in ovarian carcinoma membrane. *Cancer* 1996a **77** 132-137.

Imai A, Takagi H, Horibe S, Fuseya T & Tamaya T. Coupling of gonadotropin releasing hormone receptor to Gi protein in human reproductive tract tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996b **81** 3249-3253.

Imai A, Furui T, Tamaya T & Mills GB. A gonadotropin-releasing hormone-responsive phosphatase hydrolyses lysophosphatidic acid within the plasma membrane of ovarian cancer cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000 **85** 3370-3375.

Irmer G, Bürger C, Ortman O, Schulz KD & Emons G. Expression of luteinizing hormone-releasing hormone and its mRNA in human endometrial cancer cell lines. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1994 **79** 916-919.

Irmer G, Bürger C, Müller R, Ortman O, Peter U, Kakar S et al. Expression of the messenger RNAs for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and its receptor in human ovarian epithelial carcinoma. *Cancer Research* 1995 **55** 817-822.

Jäger W, Wildt L, Lang N. Some observations on the effects of a GnRH analog in ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1989 **32** 137.

Jänicke F. Operative Therapie des Ovarialkarzinoms. *Gynäkologe* 2004 **37** 916-928.

Jelovsek FR, Hammond CB, Woodward BH, Draffin R, Lee KL, Creasman WT, Parker RT. Risk of exogenous therapy and endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1989 **137** 85-91.

Kakar SS, Musgrove LC, Devor DC, Sellers JC & Neill JD. Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1992 **189** 289-295.

Kakar SS, Grizzle WE & Neill JD. The nucleotide sequence of human GnRH receptors in breast and ovarian tumors are identical with that found in pituitary. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1994 **106** 145-149.

Kang SK, Choi KC, Cheng KW, Nathwani PS, Auersperg N & Leung PC. Role of gonadotropin-releasing hormone as an autocrine growth factor in human ovarian surface epithelium. *Endocrinology* 2000 **141** 72-80.

Kang SK, Tai CJ, Nathwani PS, Choi KC & Leung PC. Stimulation of mitogen-activated protein kinase by gonadotropin-releasing hormone in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 2001 **142** 671-679.

Kavanagh JJ, Wharton JT, Roberts WS. Androgen therapy in the treatment of refractory epithelial ovarian cancer. *Cancer Treat Rep* 1987 **71** 537.

Kavanagh JJ, Roberts W, Townsend P, Hewitt S. Leuprolide acetate in the treatment of refractory or persistent epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1989 **7** 115.

Kleine W. Östrogen- und Progesteronrezeptoren beim Endometriumkarzinom. In: *Kleine W, Meerpohl HG, Pfeleiderer A, Profous CZ (eds.) Therapie des Endometriumkarzinoms. Springer Verlag* 1991 pp 31-42.

Kvale G, Heuch J, Nilssen S, Beral V. Reproductive factors and risk of ovarian cancer: a prospective study. *Int J Cancer* 1988 **42** 246-251.

Lee NC, Wingo PA, Gwinn ML, Rubin GL, Kendrick JS, Webster LA, Ory HW. For the Cancer and Steroid Hormone Study of the Centers for Disease Control and the National Institute of Child Health and Human Development. The reduction in risk of ovarian cancer associates with oral contraceptive use. *New Engl J Med* 1987 **316** 650-655.

Lee MT, Liebow C, Kramer AR & Schally AV. Effects of epidermal growth factor and analogues of luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin on phosphorylation of tyrosine residues of specific substrates in various tumors. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 1991 **88** 1656-1660.

Limonta P, Dondi D, Moretti R, Maggi R, Motta M. Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone agonists on the human prostatic cancer cell line LNCaP. *J Clin Endocrinol Metab* 1992 **75** 207-212.

Limonta P, Dondi D, Moretti RM, Fermo D, Garattini E, Motta M. Expression of luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the human prostatic cancer cell line LNCaP. *J Clin Endocrinol Metab* 1993 **76** 797-800.

Lindt MJ, Cantwell BMJ, Millward MJ, Robinson A, Proctor M, Simmons D, Carmichael J, Harris AL. A phase II trial of goserelin (Zoladex) in relapsed epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 1992 **65** 621-623.

Lin LS, Roberts VJ & Yen SS. Expression of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene in placenta and its functional relationship to human chorionic gonadotropin secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1995 **80** 580-585.

Loop SM, Gorder CA, Lewis SM, Saiers JH, Drivdahl RH & Ostenson RC. Growth inhibition of human prostatic cancer cells by an agonist of gonadotropin-releasing hormone. *Prostate* 1995 **26** 179-188.

Manetta A, Gamboa-Vujcic L, Paredes P, Emma D, Liao S, Leong L et al. Inhibition of growth of human ovarian cancer in nude mice by luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix (SB-75). *Fertility and Sterility* 1995 **63** 282-287.

Markman M, Kennedy A, Webster K, Petersen G, Kulp B, Belinson J. Leuprolide in the treatment of endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1997 **66** 542.

Montagnani-Marelli M, Moretti RM, Dondi D, Limonta P & Motta M. Effects of LHRH agonists on the growth of human prostatic tumor cells: "in vitro" and "in vivo" studies. *Archives of Italian Urology and Andrology* 1997 **69** 257-263.

Montagnani-Marelli M, Moretti RM, Dondi D, Motta M & Limonta P. Luteinizing hormone-releasing hormone agonists interfere with mitogenic activity of the insulin-like growth factor system in androgen-independent prostate cancer cells. *Endocrinology* 1999 **140** 329-334.

Moretti RM, Montagnani-Marelli M, Dondi D, Poletti A, Martini L, Motta M et al. Luteinizing hormone-releasing hormone agonists interfere with the stimulatory actions of epidermal growth factor in human prostatic cancer cell lines, LNCaP and DU 145. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996 **81** 3930-3937.

Motta M, Dondi D, Moretti M, Montagnani-Marelli M, Pimpinelli F, Maggi R et al. Role of growth factors, steroid and peptide hormones in the regulation of human prostatic tumor growth. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1996 **56** 107-111.

Naor Z. Signal transduction mechanisms of  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing hormones. The case of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrine Rev* 1990 **11** 326-353.

Neill JD, Duck LW, Sellers JC & Musgrove LC. A gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor specific for GnRH II in primates. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2001 **282** 1012-1018.

Neill JD. GnRH and GnRH Receptor Genes in the Human Genome. *Endocrinology* 2002 **143** 3737-743.

Ohno T, Imai A, Furui T, Takahashi K & Tamaya T. Presence of gonadotropin-releasing hormone and its messenger ribonucleic acid in human ovarian epithelial carcinoma. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1993 **169** 605-610.

Onnis A, Marchetti M, Maggino T. Endometrial cancer treatment today. *Eur J Gynaec Oncol* 1993 **2** 160-163.

Ozols RF, Rubin SC, Dembo AJ, Robboy S. Epithelial ovarian cancer. In: *Hoskins WJ, Perez CA, Young RC (eds.) Gynecologic Oncology. Philadelphia, Lippincott* 1992 pp. 731-781.

Pahwa GS, Kullander S, Vollmer G, Oberheuser F, Knuppen R, Emons G. Specific low affinity binding sites for gonadotropin-releasing hormone in human endometrial carcinomata. *Eur J Obstet Gynecol Rep Biol* 1991 **41** 135-142.

Parazzini F, Franceschi S, La Vecchia C, Fascioli M. The epidemiology of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1991 **43** 9-23.

Park RC, Grisby PW, Muss HB, Norris HJ. Corpus: Epithelial tumors. In: *Hoskins WJ, Perez CA, Young RC (eds.): Gynecologic Oncology. Philadelphia, Lippincott* 1992 pp. 663-693.

Pfisterer J, du Bois, A. Das rezidierte Ovarialkarzinom. *Gynäkologe* 2004 **37** 929-935.

Pfleiderer A. Malignome des Ovars. In: *Wulf KH, Schmidt-Matthiesen H (eds.): Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe. Spezielle gynäkologische Onkologie II. Urban & Schwarzenberg* 1989 pp. 37-129.

Raga F, Casan EM, Kruessel JS, Wen Y, Huang HY, Nezhat C et al. Quantitative gonadotropin-releasing hormone gene expression and immunohistochemical localization in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Biology of Reproduction* 1998 **59** 661-669.

Rao BR, Slotman BJ. Endocrine factors in common epithelial ovarian cancer. *Endocrine Rev* 1991 **12** 14-26.

Rothschild N, Gray R, Smith L, Matelski H, Ahlgren J. Phase II study of aminogluthimide in advanced ovarian cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1987 **6** 115.

Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Reeding TW, Nair RGM, Debeljuk L. Gonadotropin-Releasing Hormone: One Polypeptide Regulates Secretion of Luteinizing and

Follicle-Simulating Hormones. *Science* 1971 **173** 1036-1037.

Schally AV, Bajusz S, Redding TW, Zalatnai A, Comura-Schally AM. Analogues of LHRH: The present and the future. In: *Vickery BH and Lunefeld B (eds.): GnRH analogues in cancer and human reproduction* 1989 **Vol. 1** 5-31.

Schally AV, Comura-Schally AM, Hollander V. Hypothalamic and other peptide hormones. In: *Holland JF, Frei E, Bast RC, Kufe DW, Morton DL and Weichselbaum RR (eds.): Cancer Medicine* 1993 **3<sup>rd</sup> edition** 827-840.

Schally AV. Hypothalamic hormones from neuroendocrinology to cancer therapy. *Anticancer Drugs* 1994 **5** 115-130.

Schally AV. Luteinizing hormone-releasing hormone analogs: their impact on the control of tumorigenesis. *Peptide* 20 1999 **10** 1247-62.

Schmidt-Matthiesen H, Bastert G. Gynäkologische Onkologie. *Schattauer-Verlag, Stuttgart* 2000 **6.Auflage** 53-157.

Schmidt-Rhode P. Kontrolluntersuchungen während und nach einer medikamentösen Tumorthherapie - Erkennung und Behandlung von Nebenwirkungen. In: *Kaiser R, Schulz KD, Maass H (eds.): hormonale Behandlung von Genital- und Mammatumoren bei der Frau, Thieme, Stuttgart New York* 1991 pp 137.

Schueler JA, Cornelisse CJ, Hermans J, Trimpos JB, von der Burg MEL, Fleuren GJ. Prognostic factors in well differentiated early stage epithelial ovarian cancer. *Cancer* 1993 **71** 787-795.

Schulz KD, Hofman J, Hackenberg R, Emons G, Schmidt-Rhode P, Sturm G. Palliative hormonal treatment in endometrial carcinoma. In: *Kleine W, Meerpohl HG, Pfeleiderer A, Profous CZ (eds.) Therapie des Endometriumkarzinoms. Springer Verlag* 1991 pp. 119-129.

Schulz KD, Emons G. Endometriumkarzinom. In: Zeller WJ, zur Hausen H (eds.) *Onkologie. Grundlagen, Diagnostik, Therapie, Entwicklungen. Ecomed, Landsberg/Lech* 1995 V-2.9, 1-12.

Sealfon SC & Millar RP. The gonadotropin-releasing hormone receptor: Structural determinations and regulatory control. *Human Reproduction Update* 1995 **1** 216-230.

Shirahige Y, Cook C, Pinski J, Halmos G, Nair R & Schally AV. Treatment with luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75 decreases levels of epidermal growth factor receptor and its mRNA in OV-1063 human epithelial ovarian cancer xenografts in nude mice. *International Journal of Oncology* 1994 **5** 1031-1035.

Srkalovic G, Schally AV, Wittliff JL, Day TG, Jr. & Jenison EL 1998 Presence and characteristics of receptors for [D-Trp6]luteinizing hormone releasing hormone and epidermal growth factor in human ovarian cancer. *International Journal of Oncology* 1998 **12** 489-498.

Stanislaus D, Pinter JH, Janovick JA & Conn PM. Mechanisms mediating multiple physiological responses to gonadotropin-releasing hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1998 **144** 1-10.

Stojilkovic SS, Reinhart J & Catt, KJ. GnRH receptors: Structure and signal transduction pathways. *Endocrine Reviews* 1994 **15** 462-499.

Stojilkovic SS & Catt KJ. Expression and signal transduction pathways of gonadotropin-releasing hormone receptors. *Recent Progress in Hormone Research* 1995 **30** 161-205.

Sun YM, Flanagan CA, Illing N, Ott TR, Sellar R, Fromme BJ et al. A chicken gonadotropin-releasing hormone receptor that confers agonist activity to mammalian antagonists. Identification of D-Lys(6) in the ligand and extracellular loop two of the receptor as determinants. *Journal of Biological Chemistry* 2001 **276** 7754-7761.

Thompson MA, Adelson MD & Kaufman LM. Lupron retards proliferation of ovarian tumor cells cultured in serum-free medium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1991 **72** 1036-1041.

Vershraegen CF, Westphalen S, Hu W, Loyer E, Kudelka A, Volker P, Kavanagh J, Steger M, Schulz KD, Emons G. Phase II study of cetrorelix, a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2003 **90** 552-559.

Völker P, Gründker C, Schmidt O, Schulz KD, Emons G. Expression of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in human ovarian and endometrial cancers: Frequency, auto-regulation and correlation with direct antiproliferative activity of luteinizing hormone releasing hormone analogues. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2002 **186** 171-179.

Wang CB, Wang CJ, Huang HJ, Hsueh S, Chou HH, Soong YK, Lai CH. Fertility-preserving treatment in young patients with endometrial adenocarcinoma. *Cancer* 2002 **94** 2192-2198.

White RB, Eisen JA, Kasten TL & Fernald RD. Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 1998 **95** 305-309.

Yano T, Pinski J, Halmos G, Szepeshazi K & Schally AV. Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancer xenografts in nude mice by treatment with luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 1994a **91** 7090-7094.

Yano T, Pinski J, Radulovic S & Schally AV. Inhibition of human epithelial ovarian cancer cell growth in vitro by agonistic and antagonistic analogues of luteinizing hormone-releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 1994b **91** 1701-1704.



## **LEBENS LAUF**

Oswald Schmidt

geboren am 14.10.1969 in Markt Indersdorf, Bayern

09/1976-05/1989: Schulbildung mit gymnasialer Oberstufe und Abitur am 19.05.1989 in Bad Hersfeld

09/1989-11/1990: Zivildienst im Rettungsdienst beim DRK-Bad Hersfeld mit Ausbildung zum Rettungssanitäter

12/1990-03/1991: Tätigkeit im Rettungsdienst (DRK) bis Studienbeginn

04/1991-11/1998: Studium der Medizin an der Philipps-Universität Marburg; während der gesamten Studienzeit Tätigkeit als Rettungssanitäter beim Malteser Hilfsdienst im Kreis Marburg-Biedenkopf; Famulatur Gynäkologie im Hospital General de Medellin, Kolumbien

10/1997-11/1998: Absolvierung des Praktischen Jahres am Roten-Kreuz-Krankenhaus, Kassel und in der Frauenklinik am Klinikum Kassel; Ablegen der Ärztlichen Prüfung am 04.11.1998

01/1999-06/2000: Tätigkeit als AiP und anschließend,

seit 07/2000: Tätigkeit als Assistenzarzt an der Frauenklinik der Georg-August-Universität Göttingen

Göttingen, den 04.06.2005

**Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:**

in Marburg: Ammon, Arnold, Aumann, Aurich, Basler, Bauer, Baum, Blankenburg, Doss, Feuser, Ganz, Giemsa, Grzeschik, Happle, Hilgermann, Huffmann, Ihm, Kern, Klaus, Kretschmer, Kroll, Lauer, Lennartz, Lorenz, Maisch, Mannheim, Mennel, Netter, Pfab, Pohlen, Renschmidt, Richter, Riedmüller, Rieger, Rienhoff, Rothmund, Schäfer, Schneider, Schüffel, Seybert, Siegrist, Thomas, Unsicker, Voigt, von Wichert

in Medellin, Kolumbien: Restrepo

in Kassel: Gerdes, Hesterberg, Rummel

## **Danksagung:**

Ich danke Herrn Prof. Emons für das interessante Thema der Arbeit und die intensive Betreuung und Leitung, welche die Durchführung der Arbeit überhaupt ermöglichten.

Frau Dr. Silke Westphalen und die Mitarbeiter im Zellkulturlabor der Universitätsfrauenklinik Marburg machten mich mit der Arbeit an humanen Zellkulturen vertraut, sie waren stets ansprechbar und sehr geduldig.

Außerdem danke ich Herrn PD Dr. Carsten Gründker und Dr. Peter Völker für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Abschließend bedanke ich mich auch bei meinen Eltern für ihre aufmunternden Worte und die seelische Unterstützung.

**Ehrenwörtliche Erklärung:**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps Universität Marburg zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel „Effekte des LHRH-Agonisten Triptorelin auf die in vitro Proliferation verschiedener Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien“ am Medizinischen Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe unter Leitung von Prof. Dr. G. Emons ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten 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.

Göttingen, den 04.06.2005