

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik für Gynäkologie
Direktor: Prof. Dr. med. Fritz Jänicke

**Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung
der Jun-Proteine beim Ovarialkarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Kerstin Eckhoff
aus Zeven

Hamburg 2014

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 16.12.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Dr. rer. nat. Karin Milde-Langosch

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. med. Udo Schumacher

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1 Das Ovarialkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren	3
1.1.3 Klassifikation	7
1.1.4 Screening	11
1.1.5 Klinik und Diagnostik	12
1.1.6 Therapie	14
1.1.6.1 Operative Therapie	14
1.1.6.2 Adjuvante Therapie	16
1.1.6.3 Follow-Up	16
1.1.6.4 Second-Line-Therapie	17
1.1.6.5 Neue Therapiekonzepte	17
1.1.7 Prognosefaktoren	18
1.2 Die Jun-Familie und die c-Jun-N-terminalen Kinasen	21
1.2.1 Die Jun-Familie	22
1.2.1.1 c-Jun und pc-Jun	23
1.2.1.2 JunB	25
1.2.1.3 JunD	26
1.2.2 Die c-Jun-N-terminalen Kinasen	28
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	32
2. Material und Methoden	33
2.1 Material	33
2.1.1 Patientinnenkollektive	33
2.1.1.1 Hamburger Kollektiv	33
2.1.1.2 Würzburger Kollektiv	33
2.1.2 verwendete Materialien/Geräte	34
2.1.3 verwendete Chemikalien	35
2.1.3.1 Herstellung der verwendeten Puffer / Gele	37
2.1.4 verwendete Antikörper und Marker	38
2.2 Methoden	39
2.2.1 Proteinextraktion	39
2.2.2 BCA-Proteinbestimmung	40
2.2.3 Western Blot-Verfahren	41
2.2.3.1 SDS-Gelelektrophorese	41
2.2.3.2 Proteinblotting	43

2.2.3.3 Proteindetektion.....	44
2.2.3.4 Re-Blot-Verfahren.....	46
2.2.3.5 Densitometrische Auswertung	46
2.2.3.6 Statistische Auswertung Western Blotting	47
2.2.4 Immunhistochemie.....	48
2.2.4.1 Statistische Auswertung Immunhistochemie.....	50
3. Ergebnisse	52
3.1 Beschreibung des Hamburger Patientenkollektivs.....	52
3.2 Analyse des Hamburger Kollektivs hinsichtlich bek. Prognosefaktoren.....	53
3.3 Ergebnisse der Western-Blot-Analysen der Jun-Proteine.....	57
3.3.1 c-Jun.....	57
3.3.2 pc-Jun.....	60
3.3.3 JunB	64
3.3.4 JunD	67
3.3.5 JNK	71
3.4 Korrelationen der Jun-Proteine zu den Fos-Proteinen	76
3.5 Ergebnisse der JunD-Immunhistochemie d. Hamburger Patientenkollektivs ..	77
3.6 Beschreibung des Würzburger Patientenkollektivs.....	79
3.7 Ergebnisse der JunD-Immunhistochemie d. Würzburger Patientenkollektivs	79
4. Diskussion.....	83
4.1 Grenzen der verwendeten Methodik	83
4.2 Western-Blot-Analysen des Hamburger Kollektivs.....	84
4.2.1 c-Jun.....	84
4.2.2 pc-Jun.....	85
4.2.3 JunB	88
4.2.4 JunD	89
4.2.5 JNK	90
4.2.6 Korrelationen zu den Fos-Proteinen	93
4.3 Immunhistochemische Analysen	94
4.3.1 Immunhistochemie Hamburger Kollektiv	94
4.3.2 Immunhistochemie Würzburger Kollektiv	94
4.4 Fazit und Ausblick	95
5. Zusammenfassung	97
Literaturverzeichnis.....	99
Lebenslauf	112
Danksagung	112
Eidesstattliche Erklärung.....	114

Abkürzungsverzeichnis

AA/Bis-AA	Acrylamide/Bis-Acrylamide
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AGO Ovar	Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie Ovar
Akt	Proteinkinase
Ala	Alanin
AP-1	Activator-Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
ATF	Activating Transcription Factor
AUC	Area under the curve
BCA	Bicinchonic acid (Bicinchoninsäure)
Bcl2	B-cell lymphoma 2 (Protein)
BRCA	Breast cancer gene
bZIP	Basic Leucine Zipper Domain
CA-125	Cancer antigen 125
CD24	Cluster of Differentiation 24
CDK	Cyclin-dependent-Kinase
c-Fos	zelluläres Fos
CI	Konfidenzintervall
CRE	cAMP-responsive element
CREB	cAMP response element-binding protein
CSC	Cancer Stem Cell (Krebsstammzelle)
CT	Computertomographie
CTx	Chemotherapie
DAB	Diamino-Peroxidase-Substrat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Elk-1	ETS domain-containing protein 1
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
Fra-1	Fos-related antigen 1
Fra-2	Fos-related antigen 2
h	Stunde
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure

HDAC3	Histon-Deacetylase 3
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIF1 α	Hypoxia Inducible Factor α
HNPCC	Hereditäres Non-Polypöses Kolorektales Karzinom
HR	Hazard Ratio
HRP	Horseradish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G/ Gammaglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL-1	Interleukin 1
IL-12	Interleukin 12
IRS	Immunreaktiver Score
JDP-1	Jun Dimerization Protein 1
JDP-2	Jun Dimerization Protein 2
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
MAF	Musculoaponeurotic Fibrosarcoma
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MMP	Matrix-Metalloprotease
Mon.	Monate
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
NGF	Nerve Growth Factor
NIH	National Institutes of Health
o.g.	oben genannt
OP	Operation
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
pc-Jun	phosphoryliertes c-Jun
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor
PET	Positronen-Emissionstomographie
PI	Pulsatility Index
PID	pelvic inflammatory disease
pJNK	phosphorylierte c-Jun N-terminale Kinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Ras	Rat Sarcoma (Proto-Onkogen)
RI	Resistance Index
ROC	Risk of Ovarian Cancer
rpm	Rounds per Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat

Ser	Serin
siRNA	Small interfering RNA
SPSS®	Statistical Package of the Social Sciences®
Src	Tyrosinkinase (cellular sar coma)
T1	Tertial 1
T2	Tertial 2
T3	Tertial 3
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFβ	Transforming Growth Factor β
Thr	Threonin
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TPA	12-O-Tetra-Decanoylphorbol-13-Acetat
TRE	TPA-responsive element
U	Unit
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
uPa	Urokinase Plasminogen Aktivator
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Verd.	Verdünnung
Vv.	Venae
ZNS	Zentrales Nervensystem

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: histologische WHO-Klassifikation von Ovarialtumoren	8
Tabelle 2: Gradingssystem von Silverberg	9
Tabelle 3: Auswertung des Differenzierungsgrades mit Hilfe des Silverberg-Scores	9
Tabelle 4: TNM- und FIGO-Klassifikation des Ovarialkarzinoms	10
Tabelle 5: Molekulare Marker mit möglicher prognostischer Bedeutung	20
Tabelle 6: Verwendete Materialien und Geräte für die Proteinextraktion	34
Tabelle 7: Verwendete Materialien und Geräte für die BCA-Proteinbestimmung	34
Tabelle 8: Verwendete Materialien und Geräte für die Immunhistochemie	34
Tabelle 9: Verwendete Materialien und Geräte für das Western Blotting	35
Tabelle 10: Verwendete Chemikalien für die Proteinextraktion	35
Tabelle 11: Verwendete Chemikalien für die BCA-Proteinbestimmung	36
Tabelle 12: Verwendete Chemikalien für die Immunhistochemie	36
Tabelle 13: Verwendete Chemikalien für das Western Blotting	36
Tabelle 14: Verwendete Primärantikörper Western Blotting und Immunhistochemie (JunD)	38
Tabelle 15: Verwendete Sekundärantikörper Western Blotting	38
Tabelle 16: Verwendeter Marker Western Blotting	38
Tabelle 17: Verwendeter Primärantikörper Immunhistochemie	38
Tabelle 18: Verwendeter Sekundärantikörper Immunhistochemie	39
Tabelle 19: Durchschnittliche Belichtungszeiten der detektierten Proteine	45
Tabelle 20: Zusammenfassung der zur Auswertung verwendeten Prognosefaktorgruppen	47
Tabelle 21: Beurteilungskriterien für die histologische Auswertung der Immunhistochemie	50
Tabelle 22: Klinisch-pathologische Daten des Hamburger Patientenkollektivs	52
Tabelle 23: Log-Rank-Tests bekannter Prognoseparameter hinsichtlich des Gesamtüberlebens	53
Tabelle 24: Log-Rank-Tests bekannter Prognoseparameter hinsichtlich des rezidivfreien Intervalls	54
Tabelle 25: Korrelationen zwischen c-Jun und anderen Jun-Proteinen	58
Tabelle 26: Korrelationen zwischen c-Jun-Tertialen und bekannten Prognoseparametern	59
Tabelle 27: Korrelationen zwischen pc-Jun und anderen Jun-Proteinen	61
Tabelle 28: Korrelationen zwischen pc-Jun und bekannten Prognoseparametern	62
Tabelle 29: Multivariate Analyse mittels Cox-Regression unter Einbezug der pc-Jun-Expressionslevels	63
Tabelle 30: Korrelationen zwischen JunB und anderen Jun-Proteinen	65
Tabelle 31: Korrelationen zwischen JunB und bekannten Prognoseparametern	67
Tabelle 32: Korrelationen zwischen JunD und anderen Jun-Proteinen	68
Tabelle 33: Korrelationen zwischen JunD-Tertialen und bekannten Prognoseparametern	70
Tabelle 34: Multivariate Analyse mittels Cox-Regression unter Einbezug der JunD-Expressionslevels	71
Tabelle 35: Korrelationen zwischen JNK und anderen Jun-Proteinen	73
Tabelle 36: Korrelationen zwischen JNK und bekannten Prognoseparametern	74
Tabelle 37: Multivariate Analyse mittels Cox-Regression unter Einbezug der JNK-Expressionslevels	75
Tabelle 38: Korrelationen zwischen Jun-Proteinen, der JNK und Fos-Proteinen	76
Tabelle 39: Klinisch-pathologische Daten des Würzburger Patientenkollektivs	79
Tabelle 40: Korrelationen zwischen der JunD-Immunhistochemie des Würzburger Kollektivs und bekannten Prognoseparametern	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen bei Frauen	1
Abbildung 2: Altersspezifische Erkrankungsraten in %, ICD-10 C56	2
Abbildung 3: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen	2
Abbildung 4: Geschätzte altersstandardisierte Inzidenzraten je 100.000; Ovar	3
Abbildung 5: 5-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium	19
Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve FIGO-Gruppen und Gesamtüberleben	54
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve FIGO-Gruppen und rezidivfreies Intervall	54
Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve Nodalstatus und Gesamtüberleben	55
Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve Nodalstatus und rezidivfreies Intervall	55
Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve Fernmetastasen und rezidivfreies Intervall	55
Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve Fernmetastasen und Gesamtüberleben	55
Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve Grading und Gesamtüberleben	55
Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve Grading und rezidivfreies Intervall	55
Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve OP-Ergebnis und rezidivfreies Intervall	56
Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve OP-Ergebnis und Gesamtüberleben	56
Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve Aszites und Gesamtüberleben	56
Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve Aszites und rezidivfreies Intervall	56
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurve Asziteszytologie und rezidivfreies Intervall	56
Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurve Asziteszytologie und Gesamtüberleben	56
Abbildung 20: Verteilung der c-Jun-Expressionswerte	57
Abbildung 21: Verteilung der logarithmischen c-Jun-Expressionswerte lg(c-Jun)	57
Abbildung 22: Beispielfilm eines c-Jun-Western-Blots	57
Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve c-Jun-Expression und Gesamtüberleben	59
Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve c-Jun-Expression und rezidivfreies Intervall	59
Abbildung 25: Verteilung der pc-Jun-Expressionswerte (optische Auswertung)	60
Abbildung 26: Beispielfilm eines pc-Jun-Western-Blots	61
Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve pc-Jun-Expression und rezidivfreies Intervall	62
Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurve pc-Jun-Expression und Gesamtüberleben	62
Abbildung 29: Verteilung des Nodalstatus in den jeweiligen pc-Jun-Expressionsgruppen	63
Abbildung 30: Verteilung der logarithmischen JunB-Expressionswerte (lgJunB)	64
Abbildung 31: Verteilung der JunB-Expressionswerte	64
Abbildung 32: Beispielfilm eines JunB-Western-Blots	65
Abbildung 33: Kaplan-Meier-Kurve JunB-Expression und Gesamtüberleben	66
Abbildung 34: Kaplan-Meier-Kurve JunB-Expression und rezidivfreies Intervall	66
Abbildung 35: Verteilung der JunD-Expressionswerte	68
Abbildung 36: Verteilung der logarithmischen JunD-Expressionswerte (lgJunD)	68
Abbildung 37: Beispielfilm eines JunD-Western-Blots (mit hsc-70-Gellade-Kontrolle)	68
Abbildung 38: Kaplan-Meier-Kurve JunD-Expression und Gesamtüberleben	69
Abbildung 39: Kaplan-Meier-Kurve JunD-Expression und rezidivfreies Intervall	69
Abbildung 40: Pathologische Befunde der Asziteszytologien in den einzelnen JunD-Tertialen	70
Abbildung 41: Verteilung der JNK-Expressionswerte	72
Abbildung 42: Verteilung der logarithmischen JNK-Expressionswerte lg(JNK)	72
Abbildung 43: Beispielfilm eines JNK-Western-Blots (mit hsc-70-Gellade-Kontrolle)	72
Abbildung 44: Kaplan-Meier-Kurve JNK-Expression und Gesamtüberleben	74
Abbildung 45: Kaplan-Meier-Kurve JNK-Expression und rezidivfreies Intervall	74
Abbildung 46a-c: JunD-Immunhistochemie Hamburger Kollektiv	77
Abbildung 47: Häufigkeiten der Stärke der immunhistochem. JunD-Kernfärbungen im Hamburger Kollektiv	78
Abbildung 48a-c: JunD-Immunhistochemie Würzburger Kollektiv	80
Abbildung 49: Häufigkeiten der Stärke der immunhistochem. JunD-Kernfärbungen im Würzburger Kollektiv	81
Abbildung 50: Kaplan-Meier-Kurve Stärke der Färbung in der JunD-Immunhistochemie und Gesamtüberleben	81

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Eckhoff K., Flurschütz R., Trillsch F., Mahner S., Jänicke F., Milde-Langosch K. 2013.
The prognostic significance of Jun transcription factors in ovarian cancer.
J Cancer Res Clin Oncol. 39 (10): 1673-1680.

1. Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

In der Todesursachenstatistik des statistischen Bundesamtes aus dem Jahre 2008 belegte die Todesursache „Neubildungen“ mit 221.920 Todesfällen hinter der Ursache „Erkrankungen des Kreislaufsystems“ den zweiten Platz. Von den im Jahre 2008 registrierten Todesfällen verstarb somit etwa jeder Vierte an einer Neoplasie (Statistisches Bundesamt Deutschland 2012).

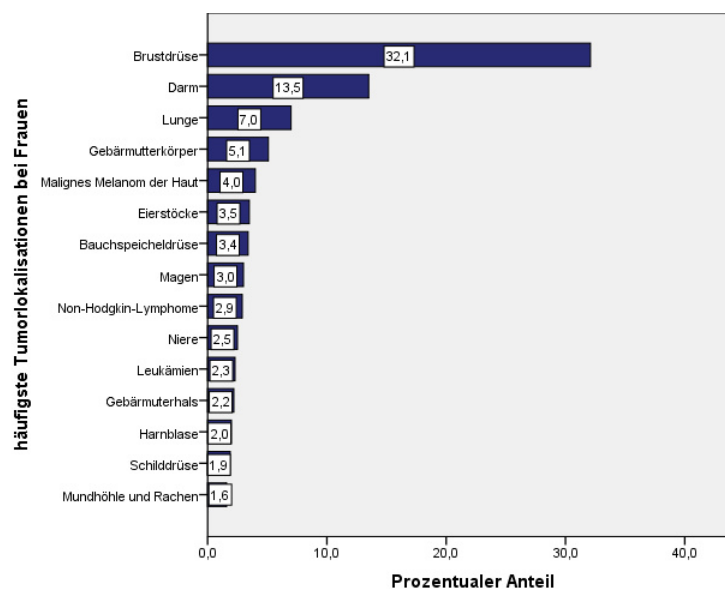


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen bei Frauen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2008 (ohne nicht melanotischen Hautkrebs); modifiziert nach Robert Koch-Institut 2012

Maligne Ovarialtumoren sind mit einer Inzidenzrate von 12 je 100.000 die 6. häufigsten Tumoren bei der deutschen Frau. Betrachtet man allein die gynäkologischen Tumoren, so belegt der Ovarialtumor nach dem Mamma- und dem Endometriumkarzinom den dritten Platz der Tumorstatistik.

Im Jahre 2008 wurden für Deutschland 7.790 Neuerkrankungen an Ovarialtumoren angegeben. Dies entspricht einem Anteil von 3,5% an allen Neubildungen bei Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren. 5-10% der Ovarialtumoren treten laut Statistik bereits vor dem 45. Lebensjahr auf. Bei den früh auftretenden Neoplasien handelt es sich meist um Keimzelltumoren (Robert Koch-Institut 2012). Die Auswertung von klinischen Daten des Tumorregisters München (Patientenkohorte von

1978 bis 2008) zeigte bei dieser Tumorentität ein medianes Erkrankungsalter von 31,1 Jahren (Engel et al. 2010). Bis zum 75. Lebensjahr steigt das Erkrankungsrisiko für Ovarialtumoren kontinuierlich an und hält sich danach auf einem stabilen Niveau. Das Lebenszeitrisiko einer deutschen Frau an einem malignen Ovarialtumor zu erkranken, liegt bei 1,5% (entspricht 1 von 68 Frauen) (Robert Koch-Institut 2012).

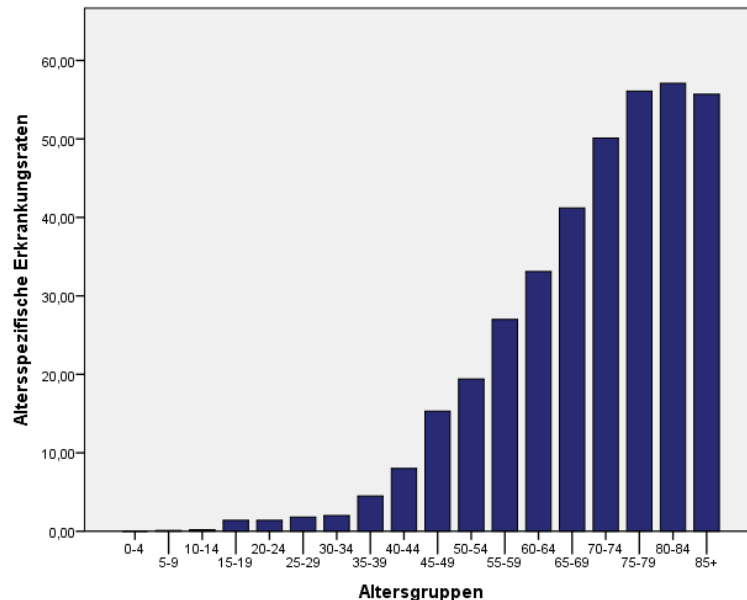


Abbildung 2: Altersspezifische Erkrankungsraten in %, ICD-10 C56, Deutschland, 2007-2008 (modifiziert nach Robert Koch-Institut 2012)

Ovarialtumoren sind im Frühstadium symptomarm und werden daher meist erst in fortgeschrittenen Stadien entdeckt. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate von Ovarialtumoren liegt bei etwa 40% (Robert Koch-Institut 2012).

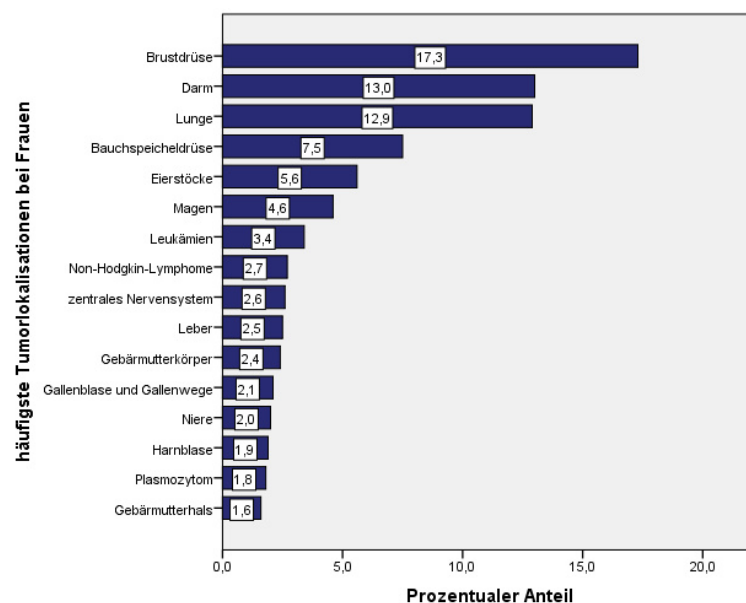


Abbildung 3: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen bei Frauen in Deutschland 2008 (ohne nicht melanotischen Hautkrebs); nach Robert Koch-Institut 2012

Im Jahre 2008 wurden in Deutschland 5.529 Sterbefälle aufgrund eines malignen Ovarialtumors registriert. Das entspricht einem Prozentsatz von 5,6% an allen Krebssterbefällen bei deutschen Frauen. Der maligne Ovarialtumor belegt damit Platz 5 dieser Statistik (Robert Koch-Institut 2012; Abb. 3).

Weltweit sind im Jahre 2008 schätzungsweise 250.000 Frauen an malignen Ovarialtumoren erkrankt. In der weltweiten Statistik liegt der Ovarialtumor damit auf Platz 8 der häufigsten Tumorlokalisationen (GLOBOCAN 2008). Niedrig entwickelte Länder zeigen wesentlich kleinere geschätzte Inzidenzraten als hoch entwickelte Industrienationen. Selbiges zeigt sich beim Vergleich der Mortalitätsraten. In den USA konnte eine um etwa 50% höhere Inzidenzrate bei hellhäutigen Frauen im Vergleich zu dunkelhäutigen Frauen beobachtet werden (Harris et al. 1992).

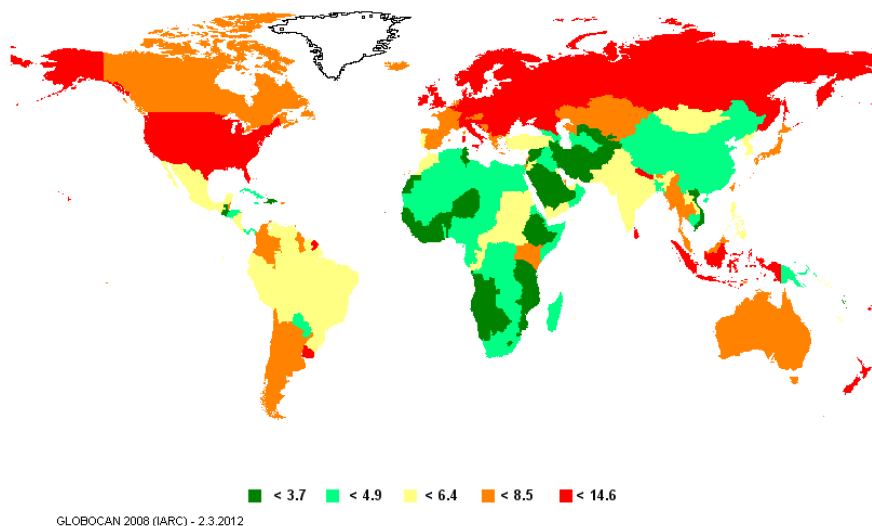


Abbildung 4: Geschätzte altersstandardisierte Inzidenzraten je 100.000; Ovar (GLOBOCAN 2008)

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die genaue Ätiologie der Ovarialtumoren konnte bis heute nicht vollständig geklärt werden. Nichtsdestotrotz entstanden in den letzten Jahrzehnten insgesamt drei Hypothesen, die eine Entstehung von Ovarialkarzinomen erklären könnten. Alle Hypothesen fanden ihren Ursprung in der Betrachtung epidemiologischer Daten zur Risikoerhöhung und –reduktion der Entstehung eines Ovarialkarzinoms.

Die erste Hypothese beinhaltet das sogenannte „Incessant Ovulation Model“. Durch die Ovulation entsteht in jedem Zyklus ein Defekt im Oberflächenepithel des Ovars. Dieser Defekt wird durch Zellproliferation geschlossen. Dabei kann es schrittweise zu einer

Anhäufung von genetischen Mutationen kommen. Darüber hinaus können Inklusionszysten aus Oberflächenepithel im Stroma entstehen. Diese Epithelzellen sind nun einer Umgebung ausgesetzt, in der sie parakrin oder autokrin durch Wachstumsfaktoren stimuliert werden und auf diese Weise eine Karzinogenese hervorgerufen werden kann. Als Grundlage dieses Modells diente die Beobachtung, dass Ovarialtumoren meist epithelialen Ursprungs sind, sich aber überwiegend im Stroma des Organs befinden (Fathalla et al. 1971, Hennessy et al. 2009).

Die zweite Theorie zur Entstehung von Ovarialkarzinomen sieht die hohen Gonadotropin-Spiegel während der Ovulation und postmenopausal als mögliche Ursache. Erhöhte Gonadotropin-Spiegel führen zu einer vermehrten Produktion von Östrogenen, die wiederum das Oberflächenepithel des Ovars stimulieren. Eine Überstimulation könnte dabei neoplastische Transformationen verursachen (Cramer et al. 1983, Choi et al. 2007).

Die dritte Hypothese beschäftigt sich mit Entzündungen im weiblichen Genitaltrakt. Die bei Entzündungen oder auch bei der Ovulation freigesetzten Mediatoren könnten zu Schäden und Mutationen am Oberflächenepithel führen. Letztendlich enden diese Veränderungen wie bei allen Hypothesen in einer Karzinogenese (Ness et al. 1999, Shan et al. 2009).

In der internationalen Forschungsgemeinde hält man es ebenso für möglich, dass einige Ovarialkarzinome, v.a. vom serösen Subtypus, ihren Ursprung in der distalen Tube haben. Ovarialkarzinome und Tubenkarzinome weisen eine starke histologische Ähnlichkeit auf. Zudem konnten bei Patientinnen, die sich aufgrund einer BRCA-Mutation einer prophylaktischen Oophorektomie unterzogen haben, erhöhte Inzidenzen von dysplastischen Veränderungen an der distalen Tube nachgewiesen werden (Medeiros et al. 2006, Crum et al. 2007).

Insgesamt ist die genaue Ätiologie, wie zuvor bereits erwähnt, noch nicht vollständig aufgeklärt. Bei der Entstehung des Ovarialkarzinoms handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen. Epidemiologische Untersuchungen zeigten zahlreiche Faktoren, die die Entstehung eines Ovarialkarzinoms möglicherweise begünstigen oder eine protektive Wirkung haben.

Als bedeutender Risikofaktor für eine Entwicklung eines Ovarialkarzinoms gilt eine positive Familienanamnese in Hinblick auf Mamma- und Ovarialkarzinome bei Verwandten ersten und zweiten Grades. So publizierten Schildkraut et al., dass sich das

Risiko einer Entwicklung eines Ovarialkarzinoms um etwa das 2,8-fache erhöht, wenn eine Verwandte ersten Grades bereits an einem Ovarialkarzinom erkrankte (Schildkraut et al. 1989). Es wird angenommen, dass es sich bei etwa 12-15% der Ovarialkarzinome um hereditäre Formen handelt. Hierbei sind vor allem Genmutationen in den Breast Cancer Genen 1 und 2 (BRCA 1 und 2) ursächlich. So liegt das Lebenszeitrisko für ein Ovarialkarzinom bei einer Frau mit nachgewiesener BRCA 1-Mutation bei etwa 30-44%. Frauen mit einer BRCA 2-Mutation haben ein Lebenszeitrisko von 27%. Desweiteren zeigen auch Frauen mit einem Lynch-Syndrom (HNPCC), oder einem Li-Fraumeni-Syndrom ein erhöhtes Risiko. Die hereditären Formen treten tendenziell früher auf als die sporadischen Ovarialkarzinome (Vega 2010, Hunn et al. 2012).

Das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken erhöht sich mit zunehmendem Alter. Frauen mit Adipositas zeigen ebenfalls eine erhöhte Tumorzinzidenz (Hunn et al. 2012). Desweiteren konnte eine positive Korrelation zwischen der Anzahl ovulatorischer Zyklen und dem Erkrankungsrisiko beobachtet werden. Das Erkrankungsrisiko steigt bei einer frühen Menarche und späten Menopause (Casagrande et al. 1979). Ein weiterer Risikofaktor ist die Nulliparität. Einige Fall-Kontroll-Studien zeigten, dass bereits die erste Schwangerschaft zu einer Risikoreduktion von etwa 30% führt. Jede weitere Schwangerschaft steigert diesen protektiven Effekt. Dabei ist der positive Effekt am stärksten bei späteren Schwangerschaften. Eine Schwangerschaft im Alter von 35 Jahren führt zu einer doppelt so hohen Risikoreduktion wie eine Schwangerschaft im Alter von 25 Jahren. Mehrlingsschwangerschaften zeigen ein höheres protektives Potential (Whiteman et al. 2003, Hunn et al. 2012). Darüber hinaus scheint das Stillen einen weiteren positiven Einfluss zu haben. Dieser fällt mit einer beobachteten 2%igen Risikoreduktion allerdings eher gering aus. Der protektive Effekt konnte zudem nicht bei allen histologischen Subtypen ovarieller Tumoren nachgewiesen werden (Hunn et al. 2012).

Die Einnahme von Ovulationshemmern senkt das Ovarialkarzinomrisiko deutlich. Bereits bei einer dreijährigen Einnahmeperiode verringert sich das Risiko eines epithelialen Karzinoms um etwa 30%. Je länger die Einnahmeperiode ist, desto mehr steigert sich der positive Effekt. Zunächst wurde dieser Effekt durch die Reduktion der ovulatorischen Zyklen erklärt. Später fanden Rodriguez et al. eine proapoptotische Wirkung von Gestagenen. Die Apoptose ist der entscheidende Mechanismus zur Elimination von mutierten Zellen und somit zur Prävention von Karzinomen (Rodriguez et al. 2002, Beral et al. 2008).

Generell scheint das Wechselspiel von Sexualhormonen einen Einfluss auf die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms zu haben. Während Gestagene wie zuvor beschrieben protektiv wirken, haben Androgene und Östrogene vermutlich eine eher gegenteilige Wirkung. Denn die postmenopausale Hormonersatztherapie mit Östrogenen ist ein Risikofaktor für die Entstehung von Ovarialtumoren. Der Effekt von Androgenen wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Fakt ist, dass das polyzystische Ovarsyndrom das Ovarialkarzinomrisiko erhöht. Diese Erkrankung geht gleichzeitig mit einer Erhöhung der Androgenkonzentration im Serum einher. Zusätzlich konnten auf dem Oberflächenepithel des Ovars Androgenrezeptoren nachgewiesen werden, die eine direkte Wirkung des Hormons auf das Ovar anzeigen (Lacey et al. 2002, Lacey et al. 2006, Olsen et al. 2008, Hunn et al. 2012).

Entzündliche Vorgänge im kleinen Becken steigern ebenfalls das Risiko einer Karzinogenese. So zeigte eine Fall-Kontroll-Studie die Tendenz, dass Frauen, die eine PID (pelvic inflammatory disease) nach einer sexuell übertragbaren Krankheit entwickelten, ein höheres Risiko für die Entwicklung eines Karzinoms zeigen. Darüber hinaus konnte eine protektive Wirkung von entzündungshemmenden COX-2-Inhibitoren nachgewiesen werden (Rodriguez-Burford et al. 2002, Lin et al. 2011).

Eine Endometriose in der medizinischen Vorgeschichte ist ein weiterer Risikofaktor. Es wird vermutet, dass hierbei, ähnlich wie bei der PID, entzündliche Vorgänge zur neoplastischen Transformation der Herde führen könnten (Ness 2003).

Die Verwendung von Talkumpuder kann durch eine Aszension der Partikel entzündliche Vorgänge im kleinen Becken auszulösen. Diese können möglicherweise ebenfalls eine Karzinogenese hervorrufen. Talkum zeigt chemische Ähnlichkeit mit Asbest und könnte auch aus diesem Grund für die durch Huncharek et al. beschriebene 33%ige Risikoerhöhung verantwortlich sein. Langseth et al. weisen allerdings auf eine kritische Betrachtung der Studienergebnisse hin, da die Datenlage hinsichtlich der Talkexposition oftmals sehr inhomogen ist (Huncharek et al. 2003, Langseth et al. 2008).

Prophylaktisch wirken hingegen Tubenligaturen und Hysterektomien. Eine Metaanalyse von 12 Fall-Kontrollstudien zeigte eine etwa 40%ige Risikoreduktion nach einer Hysterektomie mit Verbleib der Adnexe oder nach vorgenommener Tubenligatur (Harris et al. 1992).

1.1.3 Klassifikation

Generell kann aus jedem im Ovar vorkommenden Zelltypus ein Ovarialtumor entstehen. Das Ovar gliedert sich histologisch in einen epithelialen Anteil (das seröse Oberflächenepithel), das innere Stroma und die Keimzellen. Diese drei Anteile bilden die Hauptgruppen zur Unterscheidung von Ovarialtumoren. So differenziert man zwischen epithelialen, Keimstrangstroma- und Keimzelltumoren. Die epithelialen Tumoren sind mit einem Anteil von etwa 90% die weitaus häufigste Entität. Keimstrangstromatumoren sind mit etwa 8% am zweithäufigsten. Keimzelltumoren bilden mit etwa 2-3% die seltenste der drei Tumorstammgruppen. Jede Ursprungszelle kann sich wiederum in verschiedene Zelltypen differenzieren. Diese Differenzierung ist namensgebend für die Untergruppen der Ovarialtumoren (Mayr et al. 2010).

Die Klassifizierung der epithelialen Tumoren setzt sich aus zwei Bestandteilen zusammen. Zunächst wird die Differenzierung des Tumors angegeben. Diese erfolgt durch Vergleich von histologischen Ähnlichkeiten mit anderen Geweben, die wie das Oberflächenepithel ebenfalls aus dem embryonalen Müllerepithel entstehen. Der zweite Begriff bezeichnet die Dignität des Tumors. Das sind die benignen Adenome, die malignen Karzinome sowie die Borderlinetumoren. Letztere nehmen eine Sonderstellung ein. Borderlinetumoren weisen teilweise Charakteristika maligner Tumoren, wie beispielsweise eine Mehrschichtigkeit > 4 Lagen, eine erhöhte Mitosezahl sowie eine erhöhte Kern-Plasma-Relation auf. Eine Stromainvasion findet allerdings nicht statt. Sie nehmen also eine Stellung zwischen der malignen und der benignen Tumordignität ein (Mayr et al. 2010).

Tabelle 1: histologische WHO-Klassifikation von Ovarialtumoren
(modifiziert und vereinfacht nach Scully 1999)

I. Oberflächenepithel-Stromatumoren
Seröse Tumoren
Muzinöse Tumoren (endozervix-ähnlich; intestinal)
Endometroide Tumoren
Klarzellige Tumoren
Transitionalzellige Tumoren
Plattenepithelkarzinome
Epitheliale Mischtumoren
Undifferenzierte Karzinome
II. Keimstrangstromatumoren
Granulosa-Stromazelltumoren
Sertoli-Stromazelltumoren; Androblastom
Keimstrangtumoren mit annulären Tubuli
Gynandroblastom
Unklassifizierbar
Steroid-(Lipid)-Zelltumoren
III. Keimzelltumoren
Dysgerminom
Dottersacktumor (endodermaler Sinustumor)
Embryonales Karzinom
Polyembryom
Chorionkarzinom
Teratom
gemischte Keimzelltumoren
IV. Gonadoblastom
V. Keimzell-Keimstrang-Stroma-Tumor (nicht-gonadoblastomer Typ)
VI. Tumoren des Rete ovarii
VII. Mesotheliale Tumoren
VIII. Tumoren unsicheren Ursprungs und verschiedene Tumoren
IX. Gestationale trophoblastische Erkrankungen
X. Weichgewebstumoren (nicht ovarspezifisch)
XI. Maligne Lymphome, Leukämien, Plasmozytome
XII. Unklassifizierbare Tumoren
XIII. Metastasen
XIV. Tumor-artige Läsionen

Die histologische Klassifikation wird erweitert durch das Grading nach Silverberg. Dieses Gradingssystem bildet einen Score, der sich aus der Betrachtung von histologischer Architektur, Kernpleomorphie und Mitosezahl zusammensetzt. Für jedes histologische Merkmal wird dabei ein Punktwert zwischen 1 und 3 vergeben (siehe Tabelle 2). Diese Werte werden zum sogenannten Silverberg-Score addiert und wie in Tabelle 3 gezeigt mit G1-G3 bezeichnet. Ein niedriger Score (G1) ist prognostisch

günstig, ein hoher Score (G3) eher ungünstig. Borderlinetumoren werden mit GB klassifiziert. Gegebenenfalls können undifferenzierte Tumoren auch mit G4 bezeichnet werden (Silverberg 2000).

Tabelle 2: Gradingssystem von Silverberg (modifiziert nach Silverberg 2000)

Punktzahl A	Architektur
1	Glandulär
2	Papillär
3	Solide
Punktzahl B	Kernpleomorphie
1	relativ uniforme vesikuläre Kerne Kerngrößenvariation $\leq 2:1$ keine prominenten Nukleolen
2	Kerngrößenvariation $> 2:1$ und $< 4:1$ kleine Nukleolen keine bizarren Kerne
3	Kerngrößenvariation $\geq 4:1$ große eosinophile Nukleolen evtl. bizarre Kerne
Punktzahl C	Mitosezahl (Sehfeldzahl 20)
1	0-7
2	8-18
3	≥ 19

Tabelle 3: Auswertung des Differenzierungsgrades mit Hilfe des Silverberg-Scores (modifiziert nach Silverberg 2000)

Differenzierungsgrad	Silverberg-Score	Erklärung
GX	-	kein Grading möglich
GB	-	Borderline-Malignität
G1	3-5 Punkte	gut differenziert
G2	6-7 Punkte	mäßig differenziert
G3	8-9 Punkte	schlecht differenziert oder undifferenziert

Neben der histologischen Einordnung erfolgt bei jedem Tumor eine Stadieneinteilung nach der TNM- oder FIGO-Klassifikation. Diese beiden Klassifikationssysteme decken sich heutzutage weitgehend. Die Stadieneinteilung erfolgt auf Grundlage der Tumorausbreitung sowie des Vorhandenseins eines malignen Aszites, eines Pleuraergusses und/ oder Metastasen. Tabelle 4 zeigt die TNM- und FIGO-Klassifikation mit den dazugehörigen Kriterien zur Bestimmung der einzelnen Stadien (Wittekind et al. 2009).

Tabelle 4: TNM- und FIGO-Klassifikation des Ovarialkarzinoms (modifiziert nach Wittekind et al. 2009)

TNM-Klassifikation	FIGO-Klassifikation	Tumorausbreitung
T1	I	Tumorausbreitung begrenzt auf Ovarien
T1a	IA	Tumor auf ein Ovar begrenzt, intakte Organkapsel, kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars, keine malignen Zellen im Aszites oder bei einer Peritonealspülung
T1b	IB	Tumor auf beide Ovarien begrenzt, intakte Organkapsel, kein Tumor auf der Oberfläche beider Ovarien, keine malignen Zellen im Aszites oder bei einer Peritonealspülung
T1c	IC	Tumor begrenzt auf ein Ovar oder beide Ovarien, rupturierte Organkapsel; Tumor auf der Oberfläche des Ovars oder maligne Zellen im Aszites oder bei einer Peritonealspülung
T2	II	Tumorausbreitung im Becken
T2a	IIA	Ausbreitung auf Uterus und /oder Tuben, keine malignen Zellen im Aszites oder bei der Peritonealspülung
T2b	IIB	Ausbreitung auf weitere Strukturen im Becken, keine malignen Zellen im Aszites oder bei der Peritonealspülung
T2c	IIC	Stadium 2a oder 2b, sowie maligne Zellen im Aszites oder in der Peritonealspülung
T3 und/ oder N1	III	Tumorausbreitung außerhalb des Beckens, histologisch nachgewiesene Peritonealkarzinose außerhalb des Beckens und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
T3a	IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens
T3b	IIIB	Makroskopische Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens, $\leq 2\text{cm}$
T3c und/ oder N1	IIIC	Makroskopische Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens $> 2\text{cm}$ und/ oder regionäre Lymphknoten-Metastasen
NX	-	keine Beurteilung der regionären Lymphknoten möglich
N0	-	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	-	regionäre Lymphknotenmetastasen
M1	IV	Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)

1.1.4 Screening

Das Ovarialkarzinom wird nach wie vor meist in den fortgeschrittenen Tumorstadien FIGO III oder gar FIGO IV entdeckt (Robert Koch-Institut 2012). Es wäre daher wünschenswert durch eine Screeningmethode Ovarialkarzinome bereits in den Stadien zu entdecken, in denen sich der Tumor noch auf das Ovar begrenzt. Diese Früherkennung könnte die 5-Jahres-Überlebensraten erheblich verbessern.

Ein geeigneter Screeningtest sollte einen positiven prädiktiven Wert von mindestens 10% aufweisen. Diese geforderten Werte konnten bisher mit keiner Methode erreicht werden, sodass es zurzeit für die Normalbevölkerung mit einem normalen Ovarialkarzinomrisiko keine Empfehlung zur Durchführung eines Screenings gibt. Das amerikanische NIH empfiehlt daher bei allen Frauen lediglich eine jährliche allgemeine gynäkologische Untersuchung mit ausführlicher Anamnese hinsichtlich der bekannten Risikofaktoren (NIH 1995, Hennessy et al. 2009).

Nichtsdestotrotz gibt es zahlreiche Ansätze für Screeningmethoden. So bietet der Anstieg des Serummarkers CA-125 eine Möglichkeit Ovarialkarzinome zu erkennen. Bei etwa 80% der Ovarialkarzinompatientinnen liegt der CA-125-Wert oberhalb des Cut-Offs von 35 U/ml. Allerdings kann dieser Marker auch bei gesunden Frauen, bei anderen Tumoren oder gutartigen Erkrankungen, wie beispielsweise einer Leberzirrhose, Endometriose, Adnexitis oder einem Uterus myomatosus, erhöht sein. Aus diesen Gründen reicht der CA-125-Marker nicht als alleiniger Screeningtest aus. Eine Verbesserung des Vorhersagewertes dieses Markers konnte durch die Verwendung des ROC-Scores (Risk of Ovarian Cancer) erreicht werden. Dabei wird eine jährliche CA-125-Bestimmung durchgeführt. Ein kontinuierlicher Anstieg ist verdächtig und erhöht das bei dem Test ermittelte individuelle Erkrankungsrisiko. Der Test kann somit auch Anstiege unterhalb des Cut-Offs erkennen. Lineare Werte oberhalb des Cut-Offs, die bei alleinigem CA-125-Screening zu falsch positiven Testergebnissen führen würden, erhöhen hier nicht das Erkrankungsrisiko (Mahner et al. 2009).

In einer multizentrischen Studie in Großbritannien wurden über 200.000 postmenopausale Frauen mit einer Kombination aus CA-125-Bestimmung und transvaginaler Sonographie oder allein durch transvaginale Sonographie gescreent. Die Kombination aus CA-125 im Serum und Sonographie lieferte vielversprechende Sensitivitäts- und Spezifitätswerte (Menon et al. 2009).

Frauen mit Verdacht auf bzw. nachgewiesener BRCA 1- oder BRCA 2-Mutation gehören zur Hochrisikopopulation. Das National Comprehensive Cancer Network (NCCN) empfiehlt bei diesen Frauen halbjährliche allgemeine gynäkologische Untersuchungen mit einer CA-125-Bestimmung sowie einer zusätzlichen transvaginalen Sonographie. Hiermit sollte im Alter von 30 bis 35 Jahren bzw. 5-10 Jahre früher, als die erste Ovarialkarzinomdiagnose in der Familie gestellt wurde, begonnen werden (Burke et al. 1997). Die deutschen S3-Leitlinien hingegen empfehlen kein regelrechtes Screening von Risikopopulationen. Bei hereditären Ovarialkarzinomen sollten Frauen jenseits der 40 oder mit abgeschlossenem Kinderwunsch über eine mögliche Risikoreduktion durch eine bilaterale Salpingoophorektomie aufgeklärt werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Zahlreiche Forschungslabore arbeiten an einer Etablierung von Biomarkern im Serum. Petricoin et al. konnten im Serum von Ovarialkarzinompatientinnen bestimmte Proteinmuster nachweisen. Diese Proteinmuster fanden sich in allen Proben von Ovarialkarzinompatientinnen unterschiedlicher Stadien. Dabei wurden ebenso Erkrankungen im Frühstadium FIGO I erkannt. Diese Art des Screening scheint vielversprechend für die Zukunft. Allerdings stehen noch prospektive Studien aus, die diese Proteinmuster auch in größeren Kollektiven mit hoher Sensitivität und Spezifität nachweisen können (Petricoin et al. 2002, Nossov et al. 2008).

1.1.5 Klinik und Diagnostik

Das Ovarialkarzinom verursacht in den frühen Stadien meist keine Symptome. Bei fortgeschrittener Erkrankung treten unspezifische Symptome, wie diffuse Abdominalschmerzen, Völlegefühl im Oberbauch oder Unterbauch, Appetitlosigkeit, Obstipationen, Diarrhoen, erhöhte Miktionsfrequenzen, Gewichtsverlust, Dyspnoe, Leistungsminderung, Nausea oder Emesis auf. Weiterhin können urologische Symptome, wie etwa Harninkontinenz oder Pollakisurie, vorkommen. Es können genitale Blutungen oder Menstruationsstörungen beobachtet werden. Eine Gewichtsabnahme bei gleichzeitiger Zunahme des Bauchumfanges kann ebenso auf ein Ovarialkarzinom hindeuten. Die genannten Symptome beginnen meist schleichend und verschlechtern sich progredient. Daneben kann auch eine akute Symptomatik auftreten. Ein mechanischer Ileus, intraperitoneale Blutungen nach Rupturen, Stieldrehungen des

Ovars sowie venöse Thrombosen in der unteren Extremität sind hier beispielhaft zu nennen (Kreienberg 2009).

Die Diagnostik des Ovarialkarzinoms beinhaltet zunächst eine ausführliche Anamnese hinsichtlich der in Kapitel 1.1.2 genannten Risikofaktoren und der derzeitigen Symptomatik der Patientin. Es folgt die klinisch-gynäkologische Untersuchung. Dabei hat die bimanuelle Tastuntersuchung einen hohen Stellenwert. Hierbei können Adnextumoren sehr zuverlässig getastet werden. Große, solide, unverschiebliche Tumoren mit einer knotigen Oberfläche gelten als besonders malignomverdächtig (Kreienberg 2009).

Innerhalb der weiterführenden bildgebenden Diagnostik ist die transvaginale Sonographie bedeutend. Sie ermöglicht die Darstellung des Uterus, der Adnexen und des Douglas-Raumes auch bei sehr adipösen Patientinnen. Bei einem auffälligen Befund kann dessen Dignität mit Hilfe von Tumorscores abgeschätzt werden. Eine endgültige, sichere Dignitätsbeurteilung kann allerdings erst nach eingehender pathologischer Untersuchung von Tumorgewebe erfolgen (Prömpeler 2009).

Der Mainz-Sonomorphologiescore vergibt Punkte für die Gesamtstruktur des Befundes (einfach, komplex), die Begrenzung (glatt, leicht oder deutlich irregulär), die Wanddicke (< 3 mm, 3-5 mm, > 5 mm), das Binnenecho im zystischen Anteil (keines, homogen, inhomogen), das Vorkommen von Septen (keine, < 3 mm, > 3 mm), das Vorkommen bzw. die Form eines soliden Anteils (keiner, glatt, höckerig), die Echogenität des soliden Anteils (keine, homogen, inhomogen), den Schallschatten (Echoverstärkung, teilweise, komplett), das Vorkommen von Aszites (keiner, wenig, mäßig) sowie das Vorkommen von Leber- und/ oder Peritonealmetastasen (nicht nachweisbar, nicht beurteilbar, darstellbar). Jede Kategorie wird mit 0, 1 oder 2 Punkten bewertet. Durch Addition aller vergebenen Punkte erhält man den Scorewert. Liegt dieser bei prämenopausalen Frauen ≥ 9 Punkten und bei postmenopausalen Frauen ≥ 10 Punkten, so ist der sonographische Befund malignomverdächtig (Merz et al. 1998, Weber et al. 1999).

Die abdominale Sonographie ermöglicht die Beurteilung besonders großer Adnextumoren. Weiterhin können hiermit Aszites, Lebermetastasen sowie eine tumoröse Veränderung des Omentums nachgewiesen werden (Burgess et al. 2010). Die Farbdoppler-Sonographie bietet eine weitere diagnostische Methode. Der Nachweis einer erhöhten Vaskularisation sowie von arteriovenösen Shunts innerhalb des

auffälligen Befundes können ebenfalls auf ein eher malignes Geschehen hindeuten. Ebenso sind erniedrigte Werte bei der Erhebung des Resistance Index und des Pulsatility Index Indikatoren für Malignität ($RI < 0,4$, $PI < 1,0$) (Valentin 2000, Prömpeler 2009).

Bei einem erhärteten Verdacht auf Malignität wird ein Röntgen-Thorax angefertigt. Der Nachweis eines Pleuraergusses ist von großer diagnostischer Bedeutung, vor allem wenn dieser maligne Zellen enthält. Zum weiteren Staging können die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT) eingesetzt werden. Sie können mögliche Lymphknotenmetastasen, Lebermetastasen, eine Peritonealkarzinose oder, wie die Röntgen-Thorax-Aufnahme, Pleuraergüsse darstellen. Darüber hinaus bieten die Positronen-Emissions-Tomographie (PET-CT) bzw. die Flourdesoxyglucose-Tomographie (FDG-PET) zusätzliche Möglichkeiten zum Nachweis von Metastasen und Peritonealkarzinosen (Rieber-Brambs 2009, Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Besteht der Verdacht auf eine gastrointestinale Tumordinfiltration, so kann ggf. präoperativ eine Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) und bzw. oder eine Koloskopie durchgeführt werden. Bei einer urologischen Symptomatik wird eine Nieren-Sonographie zum Nachweis eines möglichen Harnstaus sowie ggf. ein i.v.-Pyelogramm zum Ausschluss von Ureterobstruktionen durchgeführt. Letzteres ist bei zuvor durchgeführter CT oder MRT obsolet (Rieber-Brambs 2009).

Zu den Differentialdiagnosen ovarieller Raumforderungen gehören neben den Ovarialkarzinomen auch benigne Zysten, benigne Tumoren, uterine Tumoren, Endometriosen, extrauterine Graviditäten, entzündliche Prozesse oder Metastasen anderer Primärtumoren (z.B. Krukenbergtumor) (Stickeler et al. 2010).

1.1.6 Therapie

1.1.6.1 Operative Therapie

Besteht nach der primären Diagnostik ein begründeter Verdacht auf einen Ovarialtumor, so sollte eine Operation erfolgen. Diese Operation ist zum einen nötig, um die genaue Diagnose durch eine Probenentnahme pathologisch sichern zu können. Desweiteren kann ein exaktes Staging ausschließlich durch die systematische Exploration der gesamten Abdominalhöhle erfolgen. Das Staging ist prognostisch sehr wertvoll und spielt eine relevante Rolle bei der Therapieplanung. Zu guter Letzt hat die Operation

durch die Entfernung- wenn möglich- aller suspekten Areale einen entscheidenden therapeutischen Wert.

Die Größe des postoperativen Tumorrestes ist ein bedeutender Prognosefaktor. Innerhalb einer Studie der AGO-Ovar zeigten die Patientinnen, bei denen intraoperativ eine makroskopische Tumorfreiheit erreicht werden konnte, ein medianes Gesamtüberleben von 99,1 Monaten. Patientinnen mit einem postoperativen Tumorrest von $\leq 1\text{cm}$ wiesen ein signifikant kürzeres medianes Gesamtüberleben von 36,2 Monaten auf. Größere Tumorreste führten zu einem noch kürzeren Gesamtüberleben von durchschnittlich 29,6 Monaten bei den betroffenen Patientinnen. Wenn möglich sollte daher bei jeder Patientin eine makroskopische Tumorfreiheit angestrebt werden. Dies ist leider nicht immer möglich, da das Alter und der Allgemeinzustand häufig die eigentlich notwendige Radikalität beschränken (du Bois et al. 2009, Chang et al. 2012).

Die Operation erfolgt mittels Längsschnittlaparotomie. Es sollte eine Peritonealzytologie entnommen werden. Es folgt die beidseitige hohe Adnexexstirpation sowie die Hysterektomie. Im Falle eines Konglomerattumors sollte eine En-Bloc-Resektion von Adnexen, Uterus, Sigma und/oder Rektum erfolgen. In diesem Falle wird eine Deperitonealisierung des Blasen- und Beckenperitoneums angeschlossen. Die gesamte Abdominalhöhle wird systematisch auf suspekte Areale hin inspiziert und palpiert. Gegebenenfalls werden diese Areale entfernt oder, falls keine Entfernung möglich ist, biopsiert. Das Peritoneum des kleinen Beckens und des Abdomens wird ebenfalls sorgfältig inspiziert. Auffällige Areale werden großzügig exziiert. Darüber hinaus werden auch an unauffälligen Bereichen des Harnblasen-, des Douglasperitoneums, des Diaphragmas und an den parakolischen Rinnen Biopsien entnommen. Eine infragastrische Resektion des Omentums wird ebenfalls vorgenommen. Bei Frühstadien und bei unmöglicher infragastrischer Resektion kann auch eine infrakolische Omentektomie erfolgen. Darüber hinaus werden die pelvinen und die paraaortalen (bis zu den Vv. renales) Lymphknoten entfernt. Die entnommenen Organe und Gewebeteile sollten einer sorgfältigen pathologischen Untersuchung zugeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Bei einem FIGO I-Stadium mit einem G1-Grading und bei einigen Borderline-Tumoren kann, falls gewünscht, fertilitätserhaltend operiert werden. Hierbei wird lediglich eine einseitige Adnexexstirpation vorgenommen. Nach erfülltem Kinderwunsch sollte die

Patientin auf die Möglichkeit einer sekundären Entfernung von Uterus und Adnexen aufgeklärt werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

1.1.6.2 Adjuvante Therapie

Patientinnen mit einem Frühstadium FIGO Ia und einem G1-Grading müssen keiner adjuvanten Chemotherapie zugeführt werden. Für alle weiteren Frühstadien bis zum Stadium FIGO IIA empfiehlt die S3-Leitlinie eine adjuvante platinhaltige Chemotherapie über 3-6 Zyklen (Tropé et al. 2007, Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Laut Bell et al. gibt es bei einem Frühstadium keinen signifikanten Vorteil zwischen einer Therapie mit 3 oder 6 Zyklen (Bell et al. 2006).

Bei Ovarialkarzinomen in den fortgeschrittenen Stadien FIGO IIB bis FIGO IV sollte der Operation stets eine adjuvante Kombinationstherapie angeschlossen werden. Die Leitlinien empfehlen hierbei eine Kombination aus Paclitaxel (175 mg/m² über 3 Stunden) und Carboplatin (AUC 5) über 6 Zyklen alle 3 Wochen. Gegebenenfalls kann zusätzlich eine antiangiöse Therapie mit Bevacizumab erfolgen (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Im Falle eines Borderlinetumors bedürfen die Stadien FIGO I bis FIGO II keiner adjuvanten Chemotherapie (National Cancer Institute 2003). Eine Studie von Lackmann et al. zeigte, dass Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Stadium FIGO III und postoperativer Tumorfreiheit auch ohne anschließende adjuvante Therapie eine gute Prognose aufweisen. Bei einem postoperativem Tumorrest oder einem Stadium FIGO IV sollte in jedem Falle eine adjuvante Therapie, wie bei einem invasiven Karzinom, durchgeführt werden (Lackmann et al. 2003, Dettmar et al. 2010).

1.1.6.3 Follow-Up

Das Follow-Up beinhaltet regelmäßige gynäkologische Untersuchungen, vaginale und abdominale Sonographien. Die routinemäßige Bestimmung der CA-125-Serumkonzentrationen wird gemäß S3-Leitlinie nicht mehr empfohlen. Innerhalb der ersten 3 Jahre nach der Diagnosestellung wird meist ein Kontrollintervall von 3 Monaten angewandt. Dieses kann nach dem 3. Jahr auf einen 6-monatigen und nach dem 5. Jahr auf einen 12-monatigen Abstand vergrößert werden. Weiterhin wird aufgrund des erhöhten Risikos an einem Mammakarzinom zu erkranken, eine

Mammographie im Abstand von 12 Monaten empfohlen. Bei einer klinischen Symptomatik werden die in Kapitel 1.2.5 genannten Zusatzuntersuchungen durchgeführt (Schröck et al. 2010, Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

1.1.6.4 Second-Line-Therapie

Bei einem platinrefraktären Rezidiv, das definitionsgemäß innerhalb der ersten 6 Monate nach Abschluss der platinhaltigen Therapie auftritt, wird in den Leitlinien eine Monotherapie mit einem nicht-platinhaltigem Wirkstoff empfohlen. Hierbei könnten Topotecan, pegyliertes liposomales Doxorubicin, Gemcitabine und, wenn zuvor keine Taxane verabreicht wurden, Paclitaxel weekly angewendet werden. Einige Studien sprechen auch für die Wirksamkeit von GnRH-Analoga, Tamoxifen, Gestagene, Etoposid und Treosulfan in der Rezidivsituation. Eine Re-Debulking-Operation ist nur sinnvoll, wenn eine vollständige makroskopische Tumorfreiheit wiederhergestellt werden kann (AGO Ovar 2007, Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Im Falle eines platinsensiblen Rezidivs, das frühestens 6 Monate nach Beendigung der Platin-Therapie auftritt, wird eine erneute platinhaltige Salvagetherapie empfohlen. Als Kombinationswirkstoffe zum Platin könnten Paclitaxel, Gemcitabin oder pegyliertes liposomales Doxorubicin verabreicht werden. Gegebenenfalls kann auch hier zusätzlich eine antianginöse Therapie mit Bevacizumab erfolgen (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Das Re-Debulking ist im Rezidivfall sinnvoll, wenn erneut eine makroskopische Tumorfreiheit erzielt werden kann sowie die Patientin einen guten Allgemeinzustand aufweist und kein Aszites nachgewiesen werden konnte (Bauerfeind et al. 2010).

Borderline-Rezidive können erneut reseziert werden. Gegebenenfalls kann eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden. Der Nutzen dieser adjuvanten Therapie in der Rezidivsituation ist allerdings nicht eindeutig durch klinische Studien belegt (Dettmar et al. 2010).

1.1.6.5 Neue Therapiekonzepte

Die intraperitoneale Chemotherapie ist ein Therapiekonzept, das durch die vorwiegend intraperitoneale Ausbreitung des Ovarialkarzinoms ein vielversprechender Ansatz zu sein scheint. Erste Studien zeigten eine Verlängerung des progressionsfreien Intervalls

sowie des Gesamtüberlebens. Allerdings birgt diese Art der Therapie starke Nebenwirkungen, die häufig zum Abbruch der Behandlung innerhalb der Studienkollektive führten. Die S3-Leitlinien für maligne Ovarialtumoren empfehlen diese Therapieform derzeit nicht außerhalb von Studien mit Ausnahme einer Behandlung eines malignen Aszites in der Palliativsituation (Armstrong et al. 2006, Stickeler et al. 2010, Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Die zielgerichtete Therapie mittels spezifischer Antikörper gehört ebenso zu den neuen Therapiekonzepten. So konnte für den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Hemmer Bevacizumab in der ICON-7 sowie der GOG-218-Studie eine Verlängerung des progressionsfreien Intervalls beobachtet werden (Interventionsgruppe 14,1 Monate vs. Placebo-Gruppe 10,5 Monate). VEGF ist entscheidend an der Neoangiogenese eines Tumors und somit auch an dessen Wachstum beteiligt (Perren et al. 2011). Die aktuellen Leitlinien empfehlen ggf. den Einsatz von Bevacizumab für die Therapie fortgeschrittener Ovarialkarzinome (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Desweiteren gibt es noch zahlreiche weitere spezifische Antikörper, die im Rahmen von Studien zurzeit auf ihre Wirksamkeit getestet werden. Als Beispiele wären Pazopanib (Inhibitor des VEGFR-1,-2,-3, c-Kit und des PDGFR), Lonafernib (Inhibitor der Farnesyltransferase) und Abagomovab (antiidiotypischer Antikörper gegen CA-125) zu nennen. Alle Wirkstoffe werden zurzeit in Studien auf ihre Wirksamkeit getestet (Friedlander et al. 2010, Mazieres et al. 2004, Wagner et al. 2001).

1.1.7 Prognosefaktoren

Zu den etablierten unabhängigen Prognosefaktoren gehören das Tumorstadium (TNM- oder FIGO-Klassifikation), der histologische Subtyp des Tumors, die Größe des postoperativen Tumorrestes, das Tumorgrading, das Alter zum Diagnosezeitpunkt, der Allgemeinzustand der Patientin sowie die leitliniengerechte Therapie (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

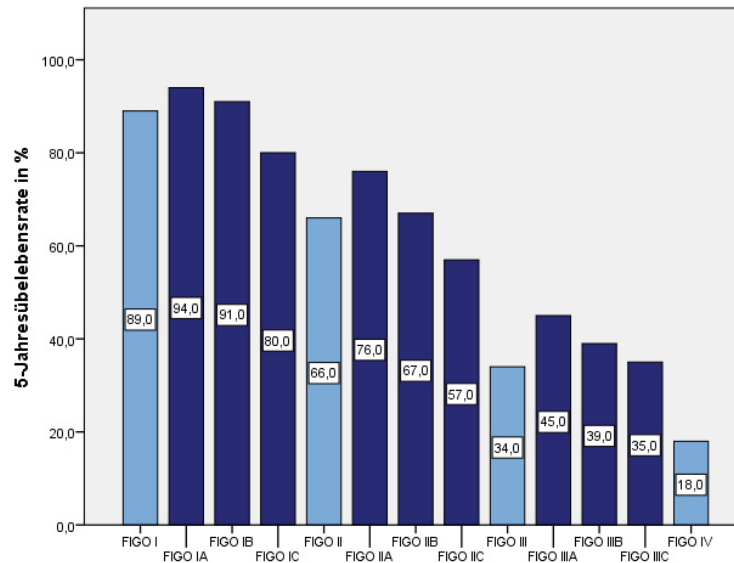


Abbildung 5: 5-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium
(nach American Cancer Society 2012)

Das Tumorstadium und die Überlebensraten weisen eine starke Korrelation auf. So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate einer Frau innerhalb des FIGO I-Stadiums bei ca. 90%. Eine Frau mit einem FIGO IV-Stadium hat lediglich eine 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 20%. Aufgrund dessen ist die TNM- bzw. FIGO-Klassifikation bedeutend bei der individuellen Therapieentscheidung (American Cancer Society 2012).

Die verschiedenen histologischen Subtypen der Ovarialtumoren weisen unterschiedlich hohe Überlebensraten auf und sind somit auch von prognostischer Bedeutung. Muzinöse und klarzellige Ovarialkarzinome zeigen eine signifikant schlechtere Prognose als serös-papilläre oder endometroide Karzinome. Beide erstgenannten Tumorentitäten weisen häufiger Platinresistenzen auf (Omura et al. 1991, Hess et al. 2003, Enomoto et al. 2003, Mackay et al. 2010).

Der Differenzierungsgrad der Ovarialtumoren ist im Stadium FIGO I besonders bedeutend. Das Grading ist hierbei ausschlaggebend für die Notwendigkeit einer Chemotherapie. Low-Grade Tumoren (G1) bedürfen im Gegensatz zu High-Grade Tumoren (G2/G3) keiner adjuvanten Chemotherapie (Trimbos et al. 2003, Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Ein weiterer sehr wichtiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben ist der postoperative Tumorrest. So zeigten Bristow et al., dass jede 10%ige intraoperative Tumorreduktion eine Verlängerung des Gesamtüberlebens um 5,5% bewirkt (Bristow et al. 2002).

Das Alter der Patientin bei Diagnosestellung stellt einen weiteren unabhängigen Faktor dar. Patientinnen ab dem 69. Lebensjahr haben im Mittel eine signifikant schlechtere Prognose als jüngere Patientinnen (Tingulstad et al. 2003, Hunn et al. 2012).

Ebenso ist der Allgemeinzustand der Patientin relevant. Ein Karnofskyindex von <70 manifestierte sich in einem kürzeren Gesamtüberleben. Schlechtere Indexwerte korrelierten mit einem noch schlechteren medianen Gesamtüberleben (Omura et al. 1991).

Als weitere Prognosefaktoren gelten der CA-125-Wert, die Platinsensitivität, Genexpressionsprofile und einige molekulare Marker. Besonders auf dem Gebiet der molekularen Marker hat die Grundlagenforschung in den letzten Jahren etliche neue prognostische Parameter nachweisen können. Bis zur klinischen Verwendung fehlt allerdings meist noch die endgültige Bewertung durch eine Studie (Mahner et al. 2009).

Mögliche molekulare Marker:

Tabelle 5: Molekulare Marker mit möglicher prognostischer Bedeutung

Molekulare Marker
uPA/PAI-1 (Kuhn et al. 1999)
CD24 (Kristiansen et al. 2002)
VEGF (Yokoyama et al. 2003)
p53 (Rose et al 2003)
EGFR (Psyrrri et al. 2005)
YKL-40 (Høgdall et al. 2009)
Galectin-1-Expression (Kim et al. 2012)

1.2 Die Jun-Familie und die c-Jun-N-terminalen Kinasen

1.2.1 Die AP-1-Transkriptionsfaktoren

Die AP-1 (activator protein 1)-Faktoren sind Proteindimere, die als Transkriptionsfaktoren u.a. an der Regulation von Zellzyklus und Apoptose beteiligt sind. Die Dimere werden aus Mitgliedern der Jun-, Fos-, CREB- (cAMP response element-binding protein), ATF- (activating transcription factor) oder der MAF- (musculoaponeurotic fibrosarcoma) Proteinfamilien gebildet. Die Jun-Proteine können zusätzlich an JDP-1 und JDP-2 (Jun dimerization protein) binden. Die Mitglieder der Jun-, MAF- und ATF-Familie sind in der Lage, stabile Hetero- und Homodimere zu bilden. Proteine der Fos-Familie können lediglich heterodimere Bindungen zu den Jun-Proteinen eingehen (Angel und Karin 1991, Aronheim et al. 1997, Jochum et al. 2001, Chinenov und Kerppola 2001, Vogt 2002, Eferl und Wagner 2003, Eyche et al. 2008, Shaulian 2010).

Die AP-1-Proteine gehören zur Gruppe der bZIP-Proteine. Sie haben eine Leucin-Zipper-Domäne, die durch hydrophobe Wechselwirkungen die Dimerisierung zweier bZIP-Proteine ermöglicht. Desweiteren weisen sie typischerweise eine basische Region auf, die für die DNA-Bindung bedeutend ist. AP-1-Proteine können an einer asymmetrischen Heptanukleotidsequenz, dem TPA-responsive element (TRE) binden. Diese 5'-TGA(G/C)TCA-3'-Sequenz befindet sich in den Promotern und Enhancern der Zielgene. Der Name des TPA-responsive element leitet sich ursprünglich von dem Tumorpromotor 12-O-Tetra-Decanoylphorbol-13-Acetat (TPA) ab, der eine deutliche Induktion der TRE-enthaltenden Zielgene verursacht. AP-1-Proteine können darüber hinaus mit einer geringeren Affinität an der symmetrischen Oktanukleotidsequenz des cAMP-responsive element (CRE) binden (Nakabeppu et al. 1988, Angel und Karin 1991, Vogt 2002).

Die AP-1-Faktoren können eine Vielzahl unterschiedlicher Dimere bilden. Die jeweilige Dimerkonstellation scheint dabei einen Einfluss auf die AP-1-Aktivität aber auch auf die Funktion zu haben. Die Bildung dieser Dimere ist u.a. auch abhängig von der Höhe der Konzentration der jeweiligen AP-1-Proteine (Bakiri et al. 2002, Eferl und Wagner 2003).

Die Regulation der AP-1-Proteine geschieht über zahlreiche Mechanismen auf transkriptionaler und post-translationaler Ebene. Externe Stimuli, wie UV-Exposition oder Wachstumsfaktoren und Zytokine, können die Transkription von AP-1-Proteinen beispielsweise über eine Aktivierung der MAPK-Kaskade (mitogen-activated protein kinase) induzieren. Post-translational spielt vor allem die Phosphorylierung durch Proteinkinasen eine große Rolle. So führt eine Phosphorylierung von c-Jun durch die JNK zu einer Aktivitätserhöhung (Behrens et al. 1999, Chang und Karin 2001, Vesely et al. 2009, Shaulian 2010).

Die AP-1-Proteine zeigen zahlreiche Interaktionen mit anderen Proteinen. So können onkogene Eigenschaften durch eine Interaktion mit einem weiteren Onkogen verstärkt werden. Als Beispiel wäre hier die Interaktion von c-Jun und dem Onkogen „Ras“ zu nennen. Eine Ras-Aktivierung führt zu einer erhöhten c-Jun-Transkriptionsrate (Alani et al. 1991, Smeal et al. 1991, Mechta et al. 1997).

Aber auch direkte Proteininteraktionen können durch eine Transrepression die AP-1-Aktivität verändern. Der Glucocorticoid- und der Retinsäurerezeptor bewirken auf diese Weise eine Transkriptionsinhibition (Schüle et al. 1990, Jonat et al. 1990, Herrlich 2001).

Wie bereits zuvor erwähnt, spielen die AP-1-Faktoren eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation und -differenzierung, der Apoptose und auch der Angiogenese. AP-1-Faktoren weisen sowohl onkogene, als auch anti-onkogene Wirkungen auf. Die Funktionen dieser Proteine betreffen somit zentrale Regulationsmechanismen, die bei einer Fehlregulation in einer Karzinogenese enden können (van Dam und Castelazzi 2001, Shaulian und Karin 2001, Eferl und Wagner 2003).

1.2.1 Die Jun-Familie

Die Jun-Familie umfasst c-Jun, JunD sowie JunB. Es handelt sich dabei um nukleäre Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 35 und 48 kDa (Maki et al. 1987, Vogt 2002).

Im Folgenden werden die einzelnen Proteine mit ihrer Regulation und Funktion näher dargestellt.

1.2.1.1 *c-Jun und pc-Jun*

Das zelluläre c-Jun wurde im Jahre 1988 im Labor von Tom Curran entdeckt. Das Protein besitzt eine molekulare Masse von 39 kDa und war zuvor bereits als „Fos-binding-protein“ p39 bekannt. Es ist das zelluläre Homolog zu dem viralen, onkogenen v-Jun des „Avian Sarcoma Virus 17“ (Maki et al. 1987, Rauscher et al. 1988).

C-Jun wird auf vielfältige Weise reguliert. Zum einen kann c-Jun durch eine c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) an seinen Serin-Resten Ser63/Ser73 phosphoryliert werden. Die phosphorylierte Form pc-Jun ist stabiler und besitzt eine höhere Transkriptionsaktivität. Die Aktivität der JNK kann ihrerseits ebenso reguliert werden. Näheres dazu wird im Kapitel 1.2.3 beschrieben (Hibi et al. 1993, Dérijard et al. 1994, Karin 1995, Qin et al. 2006).

Externe Stimuli, wie UV-Strahlung, aber auch Zytokine, wie TNF α oder TGF β , können zu einer Aktivierung von c-Jun führen. Eine Überexpression des Onkogen Ras führt in NIH3T3-Zellen zu erhöhten c-Jun-Proteinlevel sowie zu einer erhöhten DNA-Bindungsaktivität der AP-1-Komplexe. Dies lässt den Schluss zu, dass c-Jun möglicherweise durch Ras induziert werden kann und somit eine Rolle in der malignen Transformation spielt. Darüber hinaus kann c-Jun durch eine Autoregulation seine eigene Transkription erhöhen (Angel et al. 1988, Devary et al. 1991, Mechta et al. 1997).

C-Jun spielt u.a. eine Rolle in der Regulierung des Zellzyklus, der Apoptose und der Angiogenese. So zeigt das Protein in zahlreichen Untersuchungen eine proliferative Wirkung. Mausembryofibroblasten mit einem c-Jun⁻/c-Jun⁻-Knock-out weisen starke Proliferationsdefekte auf. c-Jun⁻/c-Jun⁻-Knock-out-Mausembryonen versterben intrauterin aufgrund einer gestörten Leberentwicklung (Johnson et al. 1993).

Der zuvor genannten Eigenschaft c-Juns liegt unter anderem seine Möglichkeit zur direkten Repression von p53 zugrunde. C-Jun-defiziente Mäuse zeigen erhöhte p53-Transkriptionsraten. Desweiteren kann c-Jun auch indirekt die Transkriptionsaktivität von p53 herabsetzen. Es inhibiert die Aktivierung von p21^{Cip1} durch den Transkriptionsfaktor p53. P21^{Cip1} ist ein CDK-Inhibitor und spielt somit eine entscheidende Rolle bei der antiproliferativen Wirkung von p53. C-Jun-defiziente Fibroblasten zeigen erniedrigte CDK-Aktivitäten in der G1-Phase des Zellzyklus. Darüber hinaus sind die p53-Levels sowie die p21^{Cip1}-Levels erhöht. Über eine Induktion der p19^{ARF}-Expression kann c-Jun ebenso auf die p53-Expression einwirken.

P19^{ARF} ist einer der Hauptregulatoren von p53 (Schreiber et al. 1999, Shaulian et al. 2000, Sreeramaneni et al. 2005).

Ein c-Jun⁻/c-Jun⁻-Knock-out in Mausembryofibroblasten hat Auswirkungen auf die Expression von Cyclin D1. Die Fibroblasten haben niedrigere Cyclin D1-Level. C-Jun kann also auch durch eine Induktion der Cyclin D1-Transkription die Proliferation positiv beeinflussen (Wisdom et al. 1999).

C-Jun ist ebenso in die Regulation der Apoptose involviert. Dabei kann der Transkriptionsfaktor die Apoptose induzieren, sie aber auch in bestimmten Fällen verhindern. Die Funktion von c-Jun scheint hierbei je nach Zelltyp und Ursache für die Aktivierung der Apoptose zu variieren. Wie zuvor bereits beschrieben, kann c-Jun mit p53 einen wichtigen Apoptoseinduktor inhibieren. Andererseits kann c-Jun durch eine Induktion der Transkription des Fas-Liganden die Einleitung der Apoptose positiv beeinflussen. So gehen c-Jun-defiziente Fibroblasten nach einer Behandlung mit UV-Strahlung oder mit Methylmalonsäure- einem potenten Apoptoseinduktor in Wildtyp-Zellen- nicht in Apoptose (Karin 1998, Schreiber et al. 1999, Shaulian et al. 2000, Kolbus et al. 2000, Shaulian und Karin 2001).

Andere Studien zeigten allerdings, dass c-Jun in seiner phosphorylierten Form Zellen vor der UV-induzierten Apoptose schützen kann. Laut Wisdom et al. könnte diese antiapoptotische Wirkung über den Faktor NF-κB vermittelt sein. NF-κB wiederum kann die TNF-induzierte Apoptose verhindern. Die Zellen dieser Studien stammten dabei meist aus Tumoren und könnten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit p53-Mutationen aufweisen. P53 ist ebenfalls ein Regulator der Fas-Expression und wird somit möglicherweise auch für die c-Jun-induzierte Apoptose benötigt. Diese These wird von der Tatsache, dass p53⁻/p53⁻-Zellen resistent gegen eine c-Jun-induzierte Apoptose sind, untermauert. Ein weiterer Hinweis für eine antiapoptotische Funktion c-Juns ist eine massiv hohe Apoptoserate, die in Hepatozyten von c-Jun⁻/c-Jun⁻-Knock-out-Mäusen beobachtet werden konnte (Wisdom et al. 1999, Eferl et al. 1999, Shaulian et al. 2000, Shaulian und Karin 2001).

In einem Zellkulturmodell konnte weiterhin eine proangiogenetische Funktion c-Juns nachgewiesen werden (Toft et al. 2001).

Innerhalb der malignen Transformation durch Onkogene, wie v-ras, scheint c-Jun ebenso eine Rolle zu spielen. Zum einen kann das Onkogen Ras die c-Jun-Aktivität erhöhen. Zum anderen ist eine v-ras-abhängige Transformation von c-Jun abhängig. So

konnte diese Transformation in Mäusen durch einen c-Jun-Knockout verhindert werden. Epithelzellen der Mamma zeigen einen Verlust der Zellpolarität bei c-Jun-Überexpression (Schütte et al. 1989, Angel und Karin 1991, Fialka et al. 1996, Mechta et al. 1997).

Fibroblasten, bei denen die Serinreste im c-Jun durch Alanin ersetzt wurden und somit eine Phosphorylierung durch die JNK unterbunden wurde, weisen Zellproliferationsdefekte auf. Diese sind allerdings geringer, als bei Zellen mit einem c-Jun⁻/c-Jun⁻-Knock-out. Die JNK-abhängige Phosphorylierung scheint auch bei der Induktion der Apoptose eine Rolle zu spielen. Neuronen von c-Jun^{Ala63/73}-Mäusen zeigen eine Resistenz gegenüber der eigentlich zytotoxischen Kainsäure. In einem Zellkulturmodell weisen Neuronen mit selbigem Defekt bei NGF-Entzug (nerve growth factor) eine wesentlich niedrigere Apoptoserate auf, als Neuronen ohne c-Jun-Defekt. In einem Mausmodell konnte diese Verhinderung der c-Jun-Phosphorylierung die Tumorzahl und die Tumorgroße von Colonkarzinomen vermindern. Gleichzeitig wurde die Überlebenszeit verlängert (Behrens et al. 1999, Le-Niculesco et al. 1999, Nateri et al. 2005).

1.2.1.2 *JunB*

Das Protein JunB wurde erstmalig von Ryder et al. im Jahre 1988 entdeckt und hat ein Molekulargewicht von etwa 42 kDa (Ryder et al. 1988).

Es konnte eine Regulation JunBs durch die JNK nachgewiesen werden. JunB wird an seinen Thr 102/104-Resten phosphoryliert und somit in seiner Aktivität gesteigert. Darüber hinaus kann JunB durch CDK1-Cyclin B phosphoryliert werden. Diese posttranslationale Regulation initiiert eine Degradation des Proteins (Li et al. 1999, Bakiri et al. 2000, Yazgan und Pfarr 2002).

Bereits 1989 zeigten Chiu et al., dass JunB in vielfältiger Weise gegenteilige Funktionen zu c-Jun einnimmt. Im Gegensatz zu c-Jun hemmt JunB die Transkription von Cyclin D1 und somit auch den Zellzyklus. JunB⁻/JunB⁻-Embryofibroblasten weisen anders als c-Jun⁻/c-Jun⁻-Knock-out-Zellen eine normale Proliferationsgeschwindigkeit auf. Desweiteren induziert JunB die Transkription von p16^{INK4a}. Dieses Protein hemmt wiederum CDK 4 und kann auf diese Weise den Übergang von der G1- in die S-Phase blockieren (Chiu et al. 1989, Bakiri et al. 2000, Passegué et al. 2000).

JunB zeigt antionkogene Eigenschaften in NIH3T3-Fibroblasten. Bei einer JunB-Überexpression konnte eine Hemmung der Transformation durch die Onkogene Ras oder die Tyrosinkinase Src gezeigt werden (Passegué und Wagner 2000).

In Abwesenheit von c-Jun kann JunB den Zellzyklus auch auf positive Weise regulieren. Zellproliferationsdefekte aufgrund eines c-Jun-Knockouts traten bei einem Ersetzen des Proteins durch JunB nicht mehr auf. JunB kann Cyclin A regulieren, was möglicherweise seine proliferative Wirkung erklärt. In einigen malignen Erkrankungen, wie beispielsweise dem Hodgkin-Lymphom, konnte eine JunB-Überexpression nachgewiesen werden. Die proliferativen Funktionen von JunB scheinen also zum einen Zelltyp-spezifisch und zum anderen abhängig von anderen Proteinexpressionslevels zu sein (Passegué et al. 2002, Andrecht et al. 2002, Mathas et al. 2002, Rassidakis et al. 2005).

Indirekt hat JunB einen Einfluss auf p53 und kann folglich die Einleitung des Zellzyklusarrestes steuern. Dies geschieht über eine Erhöhung der Dmp1-Expression, die wiederum eine Erhöhung der p19^{ARF}-Expression nach sich zieht. Wie bereits zuvor erwähnt, ist p19^{ARF} einer der Hauptregulatoren von p53 (Sreeramaneni et al. 2005).

Mausembryonen mit einem vollständigen JunB-Knock-out versterben intrauterin. Dieser frühen embryonalen Letalität liegt eine Störung in dem Aufbau von vaskulären Verbindungen zur maternalen Placenta zugrunde (Schorpp-Kistner et al. 1999).

Ebenso wie c-Jun, hat JunB in einem Zellkulturmodell eines Fibrosarkoms die Angiogenese durch Aktivierung des proangiogenetischen Faktors Proliferin induziert (Toft et al. 2001).

Welche Rolle JunB in der Einleitung der Apoptose spielt wird derzeit kontrovers diskutiert (Shaulian 2010).

1.2.1.3 *JunD*

Ryder et al. konnten im Jahre 1989 mit JunD ein weiteres Jun-Protein nachweisen (Ryder et al. 1989, Hirai et al. 1989).

Es sind zwei JunD-Isoformen bekannt. Zum einen das 39 kDa schwere JunD und zum anderen das N-terminal um 43 Aminosäuren kürzere 34 kDa schwere Δ JunD. Δ JunD entsteht durch eine Translation an einem alternativen Startcodon (Short und Pfarr 2002).

Die Regulation der JunD-Aktivität geschieht posttranslational durch eine Phosphorylierung mit Hilfe der JNK an den Ser 90/ Ser 100- Resten. JunD kann aber auch durch weitere MAP-Kinasen C-terminal phosphoryliert und somit in seiner Aktivität gesteigert werden. Darüber hinaus kann JunD transphosphoryliert werden. Dies geschieht durch eine Proteinbindung, beispielsweise an c-Jun oder ATF α , das wiederum eine Bindung zur JNK eingeht und die Phosphatgruppe überträgt. Δ JunD kann ebenfalls phosphoryliert werden. Dies erfolgt allerdings mit einer deutlich geringeren Affinität zu den Proteinkinasen und erklärt damit die geringere transkriptionelle Aktivität dieser Isoform (Fuchs et al. 1997, De Graeve et al. 1999, Yazgan und Pfarr 2002, Vinciguerra et al. 2004).

JunD kann durch den Tumorsuppressor Menin in seiner Aktivität gehemmt werden. Menin verhindert dabei die Phosphorylierung JunDs durch die MAPK oder die JNK. Eine Runterregulation von MEN1 führt zu einer erhöhten JunD-Aktivität in Osteoblasten und durch einen sogenannten „autoregulatory loop“ auch zu erhöhten JunD-Levels (Gallo et al. 2002, Agrawal et al. 2003, Naito et al. 2005).

Die Funktionen von JunD werden zurzeit noch weitaus weniger verstanden, als die der anderen Jun-Proteine. JunD kann den Zellzyklus auf positive und negative Weise regulieren. Welche Funktion JunD einnimmt, hängt von dem zellulären Kontext und seinen Dimerisierungspartnern ab (Hernandez et al. 2008).

JunD kann durch proliferative Wirkungen als Onkogen fungieren. Bei einer o.g. JunD-Suppression durch Menin konnte eine Reduktion neoplastischen Wachstums beobachtet werden. JunD⁻/JunD⁻ -Embryofibroblasten von Mäusen weisen Proliferationsdefekte auf. Innerhalb dieser JunD⁻/JunD⁻ -Zellen ist die p19^{ARF}-Expression erhöht. Wie zuvor bereits erwähnt, ist p19^{ARF} ein wichtiger Regulator von p53, dessen Induktion in einen Zellzyklusarrest mündet. JunD scheint also das Eintreten in den Zellzyklusarrest hemmen zu können (Pfarr et al. 1994, Agarwal et al. 1999, Weitzmann et al. 2000, Agarwal et al. 2003).

JunD hat ebenso antiproliferative und folglich auch antionkogene Wirkungen. Bei einer Überexpression von JunD konnte eine langsamere Proliferation und ein vermehrtes Eintreten von Fibroblasten in die G0-Phase beobachtet werden. Günthert et al. konnten diese Effekte nach einer Aktivierung von JunD durch einen LHRH-Agonisten zusätzlich in Ovarialkarzinomzelllinien nachweisen (Pfarr et al. 1994, Weitzman et al. 2000, Günthert et al. 2002).

Neyns et al. konnten zeigen, dass JunD in epithelialen Ovarialkarzinomen im Vergleich zu normalem Ovarialepithel signifikant häufiger unterexprimiert war. Zudem konnten sie beobachten, dass eine Runterregulation von JunD zu einer unkontrollierten Zellproliferation führte. Dies stützt die These einer antionkogenen Wirkung JunDs in Ovarialkarzinomen. Darüber hinaus kann JunD die transformierende Wirkung des Proto-Onkogens Ras abmildern. Eine Überexpression von JunD führte zu einer Verminderung des Ras-induzierten Tumorwachstums (Pfarr et al. 1994, Neyns et al. 1996).

JunD kann Zellen vor der durch UV-Bestrahlung oder durch Wasserstoffperoxid induzierten Apoptose bewahren. Diesem Mechanismus liegt möglicherweise die Fähigkeit von JunD zu Grunde, die Zellen durch eine verminderte Entstehung von Sauerstoffradikalen vor oxidativem Stress zu schützen (Gerald et al. 2004, Zhou et al. 2007).

Darüber hinaus reguliert JunD, wie die übrigen Jun-Proteine, die Angiogenese. Im Gegensatz zu c-Jun und JunB hemmt JunD diese. Das geschieht vermutlich über eine Hemmung des HIF1 α (Hypoxia Inducible Factor α), der über eine Induktion von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) die Angiogenese initiieren kann. JunD⁻/JunD⁻-Knock-out-Zellen weisen geringere HIF-Prolylhydroxylase-Aktivitäten auf. Diese Hydroxylase würde eigentlich HIF1 α degradieren. Somit sind in JunD-defizienten Zellen höhere HIF1 α -Levels vorhanden, die, wie zuvor erwähnt, eine Angiogenese induzieren (Gerald et al. 2004, Hilfiker-Kleiner et al. 2005).

1.2.2 Die c-Jun-N-terminalen Kinasen

Die c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK), auch Stress-activated Phosphokinasen (SAPK) genannt, sind Serin/Threonin-Proteinkinasen und gehören zur Familie der MAP-Kinasen (Chang und Karin 2001, Bogoyevitch 2006b).

Es sind drei unterschiedliche Genloci, die für JNK1, JNK2 und JNK3 kodieren, bekannt. Durch alternatives Splicen entstehen aus der JNK1 und der JNK2 jeweils vier weitere Isoformen. Zwei Splicevarianten können aus der JNK3 entstehen. Das spezifische Gewicht der einzelnen Isoformen liegt zwischen 46 kDa und 55 kDa. Es konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen JNK-Splicevarianten unterschiedliche Funktionen innehaben. (Hibi et al. 1993, Gupta et al. 1996, Bogoyevitch 2006a).

Die JNK1 und die JNK2 kommen ubiquitär in Säugetieren vor. Die JNK3 hingegen findet sich vor allem in ZNS-Gewebe, Herzmuskelgewebe und in Hodengewebe (Yang et al. 1997, Chen et al. 2009).

In den folgenden Abschnitten wird nicht zwischen den jeweiligen Isoformen der c-Jun-N-terminalen Kinasen unterschieden.

Die Aktivierung der JNK erfolgt durch doppelte Phosphorylierung am Thr/Pro/Tyr-Motiv mit Hilfe der MAP-Kinasen MKK4 und MKK7. Externe Stimuli, wie eine Exposition von Zellen gegenüber proinflammatorischen Zytokinen ($\text{TNF}\alpha$, IL-1), Lipopolysacchariden, UV- oder ionisierender Strahlung, Hitze sowie einem osmotischen Schock, führen zu einer Aktivierung des JNK-Signalwegs (Dérjard et al. 1994, Davis 2000, Dong et al. 2002, Morton et al. 2003, Vivas-Mejia et al. 2010).

Auch Infektionen mit Bakterien, Parasiten, Pilzen, Prionen oder Viren haben eine JNK-Aktivierung zur Folge. Zelluläre Prozesse, wie eine Fehlfaltung von Proteinen, können ebenso zu einer Aktivierung führen (Bachar 2004, Wellen und Hotamisligil 2005, Qin et al. 2006).

Die JNK phosphoryliert ihre Substrate an den spezifischen Serin- oder Threoninresten und führt auf diese Weise zu einer Aktivitätserhöhung oder –minderung derselbigen. Darüber hinaus kann die JNK auch direkte Proteinbindungen eingehen und so die Aktivität des Proteins verändern oder gar andere Funktionen ausüben (Bogoyevitch 2006b).

Bisher konnten bereits mehr als 50 JNK-Substrate nachgewiesen werden. Dazu gehören die Mitglieder der Jun-Familie: c-Jun, JunD und JunB. Die JNK phosphoryliert aber auch andere nukleäre Transkriptionsfaktoren wie JDP2, ATF2, p53, Elk-1 und viele weitere. Darüber hinaus kann die JNK nukleäre Rezeptoren phosphorylieren. Als Beispiele hierfür sind der Glucocorticoidrezeptor, der Retinsäurerezeptor oder auch der Androgenrezeptor zu nennen (Dérjard et al. 1994, Gupta et al. 1995, Li et al. 1999, Buschmann et al. 2001, Katz et al. 2001, Yang et al. 2002, Yazgan und Pfarr 2002, Bruna et al. 2003, Morton et al. 2003, Srinivas et al. 2005, Gioeli et al. 2006).

Zu den Substraten der JNK gehören ebenso extranukleäre Proteine. Hier seien unter anderem die mitochondrialen Bcl2- Proteine, wie Bax, genannt. Darüber hinaus ist das zytosolische Phosphoprotein-bindende Protein 14-3-3, das eine große Rolle innerhalb der Transferbewegungen zwischen den einzelnen Kompartimenten einer Zelle spielt, JNK-Substrat. Aber auch andere Proteinkinasen, wie die Akt oder Regulatoren der

Zellbewegung, wie die Microtubuli-assoziierten Proteine 1B und 2 sowie Tau, gehören zu den extranukleären Substraten (Deng et al. 2001, Chang et al. 2003, Tsuruta et al. 2004, Yoshida et al. 2004, Kim et al. 2006, Shao et al. 2006).

Die Funktionen der JNK sind aufgrund ihrer zahlreichen Substrate sehr vielfältig. Aufgrund der Thematik dieser Arbeit wird im Folgenden näher auf die Funktionen bezüglich der Jun-Proteine und der Funktionen, die potentiell eine Rolle in der Karzinogenese spielen könnten, eingegangen.

Die JNK phosphorylieren die Serin- oder Threonin-Reste der Transaktivierungsdomäne von c-Jun (Ser 63/73; Thr 91/93). Dies führt durch eine Hemmung eines an die Histone-Deacetylase 3 gekoppelten Inhibitionskomplexes zu einer c-Jun-Aktivitätserhöhung (Weiss et al. 2003).

Im Falle von JunB erfolgt eine Phosphorylierung an den Thr 102/104-Resten, die zu einer Erhöhung der JunB-Aktivität führt (Li et al. 1999, Yazgan und Pfarr 2002).

Yazgan und Pfarr konnten nachweisen, dass JunD und Δ JunD eine JNK-bindende Domäne aufweisen und direkt durch die JNK phosphoryliert werden können. Außerdem können beide Proteine durch Transphosphorylierung mit Hilfe einer Bindung an c-Jun oder ATF α aktiviert werden. Eine Phosphorylierung von JunD führt ebenso wie bei c-Jun und JunB zu einer Aktivitätserhöhung (De Graeve et al. 1999, Chang und Karin 2001, Yazgan und Pfarr 2002).

Die JNK scheint eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose zu spielen. Durch eine Aktivierung und Stabilisierung von p53 und c-Jun, wirken die JNK indirekt proapoptotisch. Durch eine JNK-abhängige Phosphorylierung von 14-3-3 kommt es zu einer Dissoziation der Bindung zwischen 14-3-3 und dem proapoptotischen Protein Bax. Bax wird daraufhin in das Mitochondrium transloziert und führt dort zur Initiierung der Apoptose. Somit wirkt die JNK auch über diesen Signalweg proapoptotisch. Eine Untersuchung der Wirkung der JNK auf isolierte Mitochondrien zeigte, dass die JNK eine Cytochrom C-Freisetzung induzieren kann (Le-Niculescu et al. 1999, Buschmann et al. 2001, Aoki et al. 2002, Tsuruta et al. 2004).

JNK konnte ein proliferativer Effekt nachgewiesen werden. So kann ein Silencing der JNK-1 mit Hilfe der entsprechenden siRNA ein weiteres Tumorstadium in embryonalen Rhabdomyosarkomzellen vermindern. Hui et al. konnten weiterhin anhand eines Mausmodells zeigen, dass eine gezielte Zerstörung des JNK-1-Genlocus die Anzahl und die Größe Diethylnitrosamin-induzierter HCC (hepatozellulärer Karzinome)

verringert. Eine Untersuchung von Gewebeproben aus HCC zeigte obendrein, dass HCC mit einer hohen JNK-1-Expression größere Tumoren bilden und eine signifikant schlechtere Prognose aufweisen (Hui et al. 2008, Chang et al. 2009a, Chang et al. 2009b, Durbin et al. 2009).

Die Bindung einer inaktiven JNK führt bei zahlreichen JNK-Transkriptionsfaktorsubstraten zu einer Proteindegradation. Als Beispiele seien hier die Ubiquitinierung von c-Jun, JunB und ATF2 genannt, die einer Bindung einer inaktiven JNK folgt (Fuchs et al. 1997).

Die Funktionen der JNK beinhalten auch die Regulation der Zellbewegung. So kann die JNK durch eine Phosphorylierung von Tau den Zusammenbau filamentärer Strukturen innerhalb der Zelle inhibieren (Bogoyevitch und Kobe 2006b).

Die JNK nimmt indirekten Einfluss auf die Regulation der DNA-Reparaturmechanismen durch eine Transaktivierung der DNA-Reparaturgene. So führt eine c-Jun- und eine ATF2-Phosphorylierung zu einer Hochregulation einer großen Gruppe DNA-reparierender Gene (Hayakawa et al. 2003).

Die o.g. Funktionen lassen bereits vermuten, dass die JNK in der Karzinogenese eine Rolle spielen könnten. Neuere Untersuchungen zu Krebsstammzellen (cancer stem cells, CSC) legen den Verdacht nahe, dass die JNK eine Rolle in der Entstehung dieser Tumor-induzierenden Zellen spielen könnte. Eine Vielzahl der für die CSC entscheidenden Gene sind in HCC mit einer erhöhten JNK-1-Aktivität überexprimiert (Hui et al. 2008, Chang et al. 2009b).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Jun-Proteine sowie die JNK spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation von Zellzyklus und Apoptose. Eine Fehlregulation dieser zentralen Mechanismen kann in einer Karzinogenese münden.

Das gynäkologische Forschungslabor des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf beschäftigt sich unter anderem mit der Suche nach klinischen und molekularen Markern zur prognostischen und prädiktiven Klassifikation des Ovarialkarzinoms. Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Frau Dr. rer. nat. Milde-Langosch anhand eines kleineren Patientenkollektivs zeigten bereits, dass die Höhe der Jun-Expression sehr wahrscheinlich einen prognostischen Parameter für das Ovarialkarzinom darstellt. So fanden sich in malignen Ovarialkarzinomen signifikant erhöhte pc-Jun-, JunB- und JunD-Proteinexpressionen im Vergleich zu benignen Tumorentitäten.

Innerhalb dieser Arbeit soll nun die genaue prognostische Bedeutung der Jun-Proteine und der JNK für das Ovarialkarzinom differenziert werden. Zu diesem Zweck erfolgten Western-Blot-Analysen und immunhistochemische Untersuchungen an zwei voneinander unabhängigen umfangreichen Patientinnenkollektiven. Die Proteinexpressionsanalysen werden im Anschluss auf mögliche Korrelationen zu dem Gesamtüberleben und dem rezidivfreien Intervall der Patientinnen überprüft. Darüber hinaus erfolgen Untersuchungen bezüglich eines Zusammenhangs zu klinisch-pathologischen Markern, wie beispielsweise Tumorhistologie, Nodal- oder Metastasenstatus.

Diese neu gewonnenen Erkenntnisse über die Proteinexpression der Jun-Proteine sowie der JNK in Ovarialkarzinomen könnten möglicherweise zu einem besseren Verständnis ihrer Funktionen, insbesondere innerhalb der Karzinogenese, führen. Mit Hilfe dieses Wissens könnte die Eignung einzelner Jun-Proteine bzw. der JNK als potentielle therapeutische Targets besser beurteilt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientinnenkollektive

2.1.1.1 *Hamburger Kollektiv*

Innerhalb dieser Arbeit wurden insgesamt 173 Ovarialkarzinom-Tumorproben hinsichtlich der Expression der Jun-Proteine untersucht. Diese Proben entstammen alle aus Ovarialtumoren von Patientinnen, die im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (UKE) im Zeitraum zwischen 1994 und 2011 operiert worden sind. Dabei haben alle Patientinnen schriftlich ihr Einverständnis hinsichtlich der Weiterverwendung von Tumormaterial für Forschungszwecke erklärt. Während der Operation erfolgte eine Gewebeentnahme aus dem Tumor. Dieses Gewebe wurde zügig an das gynäkologische Forschungslabor des UKEs überbracht. Hier wurden die Tumorproben entsprechend zugeschnitten und in Kryoröhrchen zunächst in eine Stickstofftonne überführt. Ein Teil der Gewebe wurde in der Pathologie zugeschnitten und eingefroren. Nach der Proteinextraktion (s. Kapitel 2.2.1) wurden die extrahierten Proteinlysate bei -80°C gelagert.

Die Einschlusskriterien zur Zusammenstellung dieses Kollektivs waren zum einen, wie oben bereits genannt, eine schriftliche Einverständniserklärung für die Weiterverwendung des Gewebes. Desweiteren musste sichergestellt werden, dass das Gewebe nicht für eine weiterführende pathologische Diagnosestellung benötigt wird. Zu guter Letzt sollte die Menge des gewonnenen Gewebes für eine Proteinextraktion ausreichend sein.

Bei allen Patientinnen, deren Tumorproben in dieser Untersuchung verwendet wurden, wurden wichtige Informationen zum OP-Ergebnis, zu histologischen Befunden, zu Therapiekonzepten etc. gesammelt und in einer Datenbank zusammengetragen. Zusätzlich wurden bei allen Patientinnen in regelmäßigen Abständen im Zuge eines Follow-Ups Informationen zum Krankheitsverlauf eingeholt.

2.1.1.2 *Würzburger Kollektiv*

Mit Hilfe eines zweiten, unabhängigen Patientinnenkollektivs wurden weitere 65 Tumorproben auf die immunhistochemische Expression von JunD untersucht. Die

Präparate wurden ebenso innerhalb von Debulking-Operationen entnommen und stammen aus dem Zeitraum von 1990 bis 1997. In diesem Fall erfolgte die Fixierung der Präparate durch Formaldehyd vor einer Paraffineinbettung. Die Einschlusskriterien für die Verwendung innerhalb dieser Arbeit entsprachen denen des o.g. Hamburger Kollektivs. Wie bereits beim Hamburger Kollektiv wurden auch für dieses Kollektiv Daten bezüglich des weiteren Krankheitsverlauf und klinisch wichtiger Parameter in einer Datenbank zusammengetragen.

2.1.2 verwendete Materialien/Geräte

Tabelle 6: verwendete Materialien und Geräte für die Proteinextraktion

Material/ Gerät	Bezugsfirma
Alufolie	VWR
Homogenisator Precellys 24	Precellys
Micro packaging vials 2ml-Röhrchen	Peqlab Biotechnnologie
Precellys Ceramic Beads	Peqlab Biotechnnologie
diverse digitale Wecker	z.B. Carl Roth
diverse Glasartikel	z.B. Simax
diverse Hubkolbenpipetten	Eppendorf
diverse Multipetten	Eppendorf
diverse Plastikartikel	z.B. Eppendorf, Falcon, Greiner, etc.

Tabelle 7: verwendete Materialien und Geräte für die BCA-Proteinbestimmung

Material/ Gerät	Bezugsfirma
BioPhotometer	Eppendorf
Thermomixer compact	Eppendorf
Vortexer	Heidolph
diverse digitale Wecker	z.B. Carl Roth
diverse Glasartikel	z.B. Simax
diverse Hubkolbenpipetten	Eppendorf
diverse Multipetten	Eppendorf
diverse Plastikartikel	z.B. Eppendorf, Falcon, Greiner, etc.

Tabelle 8: verwendete Materialien und Geräte für die Immunhistochemie

Material/ Gerät	Bezugsfirma
Deckgläschen	Carl Roth
Fettstift	Dako
Feuchtkammer	
Kamera DFC 320	Leica
Mikroskop "Axioskop 40"	Zeiss
Mikrowelle MW 800	Continent
Objekträger Super Frost Plus	Glaswarenfabrik Karl Hecht

Material/ Gerät	Bezugsfirma
Objektträger-Schnelltrockner TD66	Medite Medizintechnik
Schlittenmikrotom	Leica
diverse Glasartikel	z.B. Simax
diverse Hubkolbenpipetten	Eppendorf
diverse Multipetten	Eppendorf
diverse Plastikartikel	z.B. Eppendorf, Falcon, Greiner, etc.

Tabelle 9: verwendete Materialien und Geräte für das Western Blotting

Material/ Gerät	Bezugsfirma
Centrifuge 5415D	Eppendorf
Einschweißgerät	Ciatronic
Electrophoresis Power Supply EPS-601	Amersham Pharmacia Biotech
Electrophoresis unit SE 600	Pharmacia biotech
GS-800 Calibrated Densitometer	BioRad
Heiz- und Rührplatte Ikamag RCT	Janke&Kunkel
Leuchtplatte	REX
PCR-Gerät DNA-Engine PTC-200	MJ-Research
pH-Elektrode SenTix	WTW
pH-Meter inolab	WTW
Röntgenkassetten 18x24cm	A. Hartenstein bzw. Philips
Rührplatte Ikamag Reo	Janke&Kunkel
Transpherunit+2 Cassettes	Amersham Bioscience
Vortexer	Heidolph
Vortexer VF2	Janke&Kunkel
diverse digitale Wecker	z.B. Carl Roth
diverse Hubkolbenpipetten	Eppendorf
diverse Multipetten	Eppendorf
diverse Plastikartikel	z.B. Eppendorf, Falcon, Greiner, etc.

2.1.3 verwendete Chemikalien

Tabelle 10: verwendete Chemikalien für die Proteinextraktion

Chemikalie	Bezugsfirma
Aqua (ad injectabilia)	Baxter Healthcare SA
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl)	Merck
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fluka Biochemika
Saccharose	Serva
Trizma-Base	Sigma-Aldrich

Tabelle 11: verwendete Chemikalien für die BCA-Proteinbestimmung

Chemikalie	Bezugsfirma
Aqua (ad injectabilia)	Baxter Healthcare SA
BCA-Protein-Assay-Kit	Thermo Scientific
Salzsäure (HCl)	Merck
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fluka Biochemika
Saccharose	Serva
Trizma-Base	Sigma-Aldrich

Tabelle 12: verwendete Chemikalien für die Immunhistochemie

Chemikalie	Bezugsfirma
Aqua destillata	-
Ethanol 100%	Merck
Mayers Hämalaunlösung	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Peroxidase Substrate Kit, DAB	Vector Laboratories
Salzsäure (HCl)	Merck
Titriplex III (EDTA)	Merck
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Trizma-Base	Sigma Aldrich
Vectastain ABC-Kit Elite	Vector Laboratories
Vitro Clud	Langenbrinck
Wasserstoffperoxid-Lösung H ₂ O ₂ 30%	Merck
Xylol	Merck

Tabelle 13: verwendete Chemikalien für das Western Blotting

Chemikalie	Bezugsfirma
Acrylamide/Bis-Acrylamide 40%	MP (North America)
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad
Aqua destillata	-
Blotting grade Blocker Nonfat dry Milk (Milchpulver)	BioRad
Blotting-Papier	Macherey-Nagel
Bromphenolblau	Merck
p-Cumarinsäure	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Ethanol	Walter CMP GmbH
Fuji Medical X-Ray-Film	Fuji
Glycerol	Merck
Glycin	Carl Roth
Immobilon P PVDF-Membran	Millipore
Isopropanol	Sigma Aldrich/ Carl Roth
Luminol	Sigma Aldrich
Methanol	Walter CMP GmbH
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Natronlauge (NaOH)	Merck

Chemikalie	Bezugsfirma
Salzsäure (HCl)	Merck
Saccharose	Serva
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva
Tricine	Carl Roth
Trizma-Base	Sigma Aldrich
Tween 20	Merck

2.1.3.1 Herstellung der verwendeten Puffer / Gele

Anodenpuffer-Stammlösung (10x)

2M Tris-HCl pH: 8,9

Gelpuffer (3x)

3M Tris-HCl pH: 8,45

0,3% SDS (vor Gebrauch hinzufügen)

pcsb1-Proteinpuffer

50mM Tris-HCl pH: 6,8

1% SDS

10% Saccharose

pcsb2-Gellade-Denaturierungspuffer

50mM Tris-HCl pH: 6,8

10% Saccharose

4% SDS

0,01%-0,02% Bromphenolblau

15% β -Mercaptoethanol

Aqua dest.

Transferpuffer-Stammlösung (10x)

1M Tris

1,93M Glycin

Tris-buffered-Saline-(TBS-)Stammlösung (10x)

0,2M Tris-HCl pH: 7,6

1,37M NaCl

TBST-Waschpuffer

0,05% Tween 20

zur verdünnten Stammlösung hinzufügen

TEC-Puffer

10mM Trinatriumcitrat Dihydrat

20 mM Tris

4,8% Titriplex® III (EDTA)

Kathodenpuffer-Stammlösung (10x)

1M Tris-HCl pH: 8,25

1M Tricine

Kathodenpuffer

1% SDS

zur verdünnten Stammlösung
hinzufügen

Trenngel (10%ig)

0,106% Glycin

33% Gelpuffer mit SDS (3x)

10% AA/Bis-AA

Aqua dest.

0,0005% TEMED

0,0005% APS

Sammelgel

25% Gelpuffer mit SDS (3x)

4,84% AA/Bis-AA

Aqua dest.

0,0012% TEMED

0,0012% APS

Elektrochemilumineszenz-Lösung 1

2mM Luminol

0,45mM p-Cumarinsäure

0,1M Tris-HCl pH: 8,5

DMSO

Aqua dest.

Elektrochemilumineszenz-Lösung 2

0,1M Tris-HCl pH: 8,5

0,0002% H₂O₂

2.1.4 verwendete Antikörper und Marker

Tabelle 14: verwendete Primärantikörper Western Blotting

Primärantikörper	Daten
c-Jun (H79) Verd.: 1:500	Cat.-Nr.: sc-1694 Spezies: rabbit polyclonal antibody Firma: Santa Cruz Biotechnology
Jun D (329) Verd.: 1:500	Cat.-Nr.: sc-74 Spezies: rabbit polyclonal antibody Firma: Santa Cruz Biotechnology
Jun B (210) Verd.: 1:200	Cat.-Nr.: sc-73 Spezies: rabbit polyclonal antibody Firma: Santa Cruz Biotechnology
Phospho-c-Jun (Ser 63)/ (54B3) Verd.: 1:250	Cat.-Nr.: 2361S Spezies: rabbit monoclonal antibody Firma: Cell Signaling Technology
JNK (FL) Verd.: 1:500	Cat.-Nr.: sc-571 Spezies: rabbit polyclonal antibody Firma: Santa Cruz Biotechnology
HSC-70 (B-6) Verd.: 1:50.000	Cat.-Nr.: sc-7298 Spezies: mouse monoclonal antibody Firma: Santa Cruz Biotechnology

Tabelle 15: verwendete Sekundärantikörper Western Blotting

Sekundärantikörper	Daten
goat anti-mouse Verd.: 1:8000	Cat.-Nr.: sc-2055 Spezies: goat IgG-HRP Firma: Santa Cruz Biotechnology
goat anti-rabbit Verd.: 1:8000	Cat.-Nr.: sc-2054 Spezies: goat IgG-HRP Firma: Santa Cruz Biotechnology

Tabelle 16: verwendeter Marker Western Blotting

Marker	Daten
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Cat.-Nr.: 26634 Firma: Thermo Scientific

Tabelle 17: verwendeter Primärantikörper Immunhistochemie

Primärantikörper	Daten
JunD (RabMAb) Verd.: 1:1500	Cat.-Nr.: 5226-S Spezies: rabbit monoclonal antibody Firma: Epitomics

Tabelle 18: verwendeter Sekundärantikörper Immunhistochemie

Sekundärantikörper	Daten
ABC-Kit Vectastain	Cat-Nr.: PK-6010 Spezies: goat anti-rabbit monoclonal antibody Firma: Vector Laboratories

2.2 Methoden

2.2.1 Proteinextraktion

Aus den Tumorproben müssen für eine Western-Blot-Analyse zuvor die Proteine extrahiert werden. Hierfür wurden zunächst Kryoschnitte von allen Tumorproben des Hamburger Kollektivs angefertigt. Diese wurden mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt und mikroskopisch beurteilt. Wenn der Anteil der Tumorzellen $\geq 70\%$ betrug, konnte die Proteinextraktion mit dem Gewebematerial vorgenommen werden. Bei kleineren Tumoranteilen wurde das Gewebe entsprechend zugeschnitten.

Zur Proteinextraktion wurde eine Probe von etwa 100 mg aus dem jeweiligen gefrorenem Tumorgewebe geschnitten. Die verwendeten Instrumente und Materialien waren dabei steril oder wurden zuvor autoklaviert. Nach jeder Tumorprobe erfolgte ein Wechsel der Materialien. Die zugeschnittene Probe wurde nun in ein 2 ml-Röhrchen (Micro packaging vials 2 ml-Röhrchen der Firma Peqlab Biotechnologie) überführt und mit 1 ml einer pscb1-Protease-Inhibitor-Lösung überdeckt. Hierfür wurde zuvor eine Verdünnung des Protease-Inhibitor-Cocktails der Firma Sigma-Aldrich Life Science im Verhältnis 1:10 mit dem pscb-1-Puffer (Herstellung s. Kapitel 2.1.3.1) hergestellt. Anschließend wurden Keramikkügelchen in das Röhrchen gefüllt. Es folgte eine 2x 20-sekündige Homogenisation im Homogenisator der Firma Precellys. Die Proben wurden nun für 5 min bei 13000 rpm und einer Temperatur von $+7^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Dabei entstand unterhalb einer Fettphase ein Überstand, der im nächsten Schritt abpipettiert und in ein 1,5 ml-Low-Binding-Reaktionsgefäß überführt wurde. Die fertig extrahierten Tumorproben konnten nun bei -80°C kryokonserviert werden.

2.2.2 BCA-Proteinbestimmung

Bei der BCA-Proteinbestimmung handelt es sich um eine Biuret-Reaktion zum Nachweis von Proteinmengen innerhalb einer Probe. Durch die Proteine in der zu untersuchenden Probe kommt es zu einer Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen. Diese einwertigen Ionen können nun im alkalischen Milieu einen Komplex mit dem Reagenz Bicinchoninsäure (BCA) eingehen. Auf diese Weise kommt es zu einer Farbreaktion, deren Intensität proportional zum jeweiligen Proteingehalt der Probe ist. Eine photometrische Messung des Farbgehalts der Probe erlaubt somit eine Aussage über ihren quantitativen Proteingehalt. Zuvor ist allerdings eine Kalibrierung des Photometers erforderlich. Hierfür wird eine Eichkurve mit Hilfe von Proben, deren Proteingehalt bereits bekannt ist, erstellt.

Jede Proteinbestimmung erfolgte im Doppelansatz. Wichen die beiden ermittelten Proteingehalte der jeweiligen Probe nicht mehr als 10% voneinander ab, so wurde das Ergebnis als valide angesehen. Bei größeren Abweichungen erfolgte eine erneute Bestimmung.

Die zu messende Tumorproteinprobe wurde langsam aufgetaut und zum Schutz vor einer Degradation auf Eis gelagert. Nach dem Auftauen wurden jeweils 25 μl des Proteinextraktes mit 100 μl Trispuffer (50 mM; pH= 6,8) versetzt und auf dem Vortexer gut vermischt. Zusätzlich wurde ein Leerwert angesetzt. Hierfür wurde anstatt des Proteinextraktes 25 μl pscb1-Puffer verwendet. Aus den verdünnten Proteingemischen wurden für den Doppelansatz zweimal jeweils 50 μl in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß pipettiert. Für den Leerwert erfolgte selbiges. Anschließend wurden in jedes Eppendorfgefäß 1 ml der Arbeitslösung hinzugegeben. Diese setzt sich aus Lösung A und Lösung B des BCA-Kits der Firma Thermo Scientific zusammen. Das Mischungsverhältnis entspricht 50:1 (z.B. 20 ml Lösung A + 400 μl Lösung B). Nach einem weiteren gründlichen Mischen auf dem Vortexer folgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Proben nach der Inkubation auf Eis gelagert. Mit Hilfe des Leerwertes erfolgte die Nullwerteinstellung am Photometer. Anschließend wurde der Farbumschlag bei 562 nm gemessen. Mit Hilfe einer zuvor erstellten Eichkurve konnte die Proteinmenge jedes Proteinlysates ermittelt werden. Für die weitere Western Blot-Analyse wurde nun berechnet, welches Probenvolumen einer Proteinmenge von 20 μg entspricht.

2.2.3 Western Blot-Verfahren

2.2.3.1 SDS-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und zum quantitativen Nachweis der Proteinmenge der Jun-Proteine in den jeweiligen Tumorgeweben wurde das Western-Blot-Verfahren verwendet. Hierbei wurden die Proteine zunächst mittels einer SDS-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Molekulargrößen aufgetrennt. Die verwendete Methodik entspricht weitestgehend dem Lämmli-System und wurde lediglich in einigen Punkten modifiziert. Innerhalb dieses Verfahrens wird Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) zum Kathodenpuffer, zum Trenngel und zum Gellade-Denaturierungspuffer (pcsb2) hinzugegeben. Das SDS bildet negative Komplexe mit den in den Tumorproben enthaltenen Proteinen. Diese negative Ladung garantiert eine Wanderung der SDS-Proteinkomplexe zum positiven Pol (Anode), unabhängig von der zuvor bestehenden Proteinladung.

Die *Vorbereitungen für die Elektrophorese* beinhalteten zunächst den Aufbau der Elektrophoreseapparatur gemäß Herstellerangaben. Es folgte die Zubereitung des 10%igen Trenngels gemäß der in Kapitel 2.1.3.1 genannten Rezeptur. Durch eine Zugabe von Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumperoxidsulfat (APS) konnte die Polymerisation aktiviert werden. Nachdem das Trenngel zügig in beide Glaskammern gegossen wurde, erfolgte eine Überschichtung mit Isopropanol zur Beseitigung kleiner Unebenheiten auf der Geloberfläche. Darüber hinaus schützte die Isopropanolschicht vor Austrocknung während der 45-minütigen Polymerisationszeit.

Während der Aushärtung des Trenngels konnte mit der *Vorbereitung der extrahierten Tumorproben* begonnen werden. Dabei mussten die empfindlichen Proben durch eine Lagerung auf Eis vor einer Degradation geschützt werden. Für jede Tumorprobe sollte ein Proteingehalt von 20 µg eingesetzt werden. In ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß wurde daher das benötigte Tumorprobenvolumen pipettiert. Mit dem pcsb-1-Puffer wurde bis auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt. Falls der Proteineinsatz von 20 µg ein Volumen von > 25 µl erforderte, so wurde das Endvolumen auf insgesamt 45 µl erhöht.

Die erste und letzte Tasche eines jeden Gels dienten als Leertaschen und wurden jeweils mit 25 µl pcsb1-Puffer gefüllt. Geerntete Zelllysate aus der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB231 und der Ovarialkarzinom-Zelllinie Ovarcar8 fungierten als Positivkontrollen und wurden daher ebenso mit einem Proteingehalt von 20 µg auf jedem Gel aufgetragen. Als Proteinmarker wurde der Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder der Firma Thermo Scientific verwendet. Dieser Proteinmarker

zeigt durch verschiedenfarbige Banden an, auf welcher Höhe sich Proteine unterschiedlicher Molekülmassen nach der Elektrophorese befinden. Auf diese Weise kann die Höhe der spezifischen Antikörperbande durch den Vergleich mit der Höhe der farbigen Banden des Markers identifiziert werden.

Nach dem Vorpipettieren aller Proben wurde in jedes Reaktionsgefäß 25 µl (bzw. 45 µl bei größeren Proteinvolumina) pcsb-2-Gellade-Denaturierungspuffer hinzugefügt. Dieser Puffer enthält zum einen SDS und zum anderen β-Mercaptoethanol, welches die folgende Denaturierung der Probenproteine durch eine Reduktion von Disulfidbrücken zu freien Thiolen unterstützt. Zusätzlich enthält der pcsb-2-Puffer Saccharose, die durch ihre Dichte von $\rho=1,57 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ dessen Masse erhöht. Auf diese Weise sinken die Proben beim Pipettieren in die vorhergesehenen Sammelgeltaschen. Das zum Puffer dazugegebene Bromphenolblau dient lediglich einer Sichtbarmachung der Probe sowie der Lauffront und vereinfacht somit ebenfalls die Beladung der Geltaschen.

Es erfolgte ein gutes Durchmischen der Proben auf dem Vortexer und eine Zentrifugation für eine Minute bei 13000 rpm. In einem Thermocycler wurden alle Proben für 5 min auf 99°C erhitzt und somit denaturiert. Die Auftrennung der Proteine in der Gelelektrophorese ist nun größtenteils von ihrer Molekulargröße abhängig. Anschließend werden die Proben bei maximal +4°C gekühlt gelagert.

Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels konnte die Isopropanolschicht abgegossen werden. Zwei Kämme mit jeweils 20 Zähnen von je 1,5 mm Dicke wurden zwischen die Glasplatten der Elektrophoresekammer eingesteckt, um so die späteren Geltaschen auszusparen. Die *Herstellung des Sammelgels* erfolgte nach der in Kapitel 2.1.3.1 genannten Rezeptur. Die Sammelgel-Lösung wurde ebenfalls mit TEMED und APS aktiviert und auf das Trenngel in die beiden Glaskammern gegossen. Das Sammelgel sollte 30 min auspolymerisieren. Die Kämme konnten entfernt werden. Eine zweimalige Spülung der Taschen mit Aqua dest. entfernte letzte Gelreste aus dem Tascheninneren. Auf die Gelelektrophoresekammer mit den fertigen gegossenen Gelen konnte nun die Kathodenkammer aufgesetzt werden. In die Kathodenkammer wurde ca. 400 ml 1x Kathodenpuffer (Herstellung s. Kapitel 2.1.3.1) eingefüllt, sodass alle Taschen mit dem Puffer gefüllt waren.

Die vorbereiteten Proben wurden nach einer letzten 30-sekündigen Zentrifugation (13000 rpm) in die Taschen des Sammelgels einpipettiert. Die Kathodenkammer wurde vorsichtig mit dem restlichen Kathodenpuffer aufgefüllt. Anschließend konnte die

Gelelektrophoresapparatur in die dazugehörige Anodenkammer, die zuvor mit Anodenpuffer gefüllt wurde, eingesetzt werden. Die Elektrophorese lief im Mittel 18 Stunden bei 55 mV und 400 mA.

2.2.3.2 Proteinblotting

Am jeweiligen Folgetag wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinyltransfermembran (Immobilon P der Firma Millipore) geblottet. Bei diesem Verfahren werden die Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes aus dem Gel gelöst und können durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Membran haften. Innerhalb dieses Vorgangs bleibt das zuvor durch elektrophoretische Auftrennung entstandene Proteinmuster erhalten. Die PVDF-Membran ist nun ein geeignetes Medium, um einzelne Proteine qualitativ und quantitativ nachzuweisen. Dieser Nachweis erfolgte hier durch Protein-spezifische Antikörper und wird in Kapitel 2.2.3.3 näher erläutert.

Die Vorbereitung des Proteinblottings beinhaltete den Zuschnitt der PVDF-Membran auf die richtige Größe (ca. 9 cm x 14 cm) sowie die Herstellung des Transferpuffers (Herstellung s. Kapitel 2.1.3.1). Die empfindliche Membran durfte bei den folgenden Arbeitsschritten ausschließlich am Rand und mit sorgfältig gespülten Edelstahlpinzetten berührt werden.

Zu Beginn des Proteinblottings erfolgte die Entnahme der Gelelektrophoresekammer aus der Anodenkammer. Die Gele wurden jeweils aus den Glaskammern herausgelöst, entsprechend der o.g. Größe zugeschnitten. Die PVDF-Membranen wurden durch ein etwa 2-minütiges Schwenken in Methanol und anschließendes etwa 3-minütiges Waschen in Aqua dest. aktiviert. Nun erfolgte das Auflegen der Membranen auf die Gele. Eine Bildung von Luftblasen sollte dabei vermieden werden. Anschließend wurde die Membran zu beiden Seiten mit jeweils drei in Transferpuffer getränkten Blottingpapierbögen bedeckt. Die gebildeten Pakete aus „Blottingpapier- Gel- Transfermembran- Blottingpapier“ wurden nun in Gittervorrichtungen eingelegt und in die Transferkammer eingesetzt. Diese wurde zuvor mit 4,5 l 1x Transferpuffer gefüllt.

Der Blottingvorgang lief bei 20 V und 400 mA für mindestens 4 und maximal 6 Stunden. Anschließend wurden die Membranen vorsichtig aus den Gittervorrichtungen entnommen, kurz in Methanol geschwenkt und für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Aufbewahrung konnten die getrockneten Membranen nun eingeschweißt und bei -20°C gelagert werden.

Für eine Detektion am darauffolgenden Tag erfolgte die Aktivierung der getrockneten oder zuvor eingefrorenen Membranen durch ein kurzes Schwenken in Methanol und Aqua dest. Anschließend wurden diese in eine Lösung aus 5% Milchpulver in TBST (Tris-Buffered-Saline and Tween 20; Herstellung s. Kapitel 2.1.3.1) überführt. In dieser Lösung lagerten die Membranen bei +4°C über Nacht. Das Milchpulver sorgte dabei für eine Maskierung der unspezifischen Bindungsstellen auf den Membranen.

2.2.3.3 *Proteindetektion*

Am dritten Tag erfolgte die Detektion der zuvor aufgetrennten und geblotteten Proteine. Hierfür wurden die Membranen mit einem, für das gesuchte Protein spezifischen, Primärantikörper inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Primärantikörper erfolgte indirekt über eine Bindung eines für die Spezies des Primärantikörpers spezifischen Sekundärantikörpers. Dieser Sekundärantikörper besitzt eine Meerrettich-Peroxidase-Aktivität (Horseradish peroxidase „HRP“). Diese Enzymaktivität kann die Oxidation von Luminol, welches sich in Chemilumineszenzlösungen befindet, katalysieren. Die Oxidation führt wiederum zu einer Lumineszenz, die auf einem handelsüblichen fotografischen Film sichtbar gemacht werden kann. Dabei ist die Schwärzung des Filmes durch die Lumineszenz innerhalb eines bestimmten Bereiches direkt proportional zur Proteinmenge des gesuchten Proteins in der Probe.

Die *Vorbereitung der Antikörperlösungen* begann mit der Zentrifugation der Primär- und Sekundärantikörper für 5 min bei 13000 rpm. Üblicherweise wurde für jede Membran eine Menge von 20 ml Antikörperlösung hergestellt. Hierfür wurde nun der gewünschte Primär- oder Sekundärantikörper entsprechend der benötigten Verdünnung in eine Lösung aus 1,5% Milchpulver in TBST gegeben.

Nach dem Abgießen des Blockingreagenzes, in der die Membranen zuvor über Nacht eingelegt wurden, folgte die eigentliche *Proteindetektion*. Die entsprechenden Membranen wurden zu diesem Zweck für 1 h bei Raumtemperatur mit dem verdünnten Primärantikörper auf dem Taumelschüttler inkubiert.

Die Proteine *pc-Jun* und *JNK* wurden nach einem etwas abgewandelten Verfahren mit dem Primärantikörper behandelt. Die Maskierung der unbedeckten Bindungsstellen und die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgten gleichzeitig. Die gewünschte Antikörpermenge wurde direkt in die 5%-Milchpulver-TBST-Lösung gegeben und über

Nacht bei +4°C inkubiert. Die weitere Detektion erfolgte bei allen Proteinen wieder auf identische Weise.

Nach der Inkubation folgten drei 10-minütige Waschungen mit dem TBST-Waschpuffer. Nun wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler mit der Sekundärantikörperlösung inkubiert. Es folgten vier 10-minütige Waschungen mit dem TBST-Waschpuffer.

Zu guter Letzt musste die Chemilumineszenzlösung auf die zu detektierenden Membranen gegeben werden. Diese sollte während des letzten Waschganges angesetzt werden. Innerhalb dieser Versuchsreihe wurden ein fertiges Chemilumineszenz-Kit von Thermo Scientific (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate) oder eine eigens angesetzte Elektrochemilumineszenz-Lösung verwendet (Herstellung s. Kapitel 2.1.3.1). Bei beiden Verfahren wurden 10 ml von Lösung A mit 10 ml einer Lösung B versetzt und auf jeweils eine Membran gegeben. Nach 5-minütiger Inkubation wurde diese in eine Röntgenkassette eingelegt. Auf die Membran wurde eine optisch durchlässige Schutzhülle platziert. Die weiteren Vorgänge für die Entwicklung eines fotografischen Films erfolgten in einer Dunkelkammer unter Rotlicht. In der Kammer konnte nun der Film in die Röntgenkassette eingelegt werden. Nach einer spezifischen Belichtungszeit, die bei jedem Antikörper variierte, wurde der Film aus der Röntgenkassette entnommen und mit Hilfe des Entwicklers Curix 600 der Firma Agfa entwickelt.

Tabelle 19: durchschnittliche Belichtungszeiten der detektierten Proteine

Antikörper	durchschnittliche Belichtungszeit
c-Jun	2 min
Jun D	5 min
Jun B	30 s - 1 min
Phospho-c-Jun	30 min
JNK	5 min

2.2.3.4 Re-Blot-Verfahren

Mit Hilfe des Re-Blot-Verfahrens kann eine Membran mehrmals auf identische oder unterschiedliche Proteine hin untersucht werden. Nach einer erfolgten Detektion kann der Antikörper durch eine Re-Blot-Lösung (hier: ReBlot Plus Mild Antibody Stripping Solution von Millipore) von der Membran entfernt werden. Durch eine Wiederholung des Detektionsvorganges können nun erneut Proteine auf der Membran nachgewiesen werden.

Zur Durchführung des Re-Blots musste die gewünschte Membran zunächst bei Raumtemperatur auftauen. Anschließend wurde sie mit entionisiertem Wasser für 5 min auf dem Taumelschüttler gewaschen. Alle weiteren Wasch- und Detektionsschritte wurden ebenfalls bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler durchgeführt. Es wurde eine 1:10-Verdünnung der konzentrierten Re-Blot-Lösung von Millipore angesetzt. Die verdünnte Re-Blot-Lösung sollte auf die Membran gegeben werden und dort für 25 min verbleiben. Es folgten zwei 5-minütige Waschvorgänge mit einer 5%-Milchpulver-TBST-Lösung. Anschließend konnte die Detektion, wie in Kapitel 2.2.3.3 bereits beschrieben, wiederholt werden.

2.2.3.5 Densitometrische Auswertung

Die Auswertung der Filme erfolgte mit dem Densitometer GS-800 der Firma BioRad. Mit Hilfe des Programms „Quantity One“ konnten die Proteinbanden auf den eingescannten Filmen markiert werden. Innerhalb dieser Markierung berechnete das Programm die Stärke der Schwärzung und quantifizierte diese. Dabei wurde die allgemeine Schwärzung des Filmes durch eine Subtraktion eines zuvor markierten Backgrounds eliminiert. Zur Auswertung der Schwärzungswerte der Tumorproben wurden die Positivkontrollen hinzugezogen. Die Schwärzung der Ovarcar-8-Bande bzw. der MDA-MB-231-Bande diente hierbei als Referenzwert und wurde einem relativen Wert von 100% gleichgesetzt. Der Schwärzungswert der jeweiligen Tumorprobe wurde nun zum ermittelten Wert für die Positivkontrolle ins Verhältnis gesetzt. Dieser relative Wert einer Tumorprobe entspricht nun einer semiquantitativen Aussage über die Höhe der Proteinexpression.

Zur Überprüfung des Proteineinsatzes, der, wie oben bereits erwähnt, immer 20 µg betragen sollte, wurde bei jeder Probe ein Re-Blot (genauer zum Verfahren s. Kapitel 2.2.4) mit dem hsc-70-Antikörper durchgeführt. Das hsc-70-Protein ist ein so genanntes

„Housekeeping-Protein“, das ubiquitär in allen Zellen vorhanden ist. Bei einer gleichmäßigen Schwärzung der hsc-70-Bande kann also davon ausgegangen werden, dass der Proteineinsatz bei den verwendeten Tumorproben identisch war.

2.2.3.6 Statistische Auswertung Western Blotting

Die statistische Auswertung der relativen Schwärzungswerte der einzelnen Tumorproben erfolgte mit Hilfe der „IBM® SPSS® Statistics 20“-Software.

Zunächst erfolgte eine deskriptive statistische Analyse des Hamburger Patientinnenkollektivs. Das Kollektiv wurde im Folgenden auf bereits bekannte, signifikante Prognosefaktoren für das Ovarialkarzinom überprüft. Dabei wurden die jeweiligen Prognoseparameter mittels eines Log-Rang-Testes mit dem Gesamtüberleben sowie dem rezidivfreien Intervall korreliert. Um die Kaplan-Meier-Kurven übersichtlicher darstellen zu können, erfolgte bei den Prognosemarkern „Alter bei Erstdiagnose“, „FIGO-Stadium“ sowie „Aszitesmenge“ eine Zusammenfassung der Parameter zu Gruppen (Siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Zusammenfassung der zur Auswertung verwendeten Prognosefaktorgruppen

Prognosefaktor				
FIGO-Gruppen	FIGO I + FIGO II	FIGO III+FIGO IV	-	-
Aszites-Gruppen	0 ml	>0 ml-500 ml	>500 ml-1000 ml	>1000 ml
Grading-Gruppen	G1+G2	G3	-	-

Darüber hinaus wurde der mögliche Einfluss der Höhe der Proteinexpressionen auf das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Intervall in Kaplan-Meier-Analysen (Log-Rank-Test) untersucht. Hierfür wurden die Tumoren anhand ihrer Expressionshöhe des jeweils betrachteten Proteins in drei gleich große Tertiale eingeteilt. Das Tertial 1 beinhaltet anschließend die Tumoren mit einer niedrigen Proteinexpression, das Tertial 2 mit einer mittleren und das Tertial 3 mit einer starken Expression. Lediglich im Falle von pc-Jun wurde anders verfahren. Aufgrund einer zuvor durchgeführten optischen Beurteilung der Expressionsstärke (0=keine Expression, 1=schwache Expression, 2=mittelstarke Expression, 3=starke Expression), wurden hier lediglich zwei Gruppen (keine optisch sichtbare pc-Jun-Expression und optisch sichtbare pc-Jun-Expression) gebildet.

Im Falle einer signifikanten oder tendenziell signifikanten Überlebenszeitanalyse wurde zusätzlich eine multivariate Analyse mittels Cox-Regression angeschlossen, um eine mögliche Unabhängigkeit bzw. Abhängigkeit der Proteinexpression von anderen Prognoseparametern näher zu beleuchten. Dabei wurden die Parameter FIGO-Stadium (FIGO I+II vs. FIGO III vs. FIGO IV), Grading (G1/2 vs. G3), Nodalstatus (N0 vs. N1), Histologie (serös-papillär vs. andere) und OP-Ergebnis (kein Tumorrest vs. Tumorrest >1cm) in die Analysen einbezogen.

Es folgte der Vergleich der Proteinexpressionshöhe der jeweiligen Tumorproben mit den Follow-Up-Daten der dazugehörigen Patientinnen. Hierfür wurden die Daten mittels des χ^2 -Testes auf Korrelationen zwischen der Expressionshöhe der untersuchten Proteine (c-Jun, pc-Jun, JunD, JunB, JNK) und dem FIGO-Stadium, dem Alter bei Erstdiagnose, dem Tumorgrading, dem Nodal- und Metastasenstatus, der Aszitesmenge und -zytologie sowie dem histologischen Subtypus untersucht.

Die Expressionshöhen der einzelnen Jun-Proteine und der JNK wurden mittels des Tests nach Spearman-Rho auf etwaige Korrelationen untereinander untersucht. Darüber hinaus erfolgte eine Untersuchung auf Korrelationen nach Spearman-Rho zu den Fos-Proteinen. Hierfür wurden freundlicherweise Daten aus einer früheren Western-Blot-Untersuchung eines Teils des Hamburger Kollektivs von Frau Christine Kanowski zur Verfügung gestellt.

Als Signifikanzniveau wurde für alle Tests ein P-Wert von $p \leq 0,05$ angenommen.

2.2.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde innerhalb dieser Arbeit als zweite Methodik verwendet, um eine Quantifizierung der JunD-Expression im bereits durch Western Blotting untersuchten Hamburger Kollektiv sowie in einem weiteren unabhängigen Patientenkollektiv (Würzburger Kollektiv) vorzunehmen.

Insgesamt standen 14 in Paraffin eingebettete Präparate des Hamburger Kollektivs für eine immunhistochemische Untersuchung bereit. Darüber hinaus wurden die 65 Ovarialkarzinomproben des Würzburger Kollektivs immunhistochemisch gefärbt und mikroskopisch untersucht.

Die Vorbereitung der Präparate beinhaltete zunächst das Schneiden der in Paraffin eingebetteten Ovarialkarzinomgewebe mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms auf 4 μm

Dicke. Diese fertigen auf Objektträgern platzierten Präparate wurden bei ca. 56°C über Nacht getrocknet. Es folgte eine Entparaffinierung durch ein 2x 10-minütiges Xylol-Bad und eine Rehydrierung mittels absteigender Alkoholreihe (100%, 96% und 80% Ethanol-Bäder für jeweils 2x 5 min). Zur Verbesserung der Immunreaktivität der zuvor fixierten Gewebe wurden diese in TEC-Pufferlösung (pH=7,8; Herstellung s. Materialien Immunhistochemie) für 5 min auf ca. 100°C erhitzt und 15 min in der heißen Lösung ruhen gelassen. Um unspezifische Färbungen durch im Gewebe vorhandene endogene Peroxidasen zu verhindern, folgte ein Peroxidase-Block mit 0,5% H₂O₂-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur. Darüber hinaus erfolgte eine einstündige Blockierung hydrophober Bindungsstellen durch die im Immunhistochemie-Kit mitgelieferte Blocking Solution. Auf diese Weise können unspezifischen Hintergrundfärbungen vermindert werden.

Nach der Vorbereitung der Schnitte folgte die eigentliche Immunhistochemie gemäß der Peroxidase-anti-Peroxidase- (PAP-) Methodik. Der JunD-spezifische Primärantikörper wurde in der Verdünnung 1:1500 in einer Feuchtkammer auf die Schnitte aufgetragen und über Nacht bei +4°C inkubiert. Nach zweimaliger jeweils 5-minütiger Waschung mit der TBS-Solution (pH=7,6) schloss sich die 30-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:200) bei Raumtemperatur an. Dieser Antikörper ist biotinyliert und bindet als Goat-anti-rabbit-Antikörper spezifisch das F_c-Fragment des Primärantikörpers. Wie zuvor bereits beschrieben, erfolgte eine Waschung der Präparate mit der TBS-Solution. Anschließend wurden die Präparate mit dem ABC-Tertiärreagenz für 30 min benetzt. Dieses Reagenz enthält einen ABC-Komplex aus Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase „HRP“). Das Avidin dieses Komplexes kann mit hoher Affinität Bindungen zum Biotin des Sekundärantikörpers und der HRP eingehen. Die Präparate wurden im Anschluss erneut mit TBS-Solution gespült.

Die Detektion der gebundenen JunD-Antigene erfolgte schlussendlich mit Hilfe des 3,3-Diamino-Peroxidase-Substrates (DAB), dem zum Start der Reaktion wenige Tropfen H₂O₂-Lösung hinzugefügt wurden. Die Peroxidase des ABC-Komplexes reduziert dabei das DAB und führt auf diese Weise zu einem braunen Farbumschlag. Die Reaktion wurde nach ca. 4 min durch zweimaliges Waschen der Schnitte in Leitungswasser gestoppt.

Im Anschluss folgte die Kerngegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer zur besseren Darstellung der mittels Immunhistochemie ungefärbten Kerne. Nach einem 2-minütigem Bad in der Lösung folgte ein kurzes Schwenken der Präparate in Salzsäurealkohol. Durch das saure Milieu kann Hämalaun kovalente Bindungen zum Chromatin der Zellkerne eingehen. Die Bläuung der Schnitte fand unter laufendem Leitungswasser durch eine pH-Wert-Erhöhung statt.

Die fertig gefärbten Präparate wurden nun in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80%, 90%, 96% Ethanol-Lösung für jeweils 2x 3 min) sowie mit Xylol (2x 3 min) dehydriert. Zu guter Letzt wurden die Präparate mit Vitro Clud eingedeckelt und histologisch ausgewertet.

2.2.4.1 Statistische Auswertung Immunhistochemie

Die Auswertung beinhaltete dabei eine Beurteilung der Färbeintensität und des Anteils der gefärbten Tumorzellkerne. Aus beiden Faktoren wurde gemäß der Tabelle 21 durch Multiplikation ein Gesamtscore (IRS-Score) gebildet. Mit Hilfe dieses Scores erfolgte eine Einteilung der Tumorproben gemäß ihrer Expressionsstärke in drei Gruppen (schwache, mittelstarke und starke Expression).

Tabelle 21: Beurteilungskriterien für die histologische Auswertung der Immunhistochemie

A: Stärke der Färbung	
Negativ	0
Schwach	1
Mittel	2
Stark	3
B: Anteil der gefärbten Tumorzellen	
<20%	1
20% - <50%	2
50% - <80%	3
≥ 80%	4
IRS-Score: A x B (0-12)	

Im Hamburger Kollektiv erfolgten weiterhin Kaplan-Meier-Analysen und Log-Rank-Tests zur Untersuchung eines möglichen Einflusses der in der Immunhistochemie gezeigten JunD-Expression auf das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Intervall der Patientinnen.

Anschließend wurden Chi²-Tests zur Darstellung etwaiger Zusammenhänge zwischen der Stärke der Färbung in der JunD-Immunhistochemie und dem FIGO-Stadium, dem Alter bei Erstdiagnose, dem Tumorgrading, dem Nodal- und Metastasenstatus, dem OP-Ergebnis, der Aszitesmenge und –zytologie sowie dem histologischen Subtypus durchgeführt. Innerhalb des Würzburger Kollektivs erfolgte aufgrund unzureichender Daten zu den anderen Punkten ausschließlich eine Betrachtung der möglichen Zusammenhänge zum FIGO-Stadium, zur Histologie des Tumors, zum Grading sowie zum Alter der Patientin bei Erstdiagnose.

3. Ergebnisse

3.1 Beschreibung des Hamburger Patientenkollektivs

Innerhalb dieser Arbeit wurde die Expressionshöhe der Jun-Proteine an 173 Ovarialkarzinom-Gewebeproben des Hamburger Kollektivs untersucht (Tabelle 22).

Tabelle 22: Klinisch-pathologische Daten des Hamburger Patientenkollektivs

Hamburger Patientenkollektiv n=173		n=173	
Alter (in Jahren)		Histologie	
Mittelwert	58,5	serös-papillär	140
Median	61	endometroid	10
Bereich	21-90	gemischt	6
		undifferenziert	6
FIGO-Klassifikation		muzinös	5
FIGO I	10	klarzellig	4
FIGO II	6	unbekannt	2
FIGO III	121		
FIGO IV	36	Chemotherapie	
Grading		Platin-haltig	159
G1	12	keine Chemotherapie	14
G2	47	Erstrezidiv	
G3	112	ja	117
Unbekannt	2	nein	50
		unbekannt	6
Nodalstatus		Zweitkarzinome	
N0	106	ja	23
N1	46	nein	150
Nx	21		
Fernmetastasen		Materialart	
M0	137	Primartumorgewebe	161
M1	36	Z.n. neoadjuvanter CTx	8
		Rezidivgewebe	4
Ort der Metastasen		Im Beobachtungszeitraum verstorben	
Leber	16	verstorben	104
Pleurakarzinose	10	nicht verstorben	69
maligner Pleuraerguss	2		
Lunge	1	Rezidivfreies Intervall (in Monaten)	
Skelettsystem	1	Mittelwert	29,6
Sonstige	4	Median	16
Unbekannt	2	Bereich	0-176
OP-Ergebnis		unbekannt	6
Tumorfrei	121		
Tumorrest ≤ 1cm	34	Gesamtüberleben (in Monaten)	
Tumorrest > 1cm	16	Mittelwert	44,5
Unbekannt	2	Median	36
		Bereich	0-277

3.2 Analyse des Hamburger Kollektivs hinsichtlich bekannter Prognosefaktoren

Die Überprüfung des Gesamtkollektivs hinsichtlich bekannter Prognosefaktoren liefert signifikante Ergebnisse für die Faktoren FIGO-Stadium, Histologie, Nodalstatus, Metastasenstatus, Aszitesmenge, Aszitesgruppen, Asziteszytologie und das OP-Ergebnis. Dabei zeigen die Log-Rank-Tests bei allen zuvor genannten Prognosefaktoren sowohl in Bezug auf das Gesamtüberleben, als auch auf das rezidivfreie Intervall signifikante Korrelationen. Die einzige Ausnahme bildet dabei die Asziteszytologie, sie zeigt nur hinsichtlich des rezidivfreien Intervalls einen signifikanten Log-Rank-Test. Lediglich das Tumorgrading sowie Grading-Gruppen zeigen keine Korrelationen bezüglich des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Intervalls. Bei der genaueren Betrachtung des Gratings kann eine Tendenz zur Signifikanz ($p=0,082$) in Bezug auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Tabelle 23 und 24 zeigen die getesteten Prognosefaktoren sowie ihre Log-Rank-Werte.

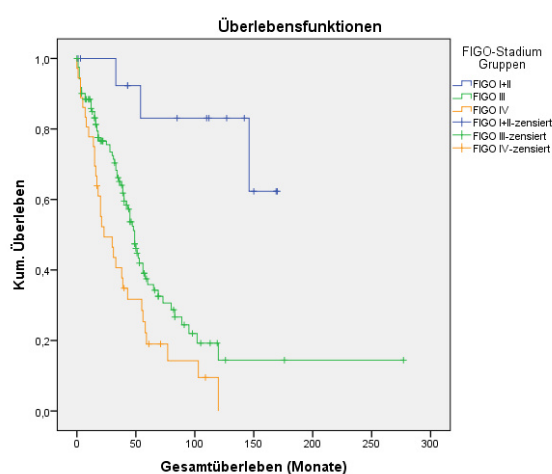
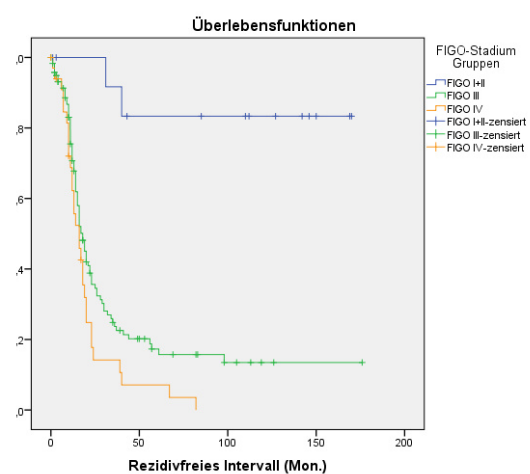
Tabelle 23: Log-Rank-Tests bekannter Prognoseparameter hinsichtlich des Gesamtüberlebens

Prognoseparameter	Log-Rank
FIGO-Stadium	p=0,002
FIGO-Stadium-Gruppen (FIGO I+II / FIGO III+IV)	p<0,001
Histologie	p=0,011
Nodalstatus	p<0,001
Metastasenstatus	p=0,001
Aszitesmenge	p=0,008
Aszites-Gruppen (0ml/ >0ml-500ml/ >500ml-1000ml/ >1000ml)	p=0,008
Asziteszytologie (maligne Zellen/ keine malignen Zellen)	p=0,091
Grading	p=0,075
Grading-Gruppen (G1+G2/ G3)	p=0,064
Alter bei ED	p<0,001
OP-Ergebnis	p<0,001

Tabelle 24: Log-Rank-Tests bekannter Prognoseparameter hinsichtlich des rezidivfreien Intervalls

Prognoseparameter	Log-Rank
FIGO-Stadium	p<0,001
FIGO-Stadium-Gruppen	p<0,001
(FIGO I+II / FIGO III+IV)	
Histologie	p=0,002
Nodalstatus	p<0,001
Metastasenstatus	p=0,003
Aszitesmenge	p=0,024
Aszites-Gruppen	p=0,001
(0ml/ >0ml-500ml/ >500ml-1000ml/ >1000ml)	
Asziteszytologie	p=0,024
(maligne Zellen/ keine malignen Zellen)	
Grading	p=0,325
Grading-Gruppen	p=0,495
(G1+G2/ G3)	
OP-Ergebnis	p<0,001

Die Abbildungen 6-19 zeigen die Kurven der Kaplan-Meier-Analysen zum Gesamtüberleben sowie zum rezidivfreien Intervall der entsprechenden Prognosefaktoren.

**Abbildung 6:** Kaplan-Meier-Kurve FIGO-Gruppen und Gesamtüberleben (**p<0,001**)**Abbildung 7:** Kaplan-Meier-Kurve FIGO-Gruppen und rezidivfreies Intervall (**p<0,001**)

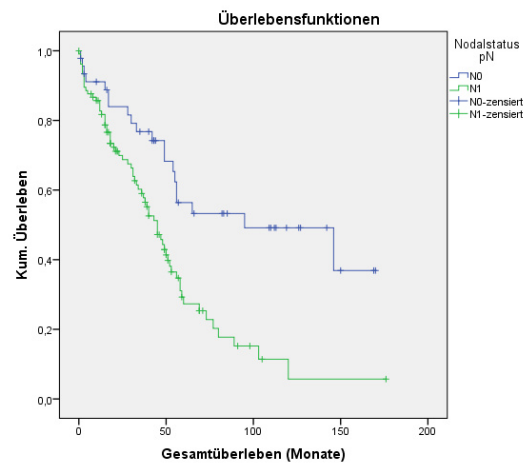


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve Nodalstatus und Gesamtüberleben ($p<0,001$)

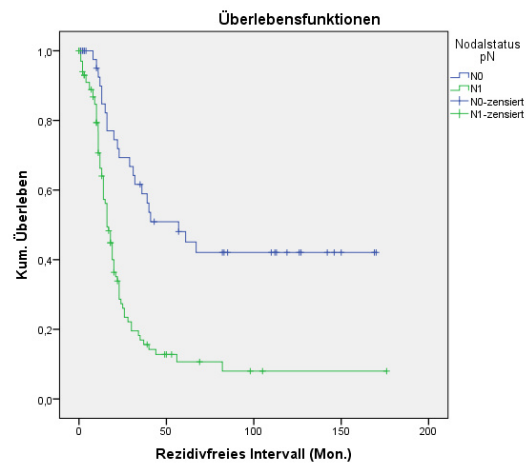


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve Nodalstatus und rezidivfreies Intervall ($p<0,001$)

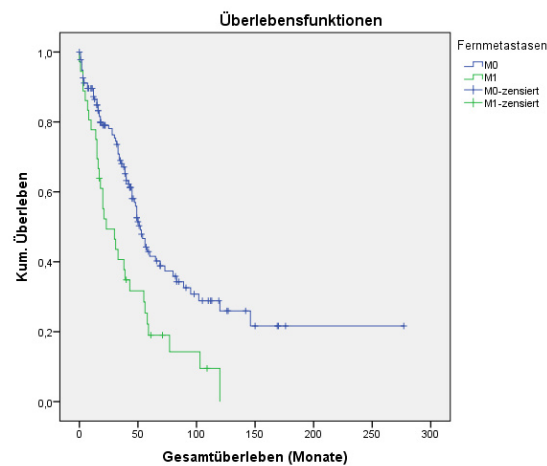


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve Fernmetastasen und Gesamtüberleben ($p=0,003$)

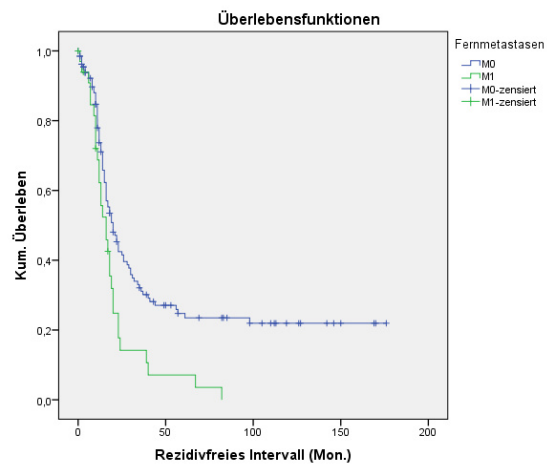


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve Fernmetastasen und rezidivfreies Intervall ($p=0,001$)

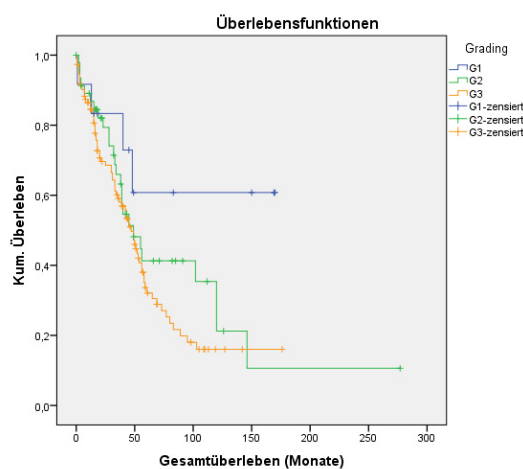


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve Grading und Gesamtüberleben ($p=0,075$)

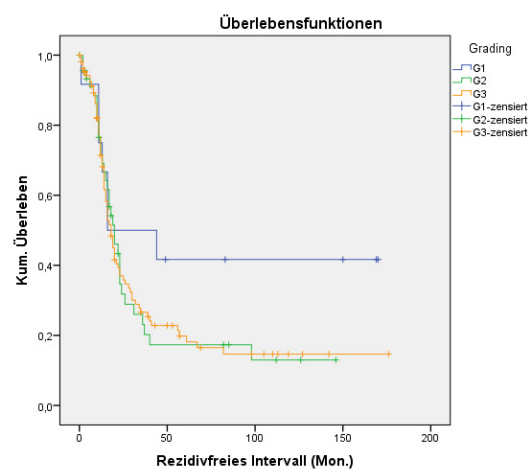


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve Grading und rezidivfreies Intervall ($p=0,325$)

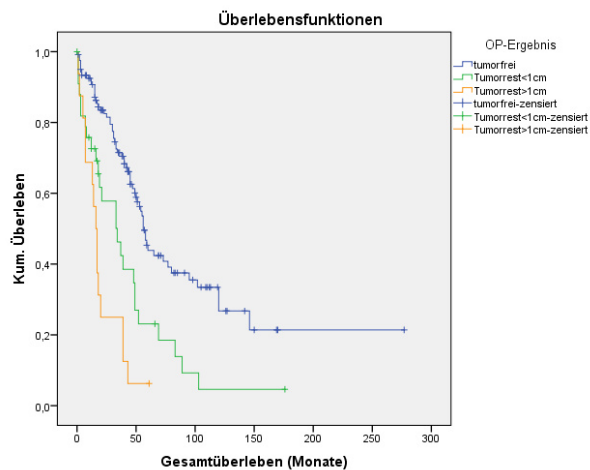


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve OP-Ergebnis und Gesamtüberleben ($p<0,001$)

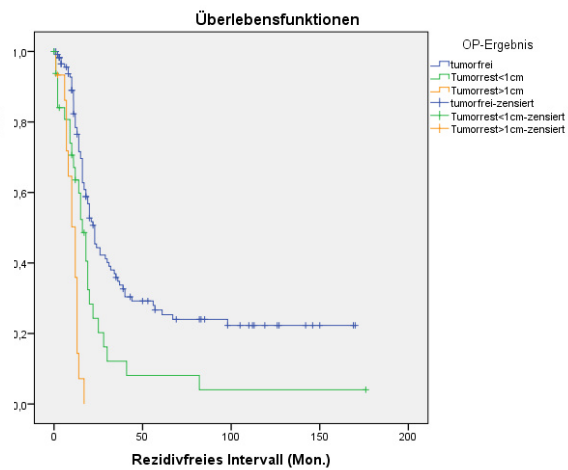


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve OP-Ergebnis und rezidivfreies Intervall ($p<0,001$)

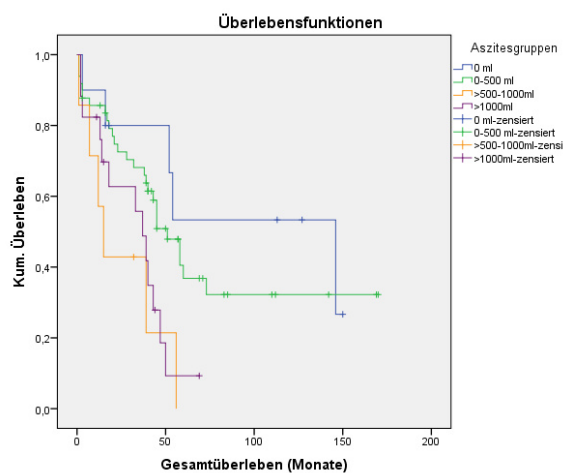


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve Aszites und Gesamtüberleben ($p=0,008$)

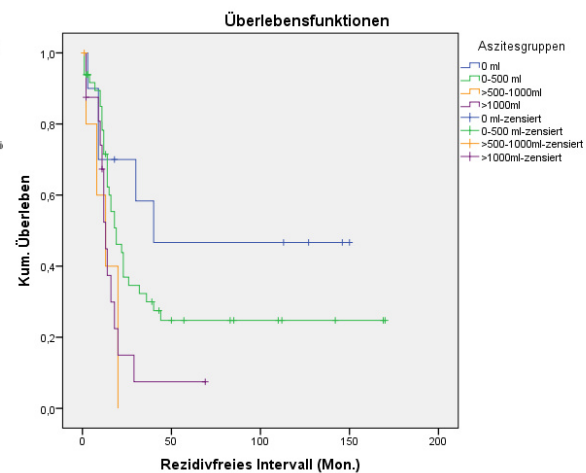


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve Aszites und rezidivfreies Intervall ($p=0,024$)

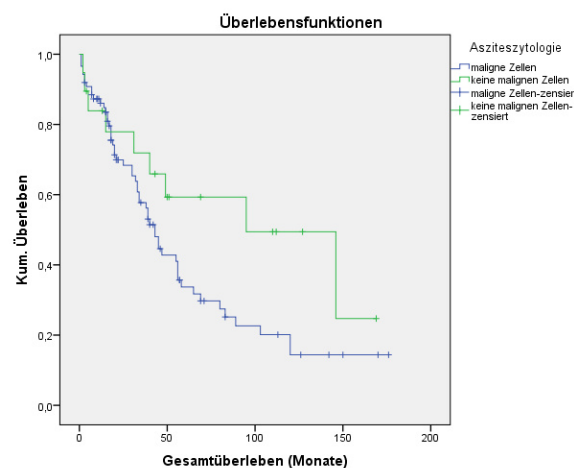


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurve Asziteszytologie und Gesamtüberleben ($p=0,091$)

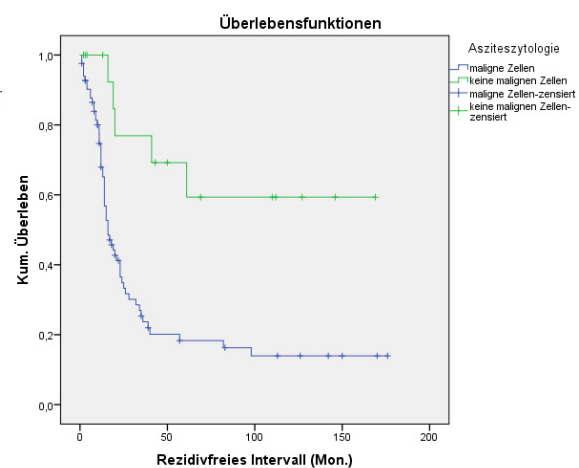


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurve Asziteszytologie und rezidivfreies Intervall ($p=0,001$)

3.3 Ergebnisse der Western-Blot-Analysen der Jun-Proteine

Im nachfolgenden Teil der Auswertung erfolgte eine getrennte Analyse der Primärtumoren, der Tumoren nach neoadjuvanter Therapie und der Rezidive. Die in die Analyse eingeschlossenen Tumoren werden zuvor im Text genannt.

3.3.1 c-Jun

Die Analyse der 161 Primärtumorproben ergibt Expressionshöhen im Bereich von 0,8% bis 233,2% im Vergleich zur MDA-MB-231-Positivkontrolle. Der Mittelwert der c-Jun-Expression liegt bei 24,3%, der Median bei 16,4%.

Die Verteilungen der c-Jun-Expressionswerte sowie deren logarithmischen Werte werden jeweils in den Abbildungen 20 und 21 dargestellt.

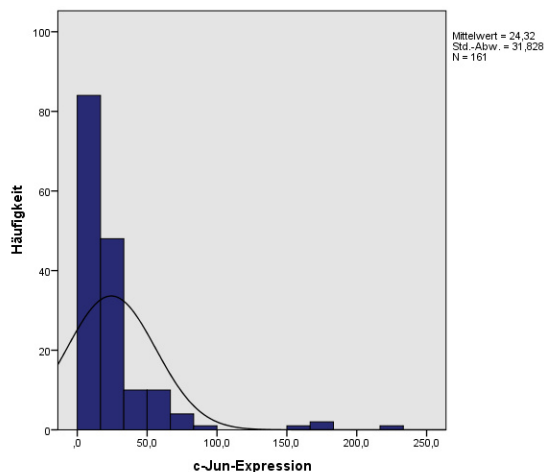


Abbildung 20: Verteilung der c-Jun-Expressionswerte

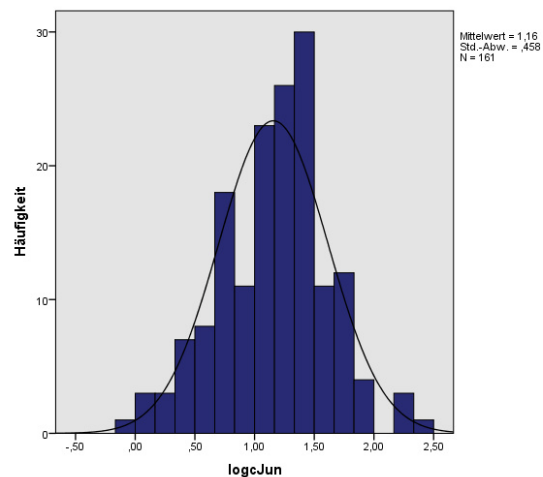


Abbildung 21: Verteilung der logarithmischen c-Jun-Expressionswerte lg(c-Jun)

Die Abbildung 22 zeigt ein Beispiel eines c-Jun-Filmes mit hsc-70-Gellade-Kontrolle.

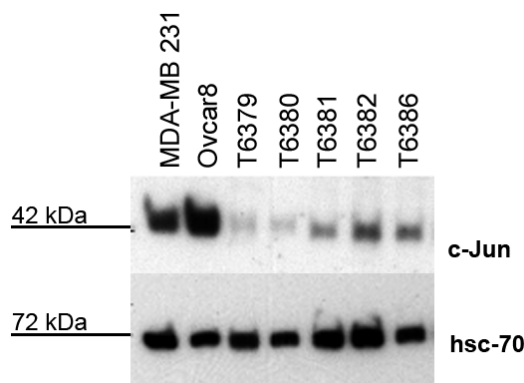


Abbildung 22: Beispielfilm eines c-Jun-Western-Blots (mit hsc-70-Gellade-Kontrolle)

Die Gruppe der Tumoren nach neoadjuvanter Therapie (n=8) zeigt Expressionen im Bereich von 3,3% bis 44,3%. Im Mittel liegt die Expressionshöhe bei 15,4%, der Median liegt bei 6,6%. Die vier Rezidivtumorproben weisen Expressionswerte von 2,5% bis 19,3% auf. Der Mittelwert dieser Proben liegt bei 9,6%, der Median bei 8,3%. Der Vergleich der c-Jun-Expressionen in Primärtumoren, Tumoren nach neoadjuvanter Therapie und Rezidiven mittels T-Test der Mittelwerte ergibt keine signifikanten Korrelationen. Lediglich der Vergleich der Mittelwerte der Tumoren nach neoadjuvanter Therapie und der Rezidive zeigt eine Tendenz zur Signifikanz ($p=0,098$). Alle weiteren statistischen Analysen wurden allein mit den Primärtumoren durchgeführt (n=161).

Mittels eines Spearman-Rho-Testes wurde auf Korrelationen zwischen der c-Jun-Expression und anderen Jun-Proteinen sowie der JNK getestet. C-Jun zeigt dabei nur sehr schwache positive Korrelationen zur Expressionshöhe von pc-Jun, JNK sowie JunD. Tabelle 25 beinhaltet die dazugehörigen Korrelationskoeffizienten und Signifikanzwerte.

Tabelle 25: Korrelationen zwischen c-Jun und anderen Jun-Proteinen (mittels Spearman-Rho-Tests)

Protein	Korrelationskoeffizient	Signifikanz
pc-Jun	$r=0,298$	$p<0,001$
JNK	$r=0,376$	$p<0,001$
JunD	$r=0,251$	$p=0,001$
JunB	$r=0,096$	$p=0,266$

Für die weitere Auswertung wurde das Kollektiv, wie zuvor in Kapitel 2.2.3.6 erwähnt, entsprechend der Höhe der c-Jun-Expression in Tertiale eingeteilt. So ergab sich ein Tertial 1 mit einer niedrigen c-Jun-Expression ($c-Jun < 10,884$), ein Tertial 2 mit einer mittleren c-Jun-Expression ($10,884 < c-Jun < 23,264$) sowie ein Tertial 3 mit einer hohen c-Jun-Expression ($c-Jun > 23,264$).

Die Überlebenszeitanalyse mittels eines Log-Rank-Testes zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei c-Jun-Tertialen ($p=0,195$). Ebenso verhält es sich bei der Betrachtung des rezidivfreien Intervalls ($p=0,422$). Die Abbildungen 23 und 24 zeigen die Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben sowie zum rezidivfreien Intervall in Abhängigkeit der jeweiligen Expressions-Tertiale.

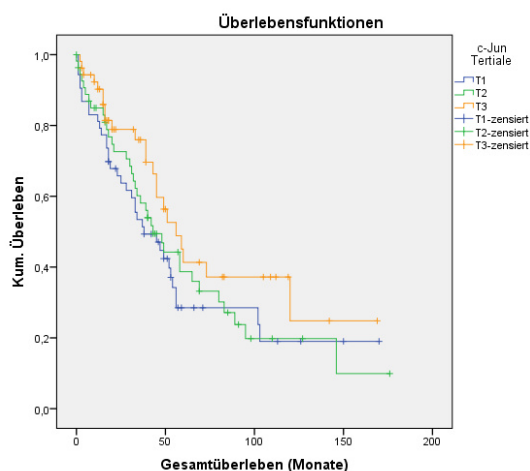


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve c-Jun-Expression und Gesamtüberleben (T1=niedrige Expression, T2=mittlere Expression, T3=hohe Expression) [p=0,195]

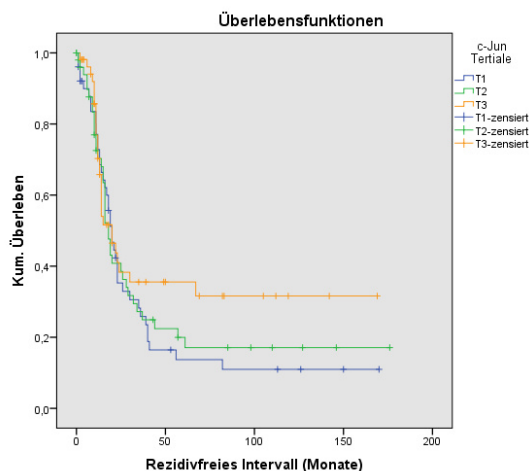


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve c-Jun-Expression und rezidivfreies Intervall (T1=niedrige Expression, T2=mittlere Expression, T3=hohe Expression) [p=0,422]

Die Untersuchung von Korrelationen zwischen der c-Jun-Expression und bekannten Prognosefaktoren ergab keine signifikanten Ergebnisse. In dieser Betrachtung wurden ebenfalls die zuvor gebildeten c-Jun-Tertiale verwendet. Tabelle 26 zeigt die Signifikanzwerte der einzelnen Faktoren.

Tabelle 26: Korrelationen zwischen c-Jun-Tertialen und bekannten Prognoseparametern (mittels χ^2 -Test)

Prognoseparameter	Signifikanz
FIGO-Stadium	p=0,495
FIGO-Gruppen	p=0,634
(FIGO I+II / FIGO III/ FIGO IV)	
Histologie	p=0,867
Nodalstatus	p=0,929
Metastasenstatus	p=0,813
Aszitesmenge	p=0,524
Aszites-Gruppen	p=0,566
(0ml/ >0ml-500ml/ >500ml-1000ml/ >1000ml)	
Asziteszytologie	p=0,600
(maligne Zellen/ keine malignen Zellen)	
Grading	p=0,471
Grading-Gruppen	p=0,205
(G1+G2 / G3)	
Alter bei Erstdiagnose	p=0,427

3.3.2 pc-Jun

In der optischen Auswertung der 161 Primärtumoren hinsichtlich der pc-Jun-Expression weisen 108 Tumoren keine optisch sichtbaren Expressionsbanden auf. 35 Tumorproben zeigen optisch sichtbare pc-Jun-Expressionen. Diese ist bei 18 Tumoren schwach ausgeprägt, bei 12 Tumoren mittelstark und bei 5 Tumoren stark ausgeprägt. Für 18 Tumoren können keine genauen Angaben gemacht werden, da innerhalb dieser Western-Blot-Analysen weder die Positivkontrollen, noch die Tumorproben sichtbare Expressionsbanden aufweisen. Diese 18 Tumoren wurden daher aus den weiteren Betrachtungen zur pc-Jun-Expression in den Primärtumoren ausgeschlossen.

In der Abbildung 25 ist die Werteverteilung der optischen pc-Jun-Expressionswerte dargestellt.

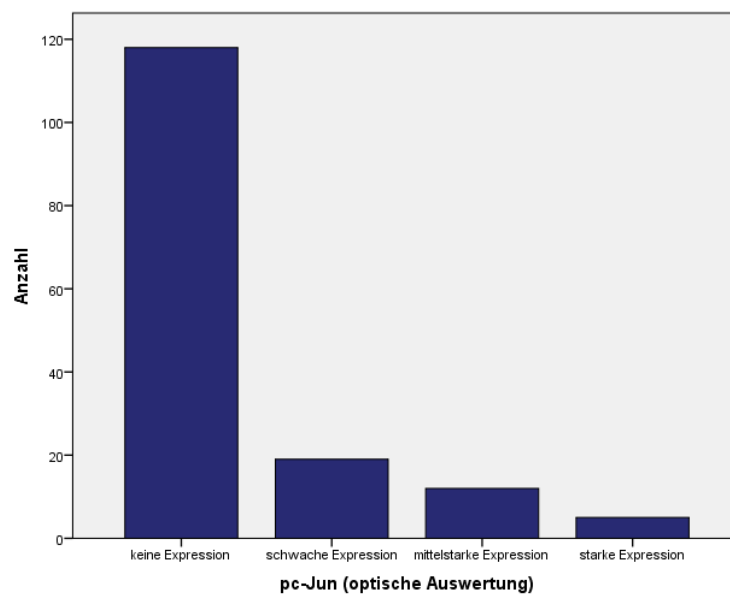


Abbildung 25: Verteilung der pc-Jun-Expressionswerte (optische Auswertung)

Die Analyse der 8 Tumoren nach neoadjuvanter Therapie ergibt 7 Tumorproben ohne optisch sichtbare Expression sowie 1 Probe mit einer schwachen pc-Jun-Expression. Die 4 Rezidivtumoren zeigen alle keine sichtbaren Expressionsbanden.

Der T-Test für unabhängige Stichproben zeigt einen signifikanten Unterschied des pc-Jun-Mittelwertes zwischen den Primärtumoren und den Rezidivtumoren (**p<0,001**). Darüber hinaus scheint die pc-Jun-Expression der Primärtumoren und der Tumoren nach neoadjuvanter Therapie tendenziell unterschiedlich zu sein (p=0,078). Der

Vergleich zwischen den neoadjuvanten und den Rezidiv-Tumoren ergibt keine signifikanten Ergebnisse.

Die Abbildung 26 zeigt beispielhaft einen Western-Blot-Film zur pc-Jun-Detektion.

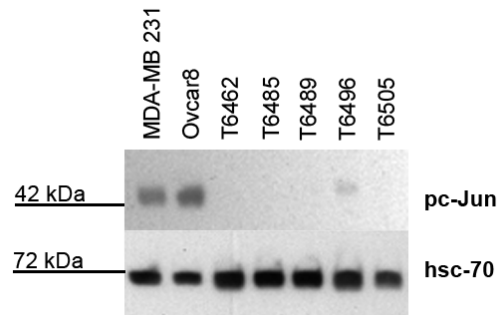


Abbildung 26: Beispielfilm eines pc-Jun-Western-Blots (mit hsc-70-Gellade-Kontrolle)

Alle weiteren statistischen Betrachtungen erfolgen mit den auswertbaren Primärtumoren (n=143).

Die Untersuchung auf bivariate Korrelationen (nach Spearman-Rho) pc-Juns ergibt lediglich sehr schwache positive Korrelationen zu c-Jun, JunD sowie JNK. Tabelle 27 zeigt die jeweiligen Korrelationskoeffizienten.

Tabelle 27: Korrelationen zwischen pc-Jun und anderen Jun-Proteinen (mittels Spearman-Rho-Tests)

Protein	Korrelationskoeffizient	Signifikanz
c-Jun	r=0,298	p<0,001
JNK	r=0,256	p=0,002
JunD	r=0,272	p=0,001
JunB	r=0,152	p=0,069

Patientinnen ohne optisch sichtbare pc-Jun-Expression zeigen bei der Überlebensanalyse mittels Log-Rank-Test ein signifikant längeres Gesamtüberleben (25 vs. 41 Monate; **p=0,038**). Ebenso verhält es sich mit dem rezidivfreien Intervall (14 vs. 16 Monate; **p=0,017**). Die Abbildungen 27 und 28 zeigen die Kaplan-Meier-Kurven der Patientinnen mit und ohne sichtbare pc-Jun-Expression.

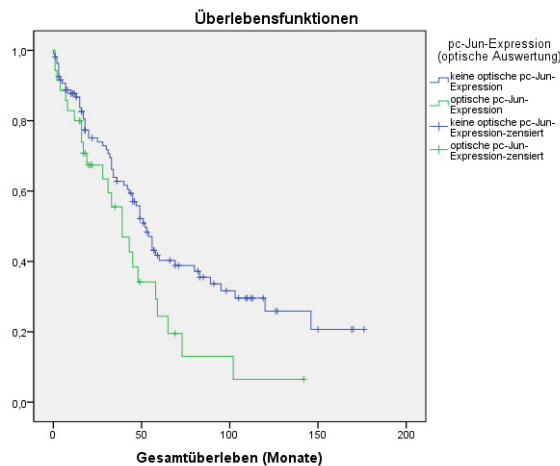


Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurve pc-Jun-Expression und Gesamtüberleben ($p=0,038$)

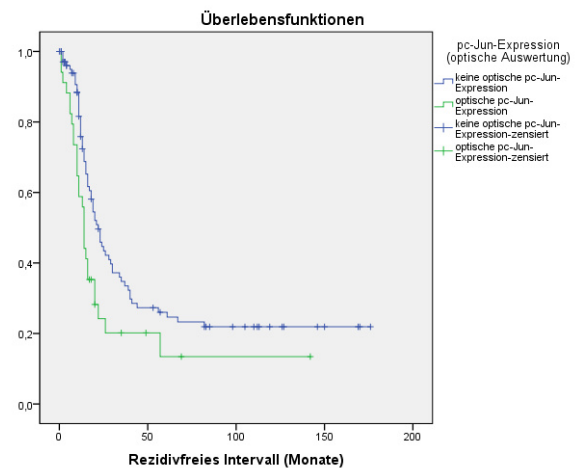


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve pc-Jun-Expression und rezidivfreies Intervall ($p=0,017$)

Die Analyse von Zusammenhängen zwischen der pc-Jun-Expression und bekannten Prognosefaktoren ergab eine Signifikanz hinsichtlich des Nodalstatus ($p=0,035$; Abbildung 29). Der Nodalstatus und die Höhe der pc-Jun-Expression weisen eine positive Korrelation auf. Alle weiteren Prognosefaktoren korrelierten nicht mit der Höhe der optischen pc-Jun-Expression. Tabelle 28 zeigt die Signifikanz-Werte der einzelnen Faktoren.

Tabelle 28: Korrelationen zwischen pc-Jun und bekannten Prognoseparametern (mittels χ^2 -Tests)

Prognoseparameter	Signifikanz
FIGO-Stadium	$p=0,997$
FIGO-Gruppen	$p=0,710$
(FIGO I+II / FIGO III/ FIGO IV)	
Histologie	$p=0,117$
Nodalstatus	$p=0,035$
Metastasenstatus	$p=0,586$
Aszitesmenge	$p=0,859$
Aszites-Gruppen	$p=0,852$
(0ml/ >0ml-500ml/ >500ml-1000ml/ >1000ml)	
Asziteszytologie	$p=0,322$
(maligne Zellen/ keine malignen Zellen)	
Grading	$p=0,422$
Grading-Gruppen	$p=0,578$
(G1+G2 / G3)	
Alter bei Erstdiagnose	$p=0,437$

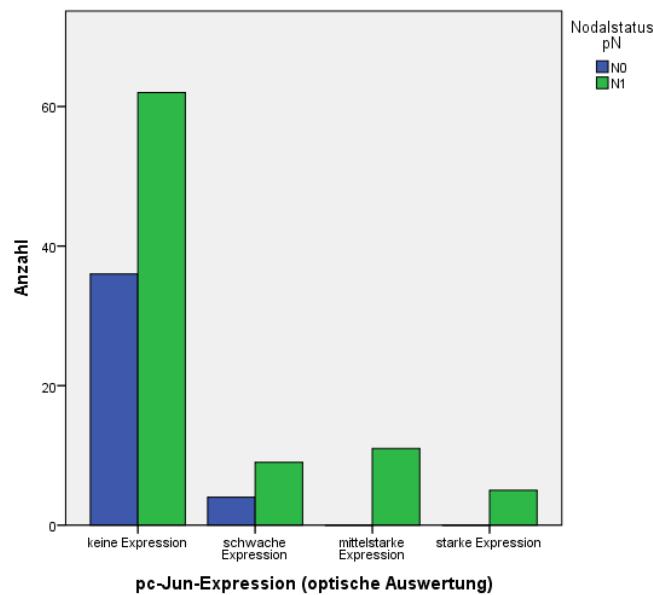


Abbildung 29: Verteilung des Nodalstatus in den jeweiligen pc-Jun-Expressionsgruppen

Mittels Cox-Regression erfolgte eine multivariate Analyse unter Einbezug der pc-Jun-Proteinexpression, des Gradings, des Nodalstatus, des OP-Ergebnis, des FIGO-Stadiums sowie der histologischen Klassifikation. Patientinnen mit Tumoren in fortgeschrittenen Tumorstadien (FIGO III und FIGO IV) oder mit postoperativem Tumorrest >1cm wiesen in dieser Analyse ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben und rezidivfreies Intervall auf. Die pc-Jun-Expression zeigte einen signifikanten und unabhängigen Einfluss auf das rezidivfreie Intervall. Eine im Western-Blotting optisch sichtbare pc-Jun-Expression war mit einem 1,72fach [95%CI: 1,041-2,868; **p=0,034**] erhöhten Risiko für das Erleiden eines Rezidivs verbunden. Darüber hinaus führte auch ein positiver Nodalstatus zu einem verkürzten rezidivfreien Intervall. Die Tabelle 29 zeigt die entsprechenden Hazard Ratios, 95%-Konfidenzintervalle und Signifikanzwerte dieser Analysen.

Tabelle 29: Multivariate Analyse mittels Cox-Regression unter Einbezug der pc-Jun-Expressionslevels

Variable	Rezidivfreies Intervall		Signifikanz
	HR	95% CI	
pc-Jun	1,73	1,04-2,87	p=0,034
FIGO-Stadium	12,55	1,48-106,50	p=0,020
Histologie	0,79	0,40-1,55	p=0,494
Nodalstatus	2,03	1,13-3,68	p=0,018
Grading	1,02	0,42-2,49	p=0,961
OP-Ergebnis	5,54	1,99-15,45	p=0,001

Variable	Gesamtüberleben		
	HR	95% CI	Signifikanz
pc-Jun	1,59	0,89-2,83	p=0,116
FIGO-Stadium	8,65	1,58-47,50	p=0,013
Histologie	1,06	0,55-2,07	p=0,861
Nodalstatus	1,37	0,74-2,51	p=0,316
Grading	1,39	0,42-4,66	p=0,593
OP-Ergebnis	6,56	2,49-17,30	p<0,001

3.3.3 JunB

Die Auswertung der JunB-Expression der 161 Primärtumoren ergibt Expressionsstärken zwischen 21,1% und 1278,0% im Vergleich zur MDA-MB-231-Positivkontrolle. Der Mittelwert der Expression ist 303,3%. Der Median liegt bei 188,6%.

Die Verteilung der Expressionswerte ist in der Abbildung 30 zu sehen. Die Abbildung 31 zeigt die Verteilung der logarithmischen JunB-Expressionen.

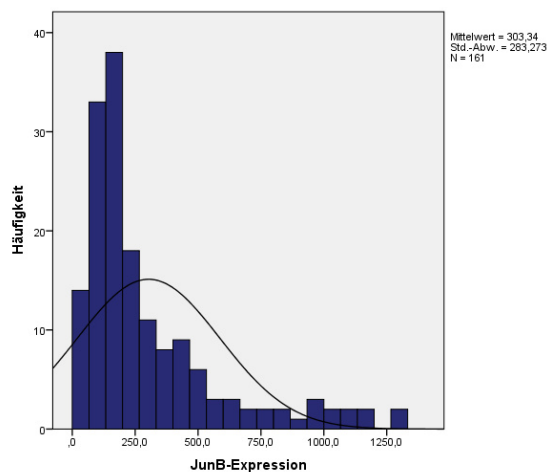


Abbildung 30: Verteilung der JunB-Expressionswerte

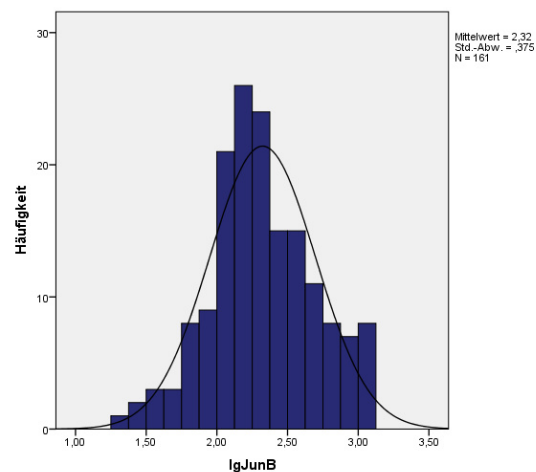


Abbildung 31: Verteilung der logarithmischen JunB-Expressionswerte (lgJunB)

In der Abbildung 32 ist ein Beispiel eines JunB-Western Blots mit dazugehöriger hsc-70-Gelladekontrolle dargestellt.

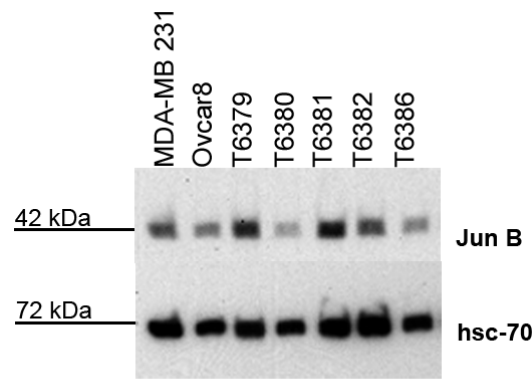


Abbildung 32: Beispielfilm eines JunB-Western-Blots (mit hsc-70-Gellade-Kontrolle)

Die neoadjuvanten Tumoren (n=8) zeigen Expressionen im Bereich von 45,2% bis 880,5%. Der Mittelwert ist 324,1%, der Median ist 201,6%. Die vier untersuchten Rezidivtumoren weisen im Mittel eine JunB-Expression in Höhe von 257,8% auf. Deren Median liegt bei 161,3%. Die geringste Expression beträgt 56,3%, die höchste 652,3%.

Die Durchführung des T-Testes unabhängiger Stichproben zum Vergleich der Mittelwerte der Primärtumoren, der Tumoren nach neoadjuvanter CTx sowie der Rezidivtumoren zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den genannten Kollektivgruppen.

Alle weiteren statistischen Analysen wurden allein mit dem Primärtumor-Kollektiv durchgeführt (n=161).

Die Untersuchung von Korrelationen zwischen der Höhe der JunB-Expression und der Expression der weiteren untersuchten Jun-Proteine durch den Spearman-Rho-Test ergab eine signifikante, aber schwache positive Korrelation bezüglich der Höhe der JNK- und JunD-Expression. Tabelle 30 stellt die Korrelationskoeffizienten und die Signifikanzwerte aller untersuchten Parameter dar.

Tabelle 30: Korrelationen zwischen JunB und anderen Jun-Proteinen (mittels Spearman-Rho-Tests)

Protein	Korrelationskoeffizient	Signifikanz
c-Jun	r=0,226	p=0,096
pc-Jun	r=0,152	p=0,069
JNK	r=0,372	p<0,001
JunD	r=0,227	p=0,004

Wie bereits bei der c-Jun-Auswertung geschehen, wurden auch im Falle von JunB zur Vereinfachung der Überlebensanalyse Expressionstertiale gebildet. Das Kollektiv wurde daher entsprechend der Grenzwerte 143,030% und 284,406% in ein Tertial 1 mit einer geringen Expression, ein Tertial 2 mit einer mittleren Expression sowie ein Tertial 3 mit einer hohen Expression unterteilt.

Die Überlebenszeitanalyse mittels eines Log-Rank-Testes ergibt keine signifikanten Ergebnisse bezüglich des Gesamtüberlebens ($p=0,174$) sowie des rezidivfreien Intervalls ($p=0,097$). Die genauere Betrachtung des rezidivfreien Intervalls bei den einzelnen JunB-Tertialen zeigt aber die Tendenz, dass die Tumoren mit einer geringeren JunB-Expression (Tertial 1) eher ein verlängertes rezidivfreies Intervall aufweisen.

Die Abbildungen 33 und 34 zeigen die Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben sowie zum rezidivfreien Intervall in Abhängigkeit der jeweiligen JunB-Expressions-Tertiale.

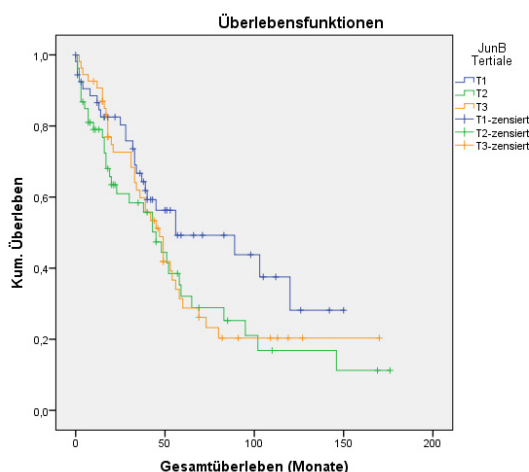


Abbildung 33: Kaplan-Meier-Kurve JunB-Expression und Gesamtüberleben (T1=niedrige Expression, T2=mittlere Expression, T3=hohe Expression) [$p=0,174$]

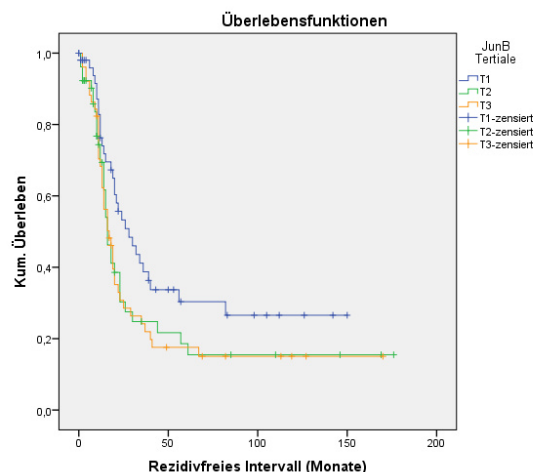


Abbildung 34: Kaplan-Meier-Kurve JunB-Expression und rezidivfreies Intervall (T1=niedrige Expression, T2=mittlere Expression, T3=hohe Expression) [$p=0,097$]

Die Analyse auf Zusammenhänge zwischen der JunB-Expressionshöhe und bereits etablierten Prognosefaktoren mit Hilfe des χ^2 -Tests ergab keinerlei signifikante Werte. Tabelle 15 zeigt die jeweiligen Signifikanzwerte der untersuchten Prognosefaktoren.

Tabelle 31: Korrelationen zwischen JunB und bekannten Prognoseparametern (mittels χ^2 -Tests)

Prognoseparameter	Signifikanz
FIGO-Stadium	p=0,567
FIGO-Gruppen (FIGO I+II / FIGO III/ FIGO IV)	p=0,593
Histologie	p=0,168
Nodalstatus	p=0,255
Metastasenstatus	p=0,572
Aszitesmenge	p=0,174
Aszites-Gruppen (0ml/ >0ml-500ml/ >500ml-1000ml/ >1000ml)	p=0,267
Asziteszytologie (maligne Zellen/ keine malignen Zellen)	p=0,391
Grading	p=0,669
Grading-Gruppen (G1+G2 / G3)	p=0,335
Alter bei Erstdiagnose	p=0,474

3.3.4 JunD

Die Auswertung der 161 Primärtumoren zeigt eine mittlere JunD-Expression in Höhe von 187,9% im Vergleich zur Ovarcar8-Positivkontrolle. Der Median beträgt 113,9%. Das Expressionsminimum liegt bei 2,9%. Die maximal gemessene Expression beträgt 1440,6%.

Die 8 untersuchten Tumoren nach neoadjuvanter Chemotherapie weisen im Mittel eine JunD-Expression von 116,1% auf. Der Median liegt bei 95,9%. Innerhalb dieser Tumoren reichte die JunD-Expression von 16,8% bis zu 293,3%. Die Rezidivtumoren (n=4) zeigen Expressionswerte im Bereich von 8,3% bis zu 286,2%. Der Mittelwert der JunD-Expression beträgt 142,0%. Der Median liegt hier bei 136,8%.

Beim Vergleich der Mittelwerte der JunD-Expression aller zuvor genannten Kollektivgruppen mittels des T-Testes resultieren keine signifikanten Korrelationen.

Die Verteilungen der JunD-Expressionswerte sowie deren Logarithmus zeigen die Abbildungen 35 und 36.

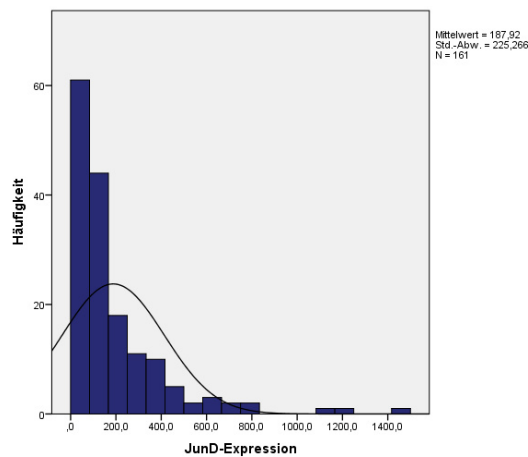


Abbildung 35: Verteilung der JunD-Expressionswerte

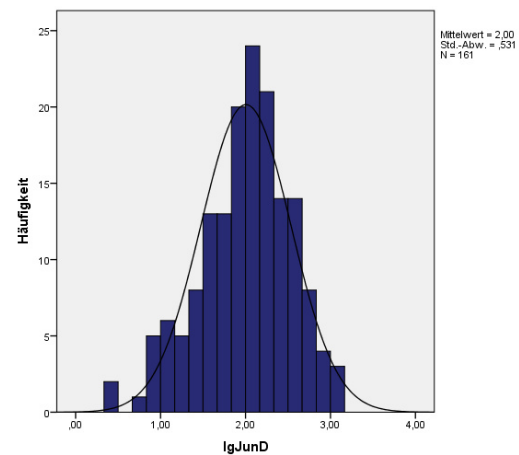


Abbildung 36: Verteilung der logarithmischen JunD-Expressionswerte (lgJunD)

Die folgende Abbildung 37 zeigt einen Beispielfilm eines JunD-Western Blots mit der dazugehörigen hsc-70-Kontrolle.

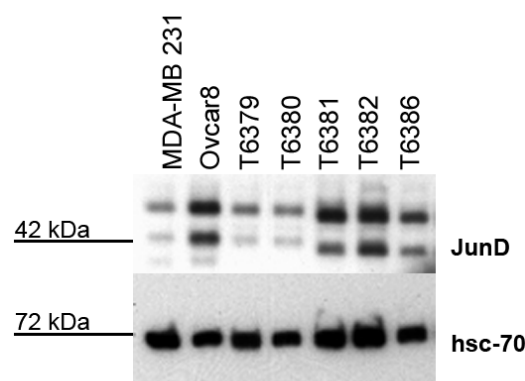


Abbildung 37: Beispielfilm eines JunD-Western-Blots (mit hsc-70-Gellade-Kontrolle)

Alle weiteren statistischen Analysen erfolgten unter alleiniger Betrachtung der Primärtumoren (n=161).

Die Spearman-Rho-Analyse der JunD-Expression zeigt schwache positive Korrelationen zu allen anderen getesteten Proteinen. Genauer ist in der Tabelle 32 abgebildet.

Tabelle 32: Korrelationen zwischen JunD und anderen Jun-Proteinen (mittels Spearman-Rho-Tests)

Protein	Korrelationskoeffizient	Signifikanz
c-Jun	r=0,251	p=0,001
pc-Jun	r=0,272	p=0,001
JNK	r=0,332	p<0,001
JunB	r=0,227	p=0,004

Auch im Falle von JunD wurden für die Auswertung der Überlebenszeitanalyse Tertiale gebildet. Die Cut-Off-Werte teilen das Kollektiv in 3 gleich große Gruppen. Sie lagen bei 70,341% sowie bei 174,882%. Die Tumoren des Tertials 1 zeigen eine niedrige Expression, die Tumoren des Tertials 2 eine mittlere und die Tumoren des Tertials 3 eine hohe JunD-Expression.

Die Überlebenszeitanalyse durch einen Log-Rank-Test zeigt signifikante Ergebnisse bezüglich des Gesamtüberlebens (32 vs. 42 vs. 35,5 Monate für schwache, mittelstarke und starke Expression; $p=0,009$), als auch bezüglich des rezidivfreien Intervalls (14 vs. 19,5 vs. 16 Monate für schwache, mittelstarke und starke Expression; $p=0,011$). Dabei haben Patientinnen mit Tumoren, die eine mittlere JunD-Expression aufweisen und somit zum Tertial 2 gehören, ein längeres Überleben und rezidivfreies Intervall. Die Abbildungen 38 und 39 zeigen die Kaplan-Meier-Kurven zu den jeweiligen Expressionstertialen.

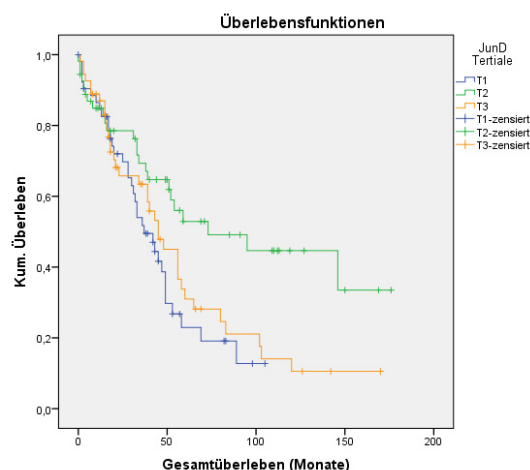


Abbildung 39: Kaplan-Meier-Kurve JunD-Expression und Gesamtüberleben (T1=niedrige Expression, T2=mittlere Expression, T3=hohe Expression) [$p=0,009$]

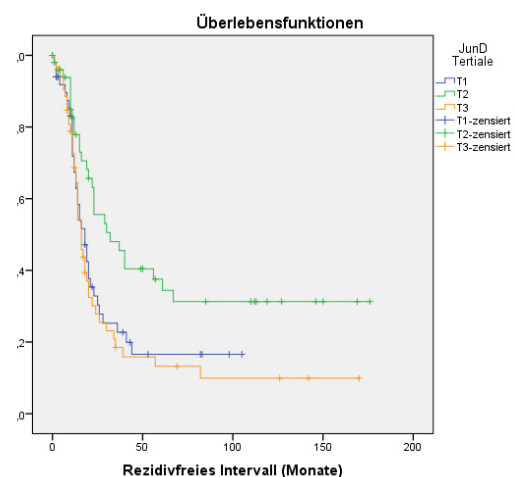
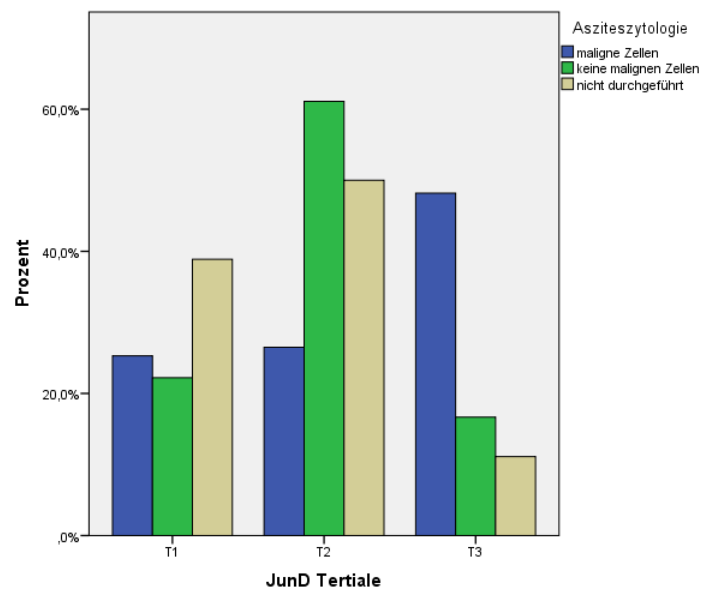


Abbildung 38: Kaplan-Meier-Kurve JunD-Expression und rezidivfreies Intervall (T1=niedrige Expression, T2=mittlere Expression, T3=hohe Expression) [$p=0,011$]

Die Untersuchung von Korrelationen zwischen der JunD-Expression und bekannten Prognosefaktoren zeigt lediglich eine positive Korrelation zur Asziteszytologie ($p=0,004$). JunD scheint somit unabhängig von diesen getesteten Prognoseparametern zu sein. Tabelle 33 zeigt die Signifikanz-Werte der getesteten Faktoren.

Tabelle 33: Korrelationen zwischen JunD-Tertialen und bekannten Prognoseparametern (mittels χ^2 -Tests)

Prognoseparameter	Signifikanz
FIGO-Stadium	p=0,254
FIGO-Gruppen	p=0,093
(FIGO I+II / FIGO III+IV)	
Histologie	p=0,124
Nodalstatus	p=0,110
Metastasenstatus	p=0,493
Aszitesmenge	p=0,903
Aszites-Gruppen	p=0,466
(0ml/ >0ml-500ml/ >500ml-1000ml/ >1000ml)	
Asziteszytologie	p=0,004
(maligne Zellen/ keine malignen Zellen)	
Grading	p=0,922
Grading-Gruppen	p=0,884
(G1+G2 / G3)	
Alter bei Erstdiagnose	p=0,474

**Abbildung 40:** Pathologische Befunde der Asziteszytologien in den einzelnen JunD-Tertialen

Die multivariate Analyse mittels Cox-Regression unter Einbezug der JunD-Proteinexpression, des Gratings, des Nodalstatus, des OP-Ergebnis, des FIGO-Stadiums sowie der histologischen Klassifikation zeigt ein signifikant kürzeres Überleben bei niedrigen JunD-Expressionswerten (Tertial 1), bei einem postoperativem Residualtumor von >1 cm sowie bei einem fortgeschrittenem Stadium FIGO IV. Niedrige JunD-Expressionslevel (Tertial 1) erhöhen das Letalitätsrisiko um das 2,16fache [95%CI: 1,144-4,074; **p=0,018**] im Vergleich zu Tumoren mit mittlerer

JunD-Expression (Tertial 2). Ein signifikanter unabhängiger Einfluss der JunD-Expression auf das rezidivfreie Überleben konnte in dieser multivariaten Betrachtung nicht nachgewiesen werden. Dahingegen zeigen die fortgeschrittenen Stadien FIGO III und FIGO IV, ein positiver Nodalstatus sowie der Verbleib eines postoperativen Resttumors > 1cm eine signifikante Verkürzung des rezidivfreien Intervalls. In der Tabelle 34 sind die Hazard Ratios, die 95%-Konfidenzintervalle sowie die Signifikanzwerte der in diesen Cox-Regressionen berücksichtigten Parameter dargestellt.

Tabelle 34: Multivariate Analyse mittels Cox-Regression unter Einbezug der JunD-Expressionslevels

Rezidivfreies Intervall			
Variable	HR	95% CI	Signifikanz
JunD	1,22	0,01-2,13	p=0,480
FIGO-Stadium	12,13	1,45-101,73	p=0,036
Histologie	0,78	0,40-1,53	p=0,471
Nodalstatus	2,02	1,17-3,50	p=0,012
Grading	1,06	0,42-2,67	p=0,898
OP-Ergebnis	5,82	2,09-16,21	p=0,001
Gesamtüberleben			
Variable	HR	95% CI	Signifikanz
JunD	2,16	1,14-4,07	p=0,018
FIGO-Stadium	3,65	1,12-31,96	p=0,036
Histologie	0,82	0,42-1,60	p=0,562
Nodalstatus	1,48	0,82-2,68	p=0,197
Grading	1,94	0,57-6,66	p=0,290
OP-Ergebnis	9,87	3,96-24,62	p<0,001

3.3.5 JNK

Die 161 untersuchten Primärtumoren zeigen JNK-Expressionen innerhalb von 0,7% bis zu 1149,7% im Vergleich zur MDA-MB-231-Positivkontrolle. Der Mittelwert beträgt 131,9%, der Median 49,4%.

Die Werteverteilungen der JNK-Western Blots zeigen die Abbildungen 41 und 42.

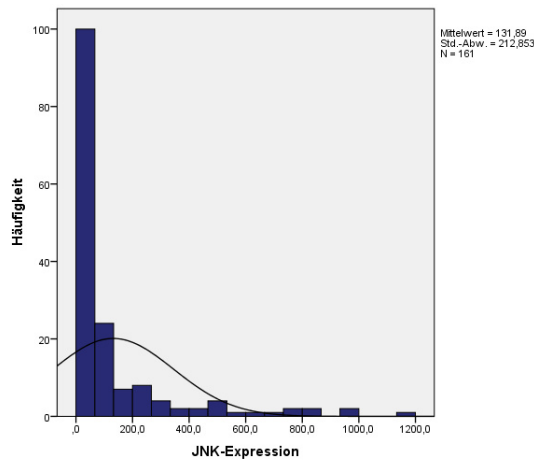


Abbildung 42: Verteilung der JNK-Expressionswerte

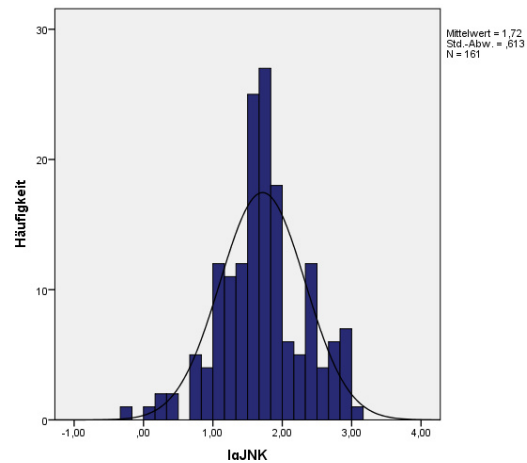


Abbildung 41: Verteilung der logarithmischen JNK-Expressionswerte lg(JNK)

Die Abbildung 43 zeigt ein Beispiel eines JNK-Filmes sowie die dazugehörige hsc-70-Kontrolle.

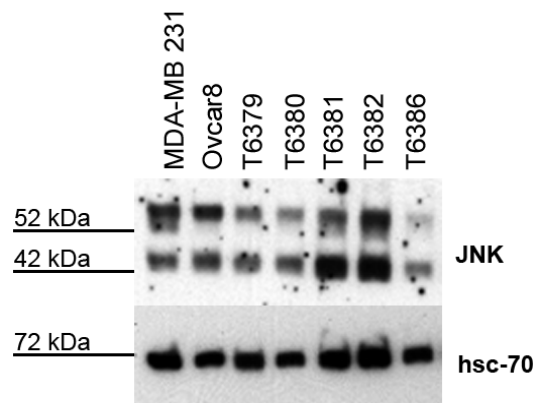


Abbildung 43: Beispielfilm eines JNK-Western-Blots (mit hsc-70-Gellade-Kontrolle)

Die Tumoren nach neoadjuvanter Chemotherapie (n=8) weisen JNK-Expressionen im Bereich von 5,6% und 330,5% auf. Der Mittelwert liegt bei 66,2%, der Median bei 27,7%. Die vier untersuchten Rezidivtumoren hatten im Mittel eine JNK-Expression von 75,1%. Der Median liegt hier bei 38,1%. Die minimale gemessene Expression beträgt 9,3%, das Maximum beträgt 214,7%.

Der T-Test zum Vergleich der Mittelwerte der JNK-Expression aller zuvor genannten Kollektivgruppen ergibt keine signifikanten Ergebnisse.

Alle weiteren statistischen Analysen erfolgten allein mit den untersuchten Primärtumoren (n=161).

Die Untersuchung auf Zusammenhänge zwischen der JNK-Expression und der Expression der Jun-Proteine mittels Spearman-Rho-Tests zeigt für alle Jun-Proteine schwache positive Korrelationen. Die Tabelle 35 zeigt die jeweiligen Korrelationskoeffizienten und P-Werte.

Tabelle 35: Korrelationen zwischen JNK und anderen Jun-Proteinen (mittels Spearman-Rho-Tests)

Protein	Korrelationskoeffizient	Signifikanz
c-Jun	$r=0,376$	$p<0,001$
pc-Jun	$r=0,256$	$p=0,002$
JunD	$r=0,332$	$p<0,001$
JunB	$r=0,372$	$p<0,001$

Zur Vereinfachung der Überlebenszeitanalyse erfolgte eine Einteilung der Tumoren nach der Höhe der JNK-Expression. Das Tertial 1 wird demnach von Tumoren mit einer vergleichbar geringen JNK-Expression gebildet. Das Tertial 2 besteht aus Tumoren mit einer mittleren Expression und das Tertial 3 aus Tumoren mit einer hohen JNK-Expression. Die Grenzwerte für die Einteilung der Tertiale liegen bei 34,008% sowie bei 76,892%.

Die Überlebenszeitanalyse mittels Log-Rank-Test ergibt keine signifikanten Unterschiede der einzelnen JNK-Expressionstertiale in Hinblick auf das Gesamtüberleben. Es zeigt sich aber eine schwache Tendenz für ein längeres Gesamtüberleben bei Tumoren mit mittlerer JNK-Expression (34 vs. 47 vs. 18 Monate für schwache, mittelstarke und starke Expression; $p=0,101$). Bei der Betrachtung des rezidivfreien Intervalls ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen JNK-Expressionstertialen. Die Tumoren des Tertials 2 weisen ein signifikant längeres rezidivfreies Intervall auf (17 vs. 23 vs. 11 Monate für schwache, mittelstarke und starke Expression; $p=0,010$). Eine mittlere JNK-Expression scheint also einen positiven Einfluss auf das rezidivfreie Intervall zu haben. Die Abbildungen 44 und 45 zeigen die Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Intervalls für die einzelnen JNK-Tertiale.

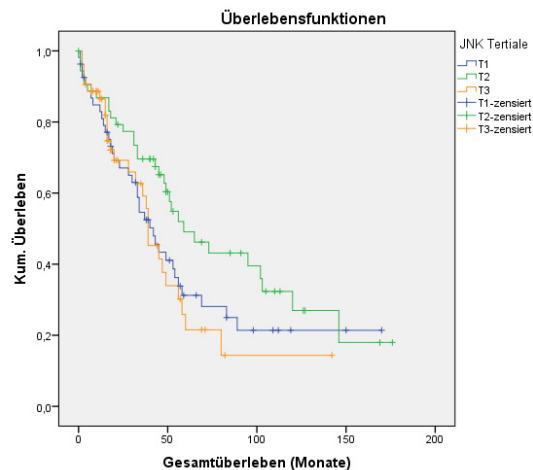


Abbildung 44: Kaplan-Meier-Kurve JNK-Expression und Gesamtüberleben (T1=niedrige Expression, T2=mittlere Expression, T3=hohe Expression) [p=0,101]

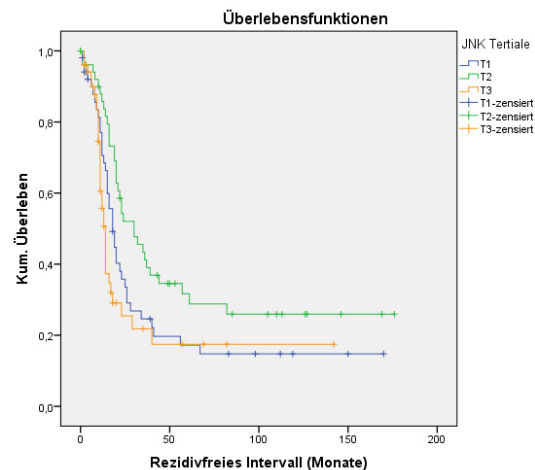


Abbildung 45: Kaplan-Meier-Kurve JNK-Expression und rezidivfreies Intervall (T1=niedrige Expression, T2=mittlere Expression, T3=hohe Expression) [p=0,010]

Die Analyse von Zusammenhängen zwischen der JNK-Expression und bekannten Prognosefaktoren mittels des χ^2 -Tests ergibt keine signifikanten Korrelationen. JNK scheint somit unabhängig von diesen getesteten Prognoseparametern zu sein. Tabelle 36 zeigt die Signifikanz-Werte der untersuchten Faktoren.

Tabelle 36: Korrelationen zwischen JNK und bekannten Prognoseparametern (mittels χ^2 -Tests)

Prognoseparameter	Signifikanz
FIGO-Stadium	p=0,233
FIGO-Gruppen (FIGO I+II / FIGO III/ FIGO IV)	p=0,178
Histologie	p=0,706
Nodalstatus	p=0,119
Metastasenstatus	p=0,473
Aszitesmenge	p=0,361
Aszites-Gruppen (0ml/ >0ml-500ml/ >500ml-1000ml/ >1000ml)	p=0,094
Asziteszytologie (maligne Zellen/ keine malignen Zellen)	p=0,065
Grading	p=0,577
Grading-Gruppen (G1+G2 / G3)	p=0,777
Alter bei Erstdiagnose	p=0,473

Die multivariate Analyse mittels Cox-Regression unter Einbezug der JNK-Proteinexpression, des Gratings, des Nodalstatus, des OP-Ergebnis, des FIGO-Stadiums sowie der histologischen Klassifikation zeigt ein signifikant kürzeres Überleben bei einem postoperativem Residualtumor von >1 cm sowie bei einem fortgeschrittenem Stadium FIGO IV. Bei einer Betrachtung des Einflusses auf das rezidivfreie Intervall zeigt sich, wie zuvor bei der Kaplan-Meier-Analyse eine Verkürzung des Intervalls bei reduzierten oder erhöhten JNK-Expressionswerten (Tertial 1 und Tertial 3). Niedrige JNK-Levels erhöhen die Rezidivgefahr um das 1,67fache [95%CI: 1,010-2,769; **p=0,046**], hohe Expressionslevels nahezu um das 2fache [95%CI: 1,119-3,416; **p=0,019**]. Ebenso haben erneut fortgeschrittene FIGO-Stadien (FIGO III und IV), ein positiver Nodalstatus sowie ein postoperativer Residualtumor >1 cm einen signifikant negativen Einfluss auf die Rezidivfreiheit. Die folgende Tabelle 37 zeigt die entsprechenden Hazard Ratios, 95%-Konfidenzintervalle und Signifikanzwerte der erfolgten Cox-Regressionen.

Tabelle 37: Multivariate Analyse mittels Cox-Regression unter Einbezug der JNK-Expressionslevels

Rezidivfreies Intervall			
Variable	HR	95% CI	Signifikanz
JNK (T1)	1,672	1,01-2,77	p=0,046
JNK (T3)	1,955	1,12-3,42	p=0,019
FIGO-Stadium	12,015	1,45-99,57	p=0,021
Histologie	0,709	0,36-1,38	p=0,314
Nodalstatus	2,153	1,24-3,74	p=0,006
Grading	1,032	0,42-2,57	p=0,946
OP-Ergebnis	5,973	2,11-16,88	p=0,001
Gesamtüberleben			
Variable	HR	95% CI	Signifikanz
JNK (T1)	1,708	0,97-3,00	p=0,062
JNK (T3)	1,560	0,87-2,81	p=0,139
FIGO-Stadium	7,455	1,40-39,82	p=0,019
Histologie	0,891	0,47-1,71	p=0,728
Nodalstatus	1,577	0,87-2,86	p=0,134
Grading	1,605	0,47-5,51	p=0,452
OP-Ergebnis	9,669	3,84-24,36	p<0,001

3.4 Korrelationen der Jun-Proteine zu den Fos-Proteinen

Die Untersuchung auf bivariate Korrelationen (nach Spearman-Rho) zwischen den einzelnen Jun-Proteinen und den Fos-Proteinen ergibt schwache Korrelationen zwischen JunD und Fra1, Fra2 sowie c-Fos. Tabelle 38 zeigt die jeweiligen Korrelationskoeffizienten und deren Signifikanzwerte.

Tabelle 38: Korrelationen zwischen Jun-Proteinen, der JNK und Fos-Proteinen
(mittels Spearman-Rho-Test)

	Fra1	Fra2	FosB	c-Fos
c-Jun	r=0,127 p=0,302	r=0,113 p=0,357	r=0,123 p=0,318	r=0,081 p=0,081
pc-Jun	r=0,034 p=0,781	r=0,221 p=0,070	r=-0,151 p=0,219	r=-0,130 p=0,292
JunB	r=0,044 p=0,720	r=0,122 p=0,363	r=0,094 p=0,445	r=-0,083 p=0,499
JunD	r=0,454 p<0,001	r=0,536 p<0,001	r=0,157 p=0,200	r=0,264 p=0,030
JNK	r=0,198 p=0,106	r=0,171 p=0,164	r=0,231 p=0,058	r=0,140 p=0,256

3.5 Ergebnisse der JunD-Immunhistochemie des Hamburger Patientenkollektivs

In der Abbildung 46 a-c sind immunhistochemisch gefärbte Ovarialkarzinompräparate des Hamburger Kollektivs absteigend mit hoher JunD-Expression, mittelstarker sowie niedriger Expression dargestellt.

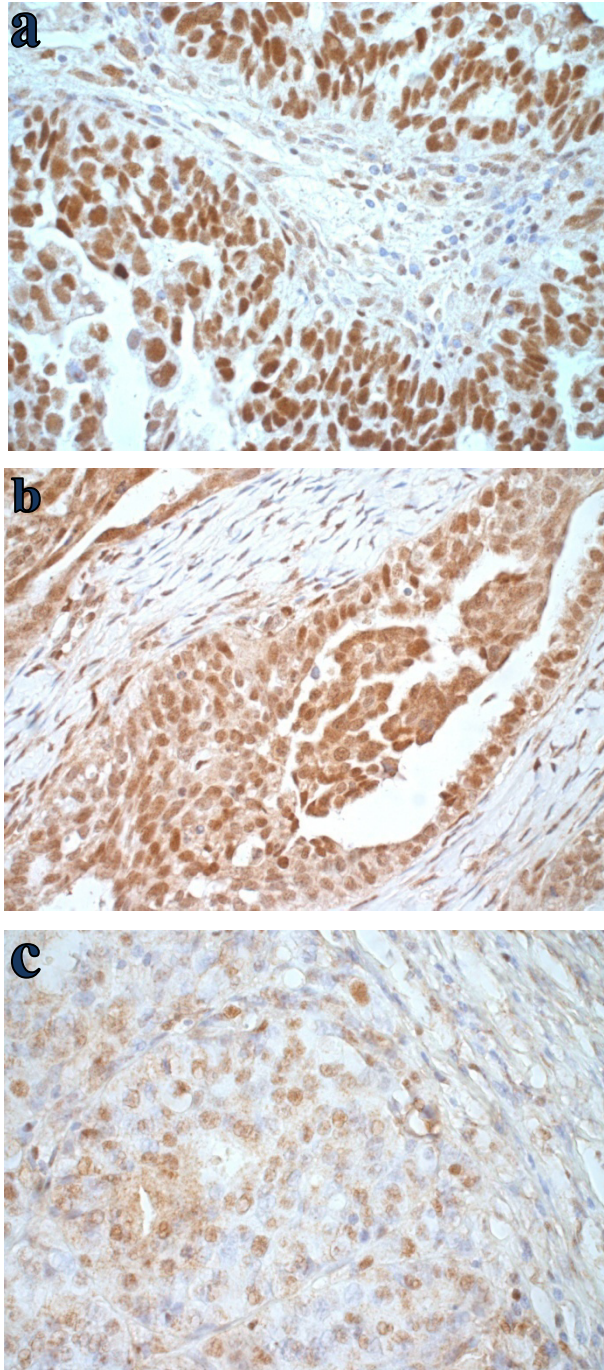


Abbildung 46a-c: JunD-Immunhistochemie Hamburger Kollektiv

- a) Ovarialkarzinom, serös-papillär, G3, starke JunD-Expression
 - b) Ovarialkarzinom, serös-papillär, G3, mittelstarke JunD-Expression
 - c) Ovarialkarzinom, serös-papillär, G3, schwache JunD-Expression
- Vergrößerung: 200fach

Es bestätigte sich eine überwiegend intratumorale und intranukleäre Expression von JunD. Die umliegenden Stromasträßen wiesen meist keine oder eine schwache Anfärbung auf. Teilweise zeigten sich schwache zytoplasmatische Anfärbungen. Einige Tumoren zeigten stärkere Reaktionen im Bereich der Invasionsfront.

Sieben der insgesamt 14 immunhistochemisch untersuchten Präparate des Hamburger Kollektivs zeigten eine schwache JunD-Kernfärbung. Zwei Präparate (14,3%) eine mittelstarke und 5 (35,7%) eine starke Färbung. Die entsprechenden Häufigkeiten der Stärke der Kernfärbungen sind in Abbildung 47 dargestellt.

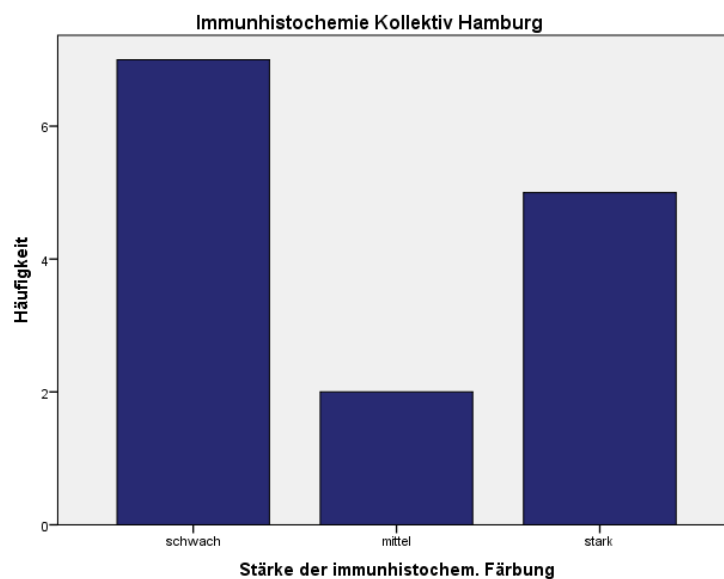


Abbildung 47: Häufigkeiten der Stärke der immunhistochemischen JunD-Kernfärbungen im Hamburger Kollektiv

3.6 Beschreibung des Würzburger Patientenkollektivs

Es wurden insgesamt 65 Ovarialtumorproben des Würzburger Kollektivs hinsichtlich der immunhistochemischen JunD-Expression untersucht.

Tabelle 39: Klinisch-pathologische Daten des Würzburger Patientenkollektivs

Würzburger Patientenkollektiv		n=65	n=65	
Alter (in Jahren)			Chemotherapie	
Mittelwert	56,5		Platin-haltig	47
Median	58		keine Chemotherapie	16
Bereich	24-80		unbekannt	2
FIGO-Klassifikation			Erstrezidiv	
FIGO I	19		ja	15
FIGO II	8		nein	25
FIGO III	36		unbekannt	25
FIGO IV	2			
Grading			Materialart	
G1	4		Primärtumorgewebe	64
G2	16		Z.n. neoadjuvanter Therapie	1
G3	18		Im Beobachtungszeitraum verstorben	
Unbekannt	27		verstorben	20
			nicht verstorben/fehlend	45
OP-Ergebnis				
Tumorfrei	32		Rezidivfreies Intervall (in Monaten)	
Tumorrest > 1cm	30		Mittelwert	30,3
Unbekannt	3		Median	24
			Bereich	9-136
Histologie			unbekannt	50
serös-papillär	43			
Borderline	19		Gesamtüberleben (in Monaten)	
Gemischt	3		Mittelwert	39,8
			Median	19
			Bereich	1-252

3.7 Ergebnisse der JunD-Immunhistochemie des Würzburger Patientenkollektivs

Insgesamt wurden 65 Tumorproben des Würzburger Kollektivs immunhistochemisch untersucht. Die nachfolgende Abbildung 48 a-c zeigt beispielhaft immunhistochemisch gefärbte Tumorpräparate. Sie sind absteigend mit starker JunD-Expression, mittelstarker sowie niedriger JunD-Expression dargestellt.

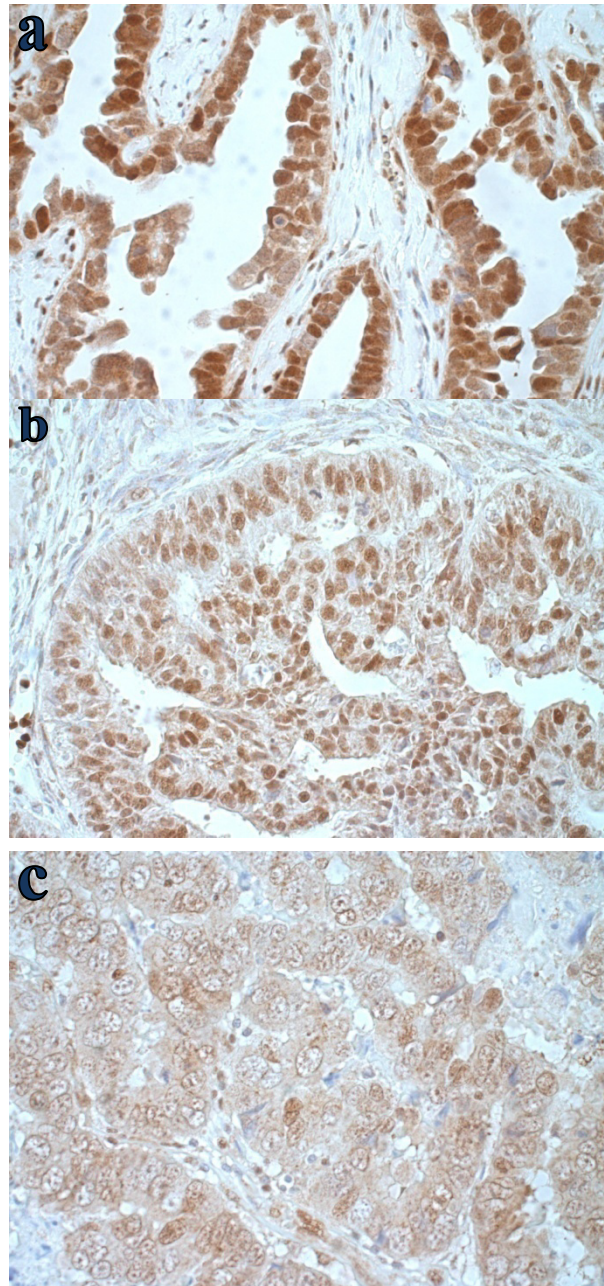


Abbildung 48a-c: JunD-Immunhistochemie Würzburger Kollektiv

- a) Ovarialkarzinom, serös-papillär, G3, starke JunD-Expression
 - b) Ovarialkarzinom, serös-papillär, G2, mittelstarke JunD-Expression
 - c) Ovarialkarzinom, serös-papillär, G3, schwache JunD-Expression
- Vergrößerung: 200fach

Insgesamt zeigten 20 (30,8%) der 65 immunhistochemisch gefärbten Präparate eine schwache JunD-Kernfärbung. Bei 23 (35,4%) Tumorpräparaten konnte eine mittelstarke Färbung nachgewiesen werden. 22 (33,8%) Ovarialkarzinomschnitte wiesen eine starke JunD-Färbung auf. Das Balkendiagramm der Abbildung 49 veranschaulicht die Verteilung.

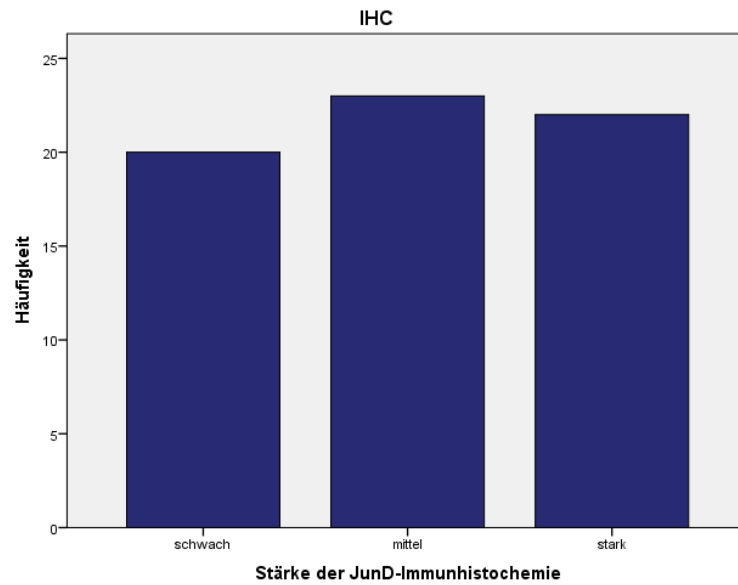


Abbildung 49: Häufigkeiten der Stärke der immunhistochemischen JunD-Kernfärbungen im Würzburger Kollektiv

Die Überlebenszeitanalyse (n=35) mittels Log-Rank-Tests zeigt signifikante Ergebnisse bezüglich des Gesamtüberlebens ($p=0,027$). Dabei haben Patientinnen mit Tumoren, die in der Immunhistochemie eine starke Färbung aufwiesen, ein längeres Überleben. Die Abbildung 50 zeigt die entsprechende Kaplan-Meier-Kurve.

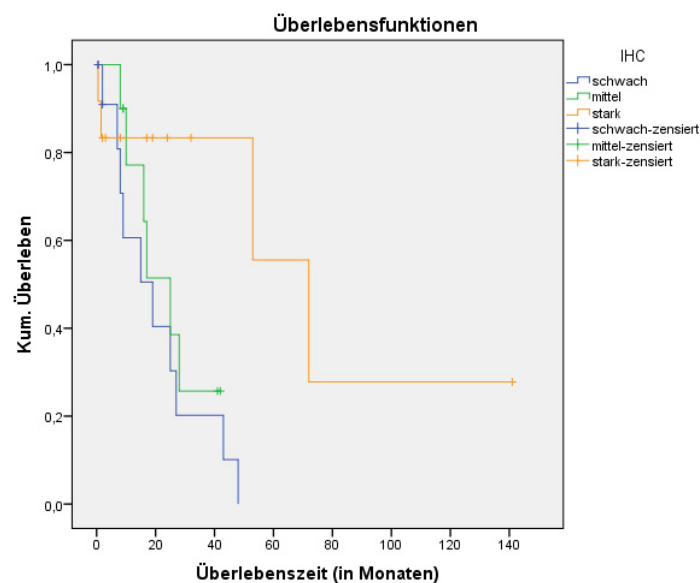


Abbildung 50: Kaplan-Meier-Kurve Stärke der Färbung in der JunD-Immunhistochemie und Gesamtüberleben [$p=0,027$]

Die Untersuchung auf etwaige Zusammenhänge zwischen der Stärke der Färbung innerhalb der JunD-Immunhistochemie und bekannten Prognosefaktoren ergab keine signifikanten Ergebnisse. Die folgende Tabelle 40 zeigt die Signifikanzwerte der betrachteten Parameter.

Tabelle 40: Korrelationen zwischen der JunD-Immunhistochemie des Würzburger Kollektivs und bekannten Prognoseparametern (mittels χ^2 -Tests)

Prognoseparameter	Signifikanz
FIGO-Stadium	p=0,373
FIGO-Gruppen (FIGO I+II / FIGO III/ FIGO IV)	p=0,735
Histologie	p=0,992
Grading	p=0,752
Grading-Gruppen (G1+G2 / G3)	p=0,824
Alter bei Erstdiagnose	p=0,340

4. Diskussion

Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Frau Dr. rer. nat. Milde-Langosch anhand eines kleineren Patientenkollektivs zeigten bereits, dass die Höhe der Jun-Expression möglicherweise einen prognostischen Parameter für das Ovarialkarzinom darstellt. So fanden sich in malignen Ovarialkarzinomen signifikant erhöhte pc-Jun-, JunB- und JunD-Proteinexpressionen im Vergleich zu Borderline-Tumoren und Normalgewebe (Hein et al. 2009). Diese Arbeit diene daher der genaueren Differenzierung dieser prognostischen Bedeutung unter Betrachtung des Einflusses der Jun-Proteine auf das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Intervall. Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen sowie immunhistochemischen Untersuchungen an zwei voneinander unabhängigen Patientinnenkollektiven konnte erstmalig ein Einfluss von JunD, pc-Jun und JNK auf die Tumorprogression im Ovarialkarzinom nachgewiesen werden.

4.1 Grenzen der verwendeten Methodik

Das Western-Blotting ist eine etablierte und sehr spezifische Methodik zum Proteinnachweis beispielsweise in Tumorproben. Es erlaubt zudem eine semiquantitative Bestimmung des Proteingehalts einer Probe. Dennoch hat diese Methodik Grenzen, die im Folgenden aufgezeigt werden sollen.

Die durch das Verfahren des Western-Blottings hervorgerufene Schwärzung eines Films ist innerhalb eines bestimmten Bereiches direkt proportional zur Proteinkonzentration in der untersuchten Probe. Sehr hohe Proteingehalte können durch eine Sättigung der Schwärzungsfähigkeit des Filmes mitunter nicht mehr genau differenziert werden.

Innerhalb dieser Arbeit wurde sichergestellt, dass die für die Proteinextraktion verwendeten Gewebeproben einen Tumoranteil von >70% aufweisen. Hierfür wurden die entsprechenden Proben nach HE gefärbt, mikroskopisch untersucht und ggf. zugeschnitten. Somit kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass die ermittelten Proteinexpressionen auf Stromagewebe, welches möglicherweise andere Expressionsmuster aufweist, zurückzuführen sind.

Ovarialtumoren entwickeln schnell große Tumervolumina. In fortgeschrittenen Stadien gibt es zudem häufig weitläufige peritoneale Aussaaten. Es ist denkbar, dass sich das

Tumorgewebe bezüglich der Proteinexpression je nach Tumorsitz unterscheidet. Innerhalb der Debulking-Operationen der Patientinnen wurden verschiedenste kleine Gewebestücke entnommen. Der genaue Entnahmeort war dabei meist nicht bekannt.

Darüber hinaus sollte bedacht werden, dass es in Tumoren sehr wahrscheinlich eine Inhomogenität bezüglich der Proteinexpression gibt. Die Invasionsfront kann tumorbiologisch anders beschaffen sein als innenliegende Tumorbereiche, die bereits nekrotisieren. So konnten in der JunD-Immunhistochemie bei einigen Tumoren stärkere Färbungen im Bereich der Invasionsfronten beobachtet werden.

Die Immunhistochemie ist ebenfalls eine sehr spezifische Methodik, insbesondere zum Nachweis der genauen Proteinlokalisationen. Bei den Jun-Transkriptionsfaktoren handelt es sich um nukleäre Proteine. Innerhalb von Tumoren könnte es jedoch auch zu Veränderungen des nukleären Transports kommen, sodass eine Expression im Zytoplasma auch denkbar wäre. Dies würde erklären, dass einige Tumoren des Kollektivs in der JunD-Immunhistochemie auch schwache zytoplasmatische Färbungen zeigten.

4.2 Western-Blot-Analysen des Hamburger Kollektivs

4.2.1 c-Jun

Im Vergleich zur MDA-MB-231-Positivkontrolle wies der Großteil der untersuchten Tumorproben eher niedrige c-Jun-Expressionen auf (Mittelwert: 24,3%, Median 16,4%). Die untersuchten Tumoren dieses Kollektivs unterschieden sich sehr stark, teilweise um das Hundertfache, in Bezug auf die Höhe der gemessenen Proteinexpression. Dies gilt im Falle von c-Jun, aber auch für die anderen analysierten Jun-Proteine und die JNK. Neyns et. al konnten diese Variabilität anhand ihrer Northern Blot Analysen ebenfalls feststellen (Neyns et al. 1996).

Bezüglich der Expressionshöhe konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Gewebe nach neoadjuvanter Therapie, Primärtumorgewebe und Rezidivgewebe festgestellt werden. Die Tumoren nach neoadjuvanter Therapie schienen im Vergleich zu den Rezidiven tendenziell eine höhere c-Jun-Expression aufzuweisen ($p=0,098$). Die Fallzahlen der Tumoren nach neoadjuvanter Therapie ($n=8$) und der Rezidivgewebe ($n=4$) waren allerdings sehr klein. So ist es möglich, dass vorhandene Unterschiede mit den hier durchgeführten Analysen nicht korrekt aufgedeckt werden konnten. Selbiges

gilt für die Vergleiche der Gewebetypen bei den anderen Jun-Proteinen und der JNK. Auf diesen Umstand wird in den folgenden Kapiteln daher nicht erneut eingegangen.

C-Jun zeigte signifikante Korrelationen zu pc-Jun, JunD und JNK. Es handelte sich dabei jedoch um sehr schwache Korrelationen, sodass durch diese Analyse nicht abschließend auf eine gemeinsame Regulation sowie auf einen bevorzugten Dimerisierungspartner c-Juns geschlossen werden kann.

Innerhalb der Untersuchung auf Korrelationen zwischen bekannten Prognosefaktoren, wie FIGO-Stadium, Nodalstatus, Histologie, etc. stellte sich heraus, dass c-Jun von diesen Faktoren unabhängig ist.

Im Gegensatz zu pc-Jun, zeigte die Höhe der c-Jun-Expression in den Kaplan-Meier-Analysen keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben oder das rezidivfreie Intervall.

Zunächst wurde c-Jun in der Literatur überwiegend als Onkogen beschrieben. Später fand man zunehmend auch Tumorsuppressor-Eigenschaften für dieses Protein. Die onkogenen Effekte resultieren u.a. aus einer Förderung der Proliferation. C-Jun führt zu einer erhöhten Proliferationsrate in Hodgkin-Lymphomen (Mathas et al. 2002). Ebenso zeigten c-Jun-defiziente Fibroblasten in vitro starke Proliferationsdefekte (Johnson et al. 1993, Wisdom et al. 1999). Weiterhin kann c-Jun die Apoptoserate steigern, aber auch herunter regulieren (Karin 1998, Eferl et al. 1999, Wisdom et al. 1999, Shaulian et al. 2000). Darüber hinaus besitzt es eine proangiogenetische Funktion und spielt eine Rolle in der malignen Transformation (Mechta et al. 1997, Toft et al. 2001). C-Jun scheint Zelltyp-spezifische Funktionen zu haben. Die genaue Rolle des Gesamt-c-Juns im Ovarialkarzinom konnte mit Hilfe der hier erhobenen Daten nicht abschließend dargestellt werden.

4.2.2 pc-Jun

Pc-Jun entsteht durch eine Phosphorylierung c-Juns durch c-Jun-N-terminale Kinasen an Serin 63- und Serin 73-Resten. Diese Phosphorylierung führt zu einer Abspaltung eines inhibitorischen Komplexes (HDAC3-Komplex), wodurch pc-Jun eine höhere Proteinstabilität und –aktivität erlangt (Hibi et al. 1993, Dérijard et al. 1994, Weiss et al. 2003).

Beim Vergleich der Gewebetypen (Primärtumor, Gewebe nach neoadjuvanter Therapie und Rezidivgewebe) ergab sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der pc-Jun-Expression zwischen den Primärtumoren und den Rezidivtumoren ($p < 0,001$). Bei den Rezidivtumoren konnten keine sichtbaren Banden im Western Blot nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich, dass sich die pc-Jun-Expression in Primärtumoren und in Tumoren nach neoadjuvanter Therapie tendenziell unterscheidet ($p = 0,078$). Im Mittel war die pc-Jun-Expression in den Primärtumoren höher. Diese Ergebnisse könnten allerdings auch durch die geringen Fallzahlen in den Gruppen „Rezidivgewebe“ ($n = 4$) und „Gewebe nach neoadjuvanter Therapie“ ($n = 8$) begründet sein. Lediglich eine Probe eines Tumors nach neoadjuvanter Therapie wies eine sichtbare pc-Jun-Expression auf. Für eine genauere Aussage hinsichtlich eines Unterschieds der pc-Jun-Expression zwischen Primärtumoren, Tumoren nach neoadjuvanter Therapie und Rezidivtumoren müssten weitere Analysen mit höheren Fallzahlen durchgeführt werden.

Pc-Jun korrelierte signifikant zu c-Jun, JunD und JNK. Wie zuvor erwähnt, entsteht pc-Jun aus c-Jun mittels posttranslationaler Phosphorylierung durch eine JNK (Dérizard et al. 1994). Die nachgewiesenen Korrelationen zu c-Jun und zur JNK lassen sich durch diesen Zusammenhang erklären.

Das Protein zeigte eine signifikante Korrelation zum Nodalstatus der Patientinnen ($p = 0,035$). Nodalpositive Tumoren wiesen tendenziell stärkere pc-Jun-Expressionen auf.

Die Tumoren mit einer erhöhten und somit im Western Blot sichtbaren pc-Jun-Expression zeigten in den Kaplan-Meier-Analysen ein signifikant schlechteres Überleben (25 vs. 41 Monate; $p = 0,038$) sowie ein signifikant kürzeres rezidivfreies Intervall (14 vs. 16 Monate; $p = 0,017$). Hiermit konnte zum ersten Mal ein signifikanter Einfluss der pc-Jun-Expression auf das Outcome von Ovarialkarzinom-Patientinnen gezeigt werden. Bei der Betrachtung der multivariaten Analyse bestätigte sich ein unabhängiger Einfluss pc-Juns auf das rezidivfreie Intervall (HR: 1,73; [95%CI: 1,041-2,868]; $p = 0,034$).

Pc-Jun ist, wie auch c-Jun, an der Regulation von Proliferation und Apoptose involviert. Es kann durch eine Induktion der Cyclin D1-Transkription proliferativ wirken. Bakiri et al. konnten zudem beobachten, dass eine Phosphorylierung diese Induktionsfähigkeit zusätzlich verstärkt. Pc-Jun hat eine anti-apoptotische Wirkung in Hepatozyten (Behrens et al. 1999, Bakiri et al. 2000). Die proliferative und anti-

apoptotische Funktion des Proteins bietet eine mögliche Erklärung für das schlechtere Überleben von Ovarialkarzinom-Patientinnen mit hohen pc-Jun-Expressionslevels.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass pc-Jun in Ovarialkarzinomen überwiegend onkogene Eigenschaften aufweist. In einem Mausmodell mit Colonkarzinomen konnte Ähnliches beobachtet werden. Mutierte Serin-Reste im c-Jun-Protein, die dessen Phosphorylierung zu pc-Jun verhinderten, führten zu einer geringeren Anzahl und Größe von Tumorablegern. Die Mäuse zeigten zudem ein längeres Überleben (Nateri et al. 2005).

Pc-Jun kann darüber hinaus das Invasionspotential von Osteosarkomzellen erhöhen. Dies geschieht durch eine Hochregulation der MMP-1. Matrixmetalloproteasen spalten die extrazelluläre Matrix und spielen daher in der Metastasierungskaskade eine wichtige Rolle (Kimura et al. 2011). Zoumpourlis et al. konnten zudem beobachten, dass hohe pc-Jun-Expressionen mit einem maligneren Phänotyp bei Spinaliomen assoziiert sind. Ihre Analysen schlossen somit auf eine Rolle pc-Juns in der Progression von Hauttumoren (Zoumpourlis et al. 2000). Diese Ergebnisse untermauern die prognostisch ungünstige Wirkung pc-Juns und bieten weitere Erklärungsansätze für die Beobachtungen im Hamburger Ovarialkarzinomkollektiv.

Die posttranslationale Modifikation von c-Jun zu pc-Jun hat neben der Aktivitäts- und Stabilitätssteigerung auch einen Einfluss auf die Interaktion zu anderen Transkriptionsfaktoren. Hierfür könnten u.a. sterische Proteinveränderungen verantwortlich sein. So konnten Smeal et al. zeigen, dass für eine Interaktion mit dem Proto-Onkogen H-Ras eine Phosphorylierung von c-Jun zu pc-Jun essentiell ist (Smeal et al. 1991). Es ist weiterhin denkbar, dass die phosphorylierte Proteinform bevorzugt andere Dimerbindungen eingeht. Unterschiedliche AP-1-Komplexe können abweichende Funktionen aufweisen (Bakiri et al. 2002, Eferl und Wagner 2003, Hernandez et al. 2008). So ist für eine protektive Wirkung gegen eine UV-induzierte Apoptose eine Phosphorylierung des Proteins nötig. Eine antiapoptotische Wirkung kann zu einer verstärkten Chemoresistenz führen, was wiederum mit einer schlechteren Prognose für die Patientin einhergeht (Wisdom et al. 1999). Die zuvor genannten Zusammenhänge könnten erklären, warum pc-Jun im Gegensatz zum Gesamt-c-Jun einen signifikanten Einfluss auf das Outcome der Ovarialkarzinom-Patientinnen zeigt.

Laut den Ergebnissen dieser Arbeit könnte pc-Jun ein potentiell therapeutisches Target darstellen, da sich besonders die niedrigen Proteinlevels als prognostisch günstig

erwiesen. Dabei kann neben einer direkten Hemmung des Proteins auch eine Hemmung der posttranslationalen Phosphorylierung mittels JNK in Erwägung gezogen werden. Vivas-Mejia et al. publizierten bereits eine antitumorale Wirkung eines JNK-1-Inhibitors auf Ovarialkarzinom-Zelllinien (Vivas-Mejia et al. 2010). Näheres dazu wird im Kapitel 4.2.5 beschrieben.

4.2.3 JunB

Die untersuchten Tumorproben zeigten relativ zu den Proteinlysaten hohe Expressionswerte für JunB (Mittelwert: 303,3%, Median 188,6%). Dies bestätigt die Beobachtungen von Neyns et al., die im Northern Blotting ebenso hohe JunB-Expressionen bei Ovarialkarzinomen nachweisen konnten (Neyns et al. 1996).

Die Jun-B-Expression ist in dem hier untersuchten Kollektiv von der anderen Jun-Proteine komplett unabhängig. Es zeigte sich lediglich eine schwache, signifikante Korrelation zur JNK. JunB kann durch die JNK an seinen Thr 102/104-Resten phosphoryliert und somit in seiner Aktivität gesteigert werden (Li et al. 1999, Bakiri et al. 2000). Die Korrelation zwischen den beiden Proteinen rührt möglicherweise aus dieser Substrat-Enzym-Interaktion und deutet –analog zu der Phosphorylierung c-Juns– auf eine stabilisierende Wirkung dieser Phosphorylierung hin.

JunB wird in der Literatur als Tumorsuppressor beschrieben. Es wirkt proliferationshemmend und kann die Apoptose einleiten (Chiu et al. 1989, Bakiri et al. 2000, Shaulian 2010, Sreeramaneni et al. 2005). Darüber hinaus ist bekannt, dass das Protein eine maligne Transformation inhibieren kann (Passegué und Wagner 2000). Demgegenüber fördert JunB allerdings auch die Angiogenese und könnte hiermit eine Tumorprogression fördern (Toft et al. 2001).

In dem hier untersuchten Kollektiv von Ovarialkarzinomen zeigte sich kein signifikanter Einfluss JunBs auf das Gesamtüberleben oder das rezidivfreie Intervall. JunB erwies sich als unabhängiger Parameter, denn es zeigte in den durchgeführten Untersuchungen keinerlei Korrelationen zu bekannten Prognoseparametern. Die zuvor genannten Tumorsuppressor-Eigenschaften konnten mit Hilfe der durchgeführten Analysen anhand dieses Ovarialkarzinomkollektivs nicht nachgewiesen werden.

4.2.4 JunD

Die Höhe der JunD-Expression lag im mittleren bis starken Bereich (Mittelwert: 187,9% Median: 113,5%). Neyns et al. wiesen in ihren Northern Blot-Analysen an Ovarialkarzinomen ebenfalls mittelstarke JunD-Expressionen nach. Im Vergleich zu normalem Ovarialepithel war JunD in Karzinomen signifikant häufiger unterexprimiert (Neyns et al. 1996, Hein et al. 2009).

JunD wies als einziges der untersuchten Proteine signifikante, aber schwache Korrelationen zu allen anderen Jun-Proteinen auf.

In den Kaplan-Meyer-Analysen zeigten die Tumoren mit einer mittleren JunD-Expression ein signifikant längeres Überleben (32 vs. 42 vs. 35,5 Monate für schwache, mittelstarke und starke Expression; $p=0,009$) und rezidivfreies Intervall (14 vs. 19,5 vs. 16 Monate für schwache, mittelstarke und starke Expression; $p=0,011$). Die angeschlossenen multivariaten Analysen bestätigten einen unabhängigen Einfluss JunDs auf das Gesamtüberleben. Niedrige JunD-Expressionslevel (Tertial 1) führten zu einer Erhöhung des Letalitätsrisikos um das 2,16fache [95%CI: 1,144-4,074; $p=0,018$] im Vergleich zu Tumoren mit mittleren JunD-Expressionen (Tertial 2).

Die durchgeführten Analysen bewiesen somit erstmalig negative Auswirkungen auf das Outcome von Ovarialkarzinompatientinnen bei einer JunD-Überexpression sowie bei einer verminderten JunD-Expression.

JunD besitzt proliferative Wirkungen und kann daher als Onkogen fungieren. Eine JunD-Suppression durch Menin führte nachweislich zu einer verminderten Proliferation und einer Verhinderung der neoplastischen Transformation in Fibroblasten (Agarwal et al. 2003). Darüber hinaus konnte eine antiapoptotische Wirkung JunDs nachgewiesen werden, die wie zuvor erwähnt, eine erhöhte Chemoresistenz zur Folge haben kann (Gerald et al. 2004, Zhou et al. 2007). Diese Funktionen des Proteins könnten erklären, dass eine Fehlregulation im Sinne einer JunD-Überexpression zu einem kürzeren Gesamtüberleben und rezidivfreiem Intervall in dem untersuchten Patientenkollektiv führte.

JunD zeigt allerdings auch antiproliferative und folglich Tumorsuppressor-Wirkungen. Eine Herunterregulation von JunD führt zu einer unkontrollierten Zellproliferation in Fibroblasten (NIH3T3-Zelllinie). Außerdem kann das Protein der transformierenden Wirkung des Proto-Onkogens Ras entgegenwirken. So führte eine JunD-Überexpression

zu einer Verminderung des Ras-induzierten Tumorwachstums (Pfarr et al. 1994). Wie bereits erwähnt, fanden sich in Ovarialkarzinomen signifikant häufiger Unterexpressionen des Proteins (Neyns et al. 1996, Hein et al. 2009). Die genannten Eigenschaften von JunD könnten dafür verantwortlich sein, dass die Tumoren mit einer verminderten JunD-Expression ebenso signifikant kürzere Überlebenszeiten und rezidivfreie Intervalle zeigten, als solche mit mittlerem JunD-Proteingehalt.

Die Western-Blot-Analysen dieser Arbeit zeigten, dass JunD nahezu unabhängig von anderen bekannten Prognosefaktoren ist. Es ergab sich lediglich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Proteinexpression und der Asziteszytologie (maligne vs. nicht maligne). Innerhalb der Gruppe mit mittlerer JunD-Expression waren mit einem Anteil von über 60% die meisten Befunde frei von malignen Zellen.

Welche genaue Funktion JunD einnimmt ist kontextabhängig und variiert je nach Dimerisierungspartner (Hernandez et al. 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass die Höhe der JunD-Expression in gesunden Zellen sehr genau reguliert wird. Jeder Eingriff in dieses regulatorische System könnte diese Homöostase stören und ungewollt zu einer Über- oder Unterexpression des Proteins mit den zuvor genannten Folgen führen. Diese Tatsache macht es derzeit unwahrscheinlich JunD in der Zukunft direkt als therapeutisches Target verwenden zu können.

4.2.5 JNK

Die JNK-Expressionswerte der gesamten Tumorproben befanden sich relativ zu den als Positivkontrollen verwendeten Zelllysaten im mittelstarken Bereich (Mittelwert: 131,9%, Median: 49,4%). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der JNK-Expressionshöhen in den verschiedenen Gewebetypen.

Die JNK zeigte in den durchgeführten Western-Blot-Analysen schwache, aber signifikante Korrelationen zu allen Jun-Proteinen. Sie ist an der Regulation von mehr als 50 Proteinen beteiligt. Darunter befinden sich auch die Jun-Proteine c-Jun, JunD und JunB. Durch eine Phosphorylierung werden diese Proteine in ihrer Aktivität und Stabilität gesteigert (Dérjard et al. 1994, Yazgan und Pfarr 2002, Morton et al. 2003). Darüber hinaus kann die Bindung einer inaktiven JNK via Ubiquitinierung zu einer Proteindegradation führen (Fuchs et al. 1997). Es gibt somit einen direkten Einfluss der JNK auf die Proteinmenge ihrer Substrate. Die zuvor genannten Korrelationen sind möglicherweise Ausdruck dieser regulatorischen Funktion.

Tumoren mit mittlerer JNK-Expression (Tertial 2) zeigten ein signifikant verlängertes rezidivfreies Intervall (17 vs. 23 vs. 11 Monate für schwache, mittelstarke und starke Expression; $p=0,010$). Darüber hinaus scheint dieses Tumortertial tendenziell ein längeres Gesamtüberleben aufzuweisen (34 vs. 47 vs. 18 Monate für schwache, mittelstarke und starke Expression; $p=0,101$). Die angeschlossenen multivariaten Analysen bestätigten einen unabhängigen Einfluss der Expressionshöhe der JNK auf das rezidivfreie Intervall. Sowohl niedrige, also auch hohe JNK-Expressionswerte erhöhen die Rezidivwahrscheinlichkeit. Niedrige JNK-Levels vergrößern diese um den Faktor 1,67 [95%CI: 1,010-2,769; $p=0,046$], hohe Expressionslevel nahezu um das 2-fache [95%CI: 1,119-3,416; $p=0,019$].

Die Rolle der JNK in der Karzinogenese wird kontrovers diskutiert. Durch die Regulation von mehr als 50 Substraten erfüllt sie zahlreiche Funktionen. Es konnten zum einen proliferative Effekte nachgewiesen werden (Durbin et al. 2009). Bei einer Inhibition der JNK-1 in Ovarialkarzinomzelllinien konnten eine Proliferationshemmung sowie erhöhte Apoptoseraten beobachtet werden (Vivas-Mejia et al. 2010). Es ist ebenso bekannt, dass die JNK an der Regulation der Zellbewegung beteiligt ist. Eine JNK-abhängige Phosphorylierung von Paxillin erhöht die Migrationsfähigkeit von MDA-MB23- und auch Ovarialzellen (Chinese hamster ovary cell-K1). Die Zellbewegung ist für die Metastasierung von Tumorzellen essentiell (Huang et al. 2003, Bogoyevitch und Kobe 2006b). Darüber hinaus scheint die JNK eine Rolle in der Entstehung von „Cancer Stem Cells“, den tumorinduzierenden Vorläuferzellen, zu spielen (Hui et al. 2008, Chang et al. 2009b). Die JNK kann durch diese Funktionen eine Karzinogenese oder Tumorprogression fördern. Dies würde möglicherweise die in diesem Kollektiv nachgewiesenen negativen Auswirkungen hoher JNK-Expressionen auf das rezidivfreie Intervall der Patientinnen erklären.

Zum anderen besitzt die JNK aber auch Funktionen, die protektiv gegen eine mögliche Karzinogenese wirken oder zu einer erhöhten Chemosensitivität führen. So kann das Protein die Apoptose induzieren und DNA-Reparaturgene aktivieren (Hayakawa et al. 2003, Tsuruta et al. 2004). Eine verminderte JNK-Expression könnte daher zu Fehlregulationen innerhalb dieser protektiven Zellvorgänge führen. Das wäre eine Erklärung für die im Kollektiv beobachtete höhere Rezidivwahrscheinlichkeit bei verminderten JNK-Expressionslevels.

Vivas-Mejia et al. konnten innerhalb einer Western-Blot-Analyse von 116 epithelialen Ovarialkarzinomen einen Effekt der phosphorylierten JNK-1 auf das rezidivfreie Intervall nachweisen. Niedrige pJNK-1-Expressionen waren mit einem besseren progressionsfreien Überleben vergesellschaftet. Die JNK-1 zeigte in diesen Untersuchungen allerdings keinen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Intervall oder das Gesamtüberleben (Vivas-Mejia et al. 2010). Chang et al. fanden ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben bei Männern mit einem HCC, welches eine schwache JNK-1-Expression aufweist (Chang et al. 2009b). Bei beiden zuvor genannten Untersuchungen wurde ein JNK-1-Antikörper verwendet. Innerhalb dieser Arbeit wurde die Proteinexpression der gesamten JNK (JNK-1, JNK-2, JNK-3) mittels pan-Antikörper ermittelt. Die JNK-1 und JNK-2 kommen ubiquitär vor, wohingegen die JNK-3 vor allem in ZNS-Gewebe, Herzmuskelgewebe und in Hodengewebe exprimiert wird. Die jeweiligen Isoformen der JNK erfüllen unterschiedliche Funktionen (Yang et al. 1997, Chen et al. 2009). Die Analyse von Chang et al. ergab zudem nur unter Betrachtung der männlichen Patienten einen signifikanten Einfluss. Dies ist ein weiterer potentieller Grund für die Abweichung der Analysen dieser Arbeit zu den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen.

Die hier gezeigten Daten lassen eine Verwendung der JNK als therapeutisches Target schwierig erscheinen. Denn Fehlregulationen im Sinne einer Über- und auch Unterexpression führten in beiden Fällen zu einer schlechteren Prognose. Demgegenüber publizierten Vivas-Mejia et al. aber erste Untersuchungen mit einem JNK-1-Inhibitor auf Imatinib-Basis (WBZ_4). Diese Analysen belegten einen tumorinhibierenden Effekt von WBZ_4 in einem Mausmodell mit orthotopen Ovarialkarzinomen. In Kombination mit Docetaxel konnte zudem eine Wirkverstärkung erzielt werden (Vivas-Mejia et al. 2010). Wie bereits zuvor erwähnt, wurde innerhalb der zuvor genannten Untersuchungen allein die JNK-1 beachtet. Eine Hemmung der JNK-1 kann zu niedrigeren pc-Jun-Expressionen in Ovarialgewebe führen. Die vorliegende Arbeit zeigte bereits, dass niedrige pc-Jun-Level prognostisch günstig sind. Der von Vivas-Mejia et al. beobachtete tumorinhibierende Effekt einer JNK-1-Inhibition könnte somit über die Herunterregulation von pc-Jun vermittelt werden.

Darüber hinaus gibt es weitere Untersuchungen die zeigen, dass insbesondere eine Hemmung der JNK-1-Isoform zu einer Verminderung der Tumorprogression führen kann. So führte ein Silencing der JNK-1 zu vermindertem Tumorwachstum in embryonalen Rhabdomyosarkomzellen. Eine gezielte Zerstörung des JNK-1-Genlocus

hatte eine geringere Anzahl und Größe von Diehtylnitrosamin-induzierten HCC zur Folge. HCC-Gewebe mit hoher JNK-1-Expression entstammte signifikant häufiger aus größeren Tumoren und ging mit einer schlechteren Prognose für die Patienten einher (Hui et al. 2008, Chang et al. 2009a, Chang et al. 2009b, Durbin et al. 2009).

Letztendlich sind für eine abschließende Beurteilung über die Eignung der JNK oder einzelner Isoformen als therapeutisches Target weitere Analysen notwendig.

4.2.6 Korrelationen zu den Fos-Proteinen

Einzig JunD zeigte signifikante Korrelationen zu Fra-1, Fra-2 und c-Fos. Die stärkste Korrelation bestand dabei zu Fra-2 ($r=0,536$). Dies weist auf gemeinsame Regulationsmechanismen hin und lässt vermuten, dass JunD möglicherweise gehäuft Heterodimere mit Fra-2 bildet.

Die Fos-Proteine Fra-1, Fra-2, FosB und c-Fos können heterodimere Verbindungen mit Jun-Proteinen eingehen und einen AP-1-Komplex bilden. Die Fos-Proteine spielen somit, wie die Jun-Proteine, eine Rolle in der Regulation von Zellzyklus, Apoptose und Angiogenese. Sie können daher ebenso eine bedeutende Funktion innerhalb einer Karzinogenese oder Tumorprogression haben (Chinenov und Kerppola 2001, Milde-Langosch 2005).

Hein et al. zeigten eine erhöhte Fra-2-Expression in Ovarialkarzinomen im Vergleich zu benignen Ovarialtumoren (Hein et al. 2009). In Mammakarzinomzellen führten Fra-1- und Fra-2-Überexpressionen zu einem morphologisch aggressiveren Phänotyp (Belguise et al. 2005, Milde-Langosch et al. 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Fra-1 möglicherweise eine Rolle in der Karzinogenese von Ovarialtumoren spielt. So führte eine K-Ras-Mutation in Ovarialkarzinomzellen zu einem massiven Anstieg der Fra-1-Expression (Tchernitsa et al. 2004).

Im Gegensatz dazu scheint c-Fos eher eine protektive Wirkung in Ovarialkarzinomen inne zu haben. So konnten Mahner et al. zeigen, dass eine niedrige c-Fos-Expression unabhängig von anderen prognostischen Parametern mit einem signifikant kürzerem Überleben und rezidivfreiem Intervall assoziiert ist (Mahner et al. 2008).

Inwiefern die Rolle der Fos-Proteine in Karzinomen von einer Dimerbildung mit JunD oder anderen Jun-Proteinen abhängt, kann anhand der in dieser Arbeit durchgeführten

Untersuchungen nicht abschließend geklärt werden. Bezüglich dieses Punktes bedarf es weiterer zellbiologischer Experimente.

4.3 Immunhistochemische Analysen

4.3.1 Immunhistochemie Hamburger Kollektiv

JunD ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor (Vogt 2002). In den immunhistochemischen Analysen konnte dies bestätigt werden, denn es fanden sich überwiegend nukleäre Anfärbungen. Die Stromasträßen zwischen den Tumoranteilen blieben meist ohne JunD-spezifische Färbung. Bei wenigen Tumoren fanden sich neben einer starken nukleären Farbreaktion auch etwas schwächere zytoplasmatische Anfärbungen. Innerhalb von malignen Tumoren sind, wie bereits zuvor erwähnt, Veränderungen von nukleären Transportsystemen denkbar. Aus diesem Grund konnte bei einigen Tumoren möglicherweise eine schwache zytoplasmatische JunD-Expression dargestellt werden.

Frühere immunhistochemische Untersuchungen an einem kleineren Ovarialkarzinomkollektiv zeigten ebenso JunD-Kernfärbungen mit teils schwächeren zytoplasmatischen Reaktionen. Dabei konnte außerdem gezeigt werden, dass Metastasen schwächere immunhistochemische Reaktionen aufwiesen, als Karzinome (Kanowski 2009, Hein et al. 2009).

4.3.2 Immunhistochemie Würzburger Kollektiv

Innerhalb der JunD-Immunhistochemie des Würzburger Kollektivs wurden 65 Ovarialkarzinompräparate untersucht. Auch hier zeigten sich nukleäre Färbereaktionen, teilweise mit zytoplasmatischen Anteilen. Die Stromasträßen blieben überwiegend ungefärbt.

In der Kaplan-Meyer-Analyse wiesen die Tumoren mit einer starken immunhistochemischen JunD-Expression ein signifikant längeres Überleben auf ($p=0,027$). Die Tumoren mit mittelstarker Expression zeigten das zweitbeste Gesamtüberleben. Aufgrund unzureichender Daten bezüglich des Überlebens der Patientinnen konnten lediglich 35 Fälle in diese Analyse eingeschlossen werden. Darüber hinaus beinhaltet das Würzburger Kollektiv zu etwa 30% Borderline-Tumoren. Hinsichtlich der Histologie unterscheidet es sich demnach deutlich vom Hamburger Kollektiv, welches keine Borderline-Tumoren enthält. Diese Tatsachen könnten einen

Einfluss auf diese Kaplan-Meier-Analyse gehabt haben und sollten bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden.

Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Stärke der immunhistochemischen Färbung und bekannten Prognoseparametern wie FIGO-Stadium, Histologie, Alter bei Diagnose und Grading. Somit konnten zwischen der Höhe der JunD-Expression und den Prognoseparametern mit zwei Methoden und anhand zweier unabhängiger Kollektive keine Korrelationen nachgewiesen werden.

4.4 Fazit und Ausblick

Die Untersuchungen dieser Arbeit bestätigen, dass die Jun-Proteine, insbesondere pc-Jun und JunD sowie die JNK eine Rolle in der Karzinogenese und Tumorprogression beim Ovarialkarzinom spielen. Erstmals konnte hier anhand eines umfangreichen Hamburger Patientenkollektivs mit ausführlichen Follow-Up-Daten auch ein unabhängiger Einfluss dieser Transkriptionsfaktoren auf die Prognose der Patientinnen gezeigt werden.

Es stellt sich nun die Frage, wie diese Erkenntnisse klinisch genutzt werden können. Im Falle von pc-Jun zeigen die ermittelten Daten, dass dieses Protein ein potentielles therapeutisches Target darstellen könnte. JunD hingegen scheint als therapeutisches Target ungeeignet. Eine abschließende Bewertung der JNK als Therapietarget konnte anhand der ermittelten Ergebnisse nicht durchgeführt werden. Die Western-Blot-Analysen der Gesamt-JNK (JNK-1, JNK-2, JNK-3) ergaben innerhalb dieser Arbeit, analog zu den Ergebnissen für JunD, eher eine Untauglichkeit. In der Literatur sind hingegen erste Erfolge durch einen JNK-1-Inhibitor hinsichtlich einer verminderten Tumorprogression bei Ovarialkarzinomen beschrieben (Vivas-Mejia et al. 2010). Daneben kann durch eine Inhibition der JNK Einfluss auf die Höhe der pc-Jun-Konzentration genommen werden. Eine geringere pc-Jun-Expression ist laut der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wieder prognostisch günstig. Für eine genauere Beurteilung wäre es interessant, das Kollektiv hinsichtlich einer prognostischen Bedeutung der JNK-1 zu untersuchen. Möglicherweise kommt dieser Isoform eine besondere Bedeutung beim Ovarialkarzinom zu.

Darüber hinaus bleibt es bisher ungeklärt, welche Mechanismen bei den untersuchten Proteinen letztendlich die Aggressivität des Tumors steigern und zur Tumorprogression führen. Hierfür müssten zellbiologische Experimente, wie beispielsweise *in vitro* -

Assays mit stabil transfizierten Ovarialkarzinomzellen angeschlossen werden. Die Jun-Proteine üben ihre regulatorische Funktion in AP-1-Komplexen aus (Rauscher et al. 1988). Daher sollte weiterhin untersucht werden, ob bestimmte Dimerkonstellationen, wie beispielsweise hohe pc-Jun-Expressionen in Kombination mit einer niedrigen c-Fos-Expression, die prognostische Bedeutung der Jun-Proteine weiter verstärken.

5. Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom bietet mit einer durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 40% eine schlechte Prognose für die Patientin. Neue prognostische Parameter könnten helfen individuellere Therapieansätze zu ermöglichen oder gar gezielte therapeutische Targets zu finden und so die Überlebensraten zu steigern. Hein et al. konnten anhand von früheren Analysen zeigen, dass die Jun-Proteine möglicherweise von prognostischer Bedeutung für das Ovarialkarzinom sind. So fanden sich in malignen Ovarialtumoren signifikant höhere pc-Jun-, JunB- und JunD-Proteinexpressionen im Vergleich zu benignen Tumorentitäten (Hein et al. 2009). Diese Arbeit diene daher der genaueren Differenzierung dieser prognostischen Bedeutung sowie der Funktionen der Jun-Proteine und der JNK für das Ovarialkarzinom. Hierfür wurden die Proteinexpressionen der Jun-Proteine (c-Jun, pc-Jun, JunD, JunB) und der JNK in 173 kryokonservierten Ovarialkarzinom-Gewebeproben mittels Western-Blotting untersucht. Anhand eines zweiten, unabhängigen Kollektives (n=65) erfolgte eine zusätzliche Analyse der prognostischen Bedeutung von JunD mittels Immunhistochemie.

Innerhalb dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine erhöhte pc-Jun-Expression in Ovarialkarzinomen mit einem kürzerem Gesamtüberleben (25 vs. 41 Monate; $p=0,038$) und rezidivfreiem Intervall (14 vs. 16 Monate; $p=0,017$) der Patientinnen assoziiert ist. Eine multivariate Analyse unter Einschluss der gängigen Prognoseparameter zeigte einen signifikanten Anstieg des Risikos für ein Rezidiv [HR: 1,72; 95%CI: 1,041-2,868; $p=0,034$]. Die onkogenen Eigenschaften von pc-Jun scheinen somit in Ovarialkarzinomen zu überwiegen.

Es zeigte sich außerdem, dass JunD einen Einfluss auf die Prognose von Ovarialkarzinom-Patientinnen hat. Eine mittlere JunD-Expression war mit einem längerem Gesamtüberleben (32 vs. 42 vs. 35,5 Monate für schwache, mittelstarke und starke Expression; $p=0,009$) sowie einem längerem rezidivfreiem Intervall (14 vs. 19,5 vs. 16 Monate für schwache, mittelstarke und starke Expression; $p=0,011$) assoziiert. In der multivariaten Analyse ergab sich zudem ein signifikanter und unabhängiger Einfluss JunDs auf das Gesamtüberleben. Niedrige JunD-Expressionswerte führten im Vergleich zu mittleren Proteinexpressionen zu einem Anstieg des Letalitätsrisikos [HR: 2,16; 95%CI: 1,144-4,074; $p=0,018$]. Eine immunhistochemisch analysierte Stichprobe

bestätigte eine überwiegend intratumorale und intranukleäre JunD-Expression. Die immunhistochemischen Untersuchungen des zweiten Kollektives (Würzburger Kollektiv) zeigten ein signifikant längeres Überleben für Tumoren mit einer starken immunhistochemischen JunD-Expression ($p=0,027$). Dieses Kollektiv beinhaltet im Gegensatz zum Hamburger Kollektiv zu etwa 30% Borderline-Tumoren. Die Unterschiede hinsichtlich der JunD-Ergebnisse könnten daher aus den starken histologischen Unterschieden zwischen beiden Kollektiven resultieren.

Vergleichbar zu JunD wiesen auch im Falle der JNK die Tumoren mit einer mittelstarken Expression das bessere Outcome auf. Mittlere JNK-Expressionen zeigten signifikant längere rezidivfreie Intervalle (17 vs. 23 vs. 11 Monate für schwache, mittelstarke und starke Expression; $p=0,010$). Es gab allerdings keinen signifikanten Zusammenhang zum Gesamtüberleben. In der multivariaten Analyse ließ sich ebenso ein signifikanter und unabhängiger Effekt der JNK auf das rezidivfreie Intervall nachweisen [niedrige JNK-Expression: HR: 1,167; 95%CI: 1,010-2,769; $p=0,046$ / hohe JNK-Expression: HR: 2,0; 95%CI: 1,119-3,416; $p=0,019$].

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit erstmalig einen signifikanten und unabhängigen Einfluss der Jun-Proteine pc-Jun und JunD sowie der JNK auf die Tumorprogression beim Ovarialkarzinom. Für JunD und die JNK sind sowohl onkogene, als auch Tumorsuppressor-Eigenschaften beschrieben. Dies bietet eine mögliche Erklärung für das schlechtere Outcome bei einer Fehlregulation im Sinne einer Unter- sowie einer Überexpression. Aufgrund dieser Tatsache scheinen JunD und die JNK nicht als potentielle therapeutische Targets geeignet zu sein. In der Literatur sind hingegen einige Erfolge mit einer gezielten Hemmung der JNK-1-Isoform beschrieben worden (u.a. Vivas-Mejia et al. 2010, Chang et al. 2009b). Zudem zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass erhöhte pc-Jun-Expressionslevel mit einem schlechteren Outcome assoziiert sind. Pc-Jun könnte somit ein potentielles therapeutisches Target darstellen und direkt bzw. indirekt durch eine Hemmung der JNK vermindert werden. Möglicherweise spielt die JNK-1 eine spezielle Rolle im Ovarialkarzinom. Diese Zusammenhänge und der Einfluss von Dimerisierungspartnern sollten daher in weiteren Analysen näher untersucht werden.

Literaturverzeichnis

Agarwal S.K., Guru S.C., Heppner C., Erdos M.R., Collins R.M., Park S.Y., Saggar S., Chandrasekharappa S.C., Collins F.S., Spiegel A.M., Marx S.J., Burns A.L. 1999. Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. *Cell* **96**: 143–152.

Agarwal S.K., Novotny E.A., Crabtree J.S., Weitzman J.B., Yaniv M., Burns A.L., Chandrasekharappa S.C., Collins F.S., Spiegel A.M., Marx S.J. 2003. Transcription factor JunD, deprived of menin, switches from growth suppressor to growth promoter. *Natl Acad Sci USA* **100**: 10770–10775.

AGO Ovar 2007 Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren. 2007. Koordination: Schmalfeldt B., Pfisterer J. Kommission Ovar der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.(Hrsg.) W. Zuckschwerdt Verlag, Kiel, München.

Alani R., Brown P., Binetruy B., Dosaka H., Rosenberg R.K., Angel P., Karin M., Birrer M.J. 1991. The transactivating domain of the c-Jun proto-oncoprotein is required for cotransformation of rat embryo cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 6286 - 6295.

Andrecht S., Kolbus A., Hartenstein B., Angel P., Schorpp-Kistner M. 2002. Cell cycle promoting activity of JunB through cyclin A activation *J Biol Chem.* **277(39)**: 35961-35968.

Angel P., Hattori K., Smeal T., Karin M. 1988. The jun Proto-Oncogene is Positively Autoregulated by its Product, Jun/AP-1. *Cell* **55**: 875-885.

Angel P., Karin M. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* **1072**: 129–157.

Aoki H., Kang P.M., Hampe J., Yoshimura K., Noma T., Matsuzaki M., Izumo S. 2002. Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **277**: 10244–10250.

Armstrong D.K., Bundy B., Wenzel L., Huang H.Q., Baergen R., Lele S., Copeland L.J., Walker J.L., Burger R.A.; Gynecologic Oncology Group 2006. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med* **354(1)**: 33-43.

Aronheim A., Zandi E., Hennemann H., Elledge S.J., Karin M. 1997. Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* **17(6)**: 3094-3102.

Bachar, O., Adner M., Uddman R., Cardell L.O. 2004. Toll-like receptor stimulation induces airway hyper-responsiveness to bradykinin, an effect mediated by JNK and NF-kappa B signaling pathways. *Eur. J. Immunol.* **34**: 1196–1207.

Bakiri L., Lallemand D., Bossy-Wetzel E., Yaniv, M. 2000. Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J.* **19**: 2056–2068.

Bakiri L., Matsuo K., Wisniewska M., Wagner E.F., Yaniv M. 2002. Promoter specificity and biological activity of tethered AP-1 dimers. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 4952–4964.

- Bauerfeind I., Atavesen B., Burges A., et al. 2009. Operative Rezidivtherapie. In: Manual Maligne Ovarialtumoren. Tumorzentrum München (Hrsg.). W. Zuckschwerdt Verlag. 9. Auflage, München: 57-58.
- Behrens A., Sibilio M., Wagner E.F. 1999. Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat genet* **21**: 326-329.
- Belguise K., Kersual N., Galtier F., Chalbos D. 2005. FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells. *Oncogene* **24(8)**: 1434-1444.
- Bell J., Brady M.F., Young R.C., Lage J., Walker J.L., Look K.Y., Rose G.S., Spirtos N.M.; Gynecologic Oncology Group. 2006. Randomized phase III trial of three versus six cycles of adjuvant carboplatin and paclitaxel in early stage epithelial ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* **102(3)**: 432-439.
- Beral V., Doll R., Hermon C., Peto R., Reeves G. 2008. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer – ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from epidemiological studies including 23.257 women with ovarian cancer and 87.303 controls. *Lancet* **371**: 303-314.
- Bogoyevitch M.A., Kobe B. 2006b. Uses for JNK: the Many and Varied Substrates of the c-Jun N-Terminal Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **70(4)**: 1061–1095.
- Bogoyevitch, M. A. 2006a. The isoform-specific functions of the c-Jun N-terminal kinases (JNKs): differences revealed by gene targeting. *Bioessays* **28**: 923–934.
- Bristow R.E., Tomacruz R.S., Armstrong D.K., Trimble E.L., Montz F.J. 2002. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol*. **20(5)**: 1248-1259.
- Bruna A., Nicolas M., Munoz A., Kyriakis J.M., Caelles C. 2003. Glucocorticoid receptor-JNK interaction mediates inhibition of the JNK pathway by glucocorticoids. *EMBO J*. **22**: 6035–6044.
- Burges A., Anthuber C., Schelling M., Stieber P. 2010. Früherkennung und Diagnostik. In: Manual Maligne Ovarialtumoren. Tumorzentrum München (Hrsg.). W. Zuckschwerdt Verlag. 9. Auflage, München: 11-19.
- Burke W., Daly M., Garber J., Botkin J., Kahn M.J., Lynch P., McTiernan A., Offit K., Perlman J., Petersen G., Thomson E., Varricchio C. 1997. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. II. BRCA1 and BRCA2. Cancer Genetics Studies Consortium. *JAMA* **277**: 997–1003.
- Buschmann T., Potapova O., Bar-Shira A., Ivanov V.N., Fuchs S.Y., Henderson S., Fried V.A., Minamoto T., Alarcon-Vargas D., Pincus M.R., Gaarde W.A., Holbrook N.J., Shiloh Y., Ronai Z. 2001. Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol. Cell. Biol*. **21**: 2743–2754.
- Casagrande J.T., Louie E.W., Pike M.C., Roy S., Ross R.K., Henderson B.E. "Incessant ovulation" and ovarian cancer. *Lancet* **2**: 170-3.
- Chang L., Jones Y., Ellisman M.H., Goldstein L.S.B, Karin M. 2003. JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev. Cell* **4**: 521–533.
- Chang L., Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* **410**: 37–40.

- Chang Q., Zhang Y., Beezhold K.J., Bhatia D., Zhao H., Chen J., Castranova V., Shi X., Chen F. 2009a. Sustained JNK1 activation is associated with altered histone H3 methylations in human liver cancer. *J Hepatol* **50**: 323–333.
- Chang Q., Chen J., Beezhold K.J., Castranova V., Shi X., Chen F. 2009b. JNK1 activation predicts the prognostic outcome of the human hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer* **8**: 64
- Chang S.J., Bristow R.E. 2012. Evolution of surgical treatment paradigms for advanced-stage ovarian cancer: Redefining ‘optimal’ residual disease, *Gynecol Oncol* **125**(2): 483-492.
- Chen F., Beezhold K., Castranova V. 2009. JNK1, a potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta* **1796**: 242–251.
- Chinenov Y., Kerppola T.K. 2001. Close encounters of many kinds: Fos–Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* **2**: 2438–2452.
- Chiu R., Angel P., Karin M. 1989. Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell* **59**(6): 979-986.
- Choi J.-H., Wong A.S., Huang H.-F., Leung P.C. 2007. Gonadotropins and ovarian cancer. *Endocrine Reviews* **28**(4): 440-461.
- Cramer D.W., Welch W.R. 1983. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst.* **71**(4): 717-721.
- Crum C.P., Drapkin R., Kindelberger D., Medeiros F., Miron A., Lee Y. 2007. Lessons from BRCA: the tubal fimbria emerges as an origin for pelvic serous cancer. *Clin Med Res* **5**: 35-44.
- Dam van H., Castellazzi M. 2001. Distinct roles of Jun:Fos and Jun:ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* **20**: 2453–2464.
- Davis R.J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**: 239–252.
- De Graeve, F., Bahr A., Sabapathy K.T., Hauss C, Wagner E.F., Keding C., Chatton B. 1999. Role of the ATFα/JNK2 complex in Jun activation. *Oncogene* **18**: 3491–3500.
- Deng X., Xiao L., Lang W., Gao F., Ruvolo P., May W.S. Jr. 2001. Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J. Biol. Chem.* **276**: 23681–23688.
- Dérjard B., Hibi M., Wu I.-H., Barrett T., Su B., Deng T., Karin M., Davis R.J. 1994. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**: 1025–1037.
- Dettmar P., Mayr D., Kaiser C., et al. 2010. Borderline-Tumoren. In: *Manual Maligne Ovarialtumoren*. Tumorzentrum München (Hrsg.). W. Zuckschwerdt Verlag. 9. Auflage, München: 70-73.
- Devary Y., Gottlieb R.A., Lau L.F., Karin M. 1991. Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol Cell Biol* **11**(5): 2804-2811.
- Dong C., Davis R.J., Flavell R.A. 2002. MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* **20**: 55–72.
- Du Bois A., Reuss A., Pujade-Lauraine E., Harter P., Ray-Coquard I., Pfisterer J. 2009. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase III multicenter trials. *Cancer March* **15**: 1234-1244.

- Durbin A.D., Somers G.R., Forrester M., Pienkowska M., Hannigan G.E., Malkin D. 2009. JNK1 determines the oncogenic or tumor-suppressive activity of the integrin-linked kinase in human rhabdomyosarcoma. *J Clin Invest* **119**: 1558-1570.
- Eferl R., Sibilio M., Hilberg F., Fuchsbichler A., Kufferath I., Guertl B., Zenz R, Wagner E.F., Zatloukal K. 1999. Functions of c-jun in liver and heart development. *J. Cell Biol.* **145**: 1049–1061.
- Eferl R., Wagner E. F. 2003. AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis *Nature Rev. Cancer* **3**: 859-868.
- Engel J., Schlesinger-Raab A., Schubert-Fritschle G., Schmalfeldt B., 2010, Epidemiologie. In: Manual Maligne Ovarialtumoren. Tumorzentrum München (Hrsg.). W. Zuckschwerdt Verlag. 9. Auflage, München: 4.
- Enomoto T., Kuragaki C., Yamasaki M., Sugita N., et al. 2003. Is Clear Cell Carcinoma and Mucinous Carcinoma of the Ovary Sensitive to Combination Chemotherapy with Paclitaxel and Carboplatin?, 39th ASCO Annual Meeting, Abstract: 1797.
- Eychene A., Rocques N., Pouponnot C. 2008. A new MAFia in cancer. *Nature Rev. Cancer* **8**: 683-693.
- Fathalla, M. F. 1971. Incessant ovulation- a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* **298**: 163.
- Fialka I., Schwarz H., Reichmann E., Oft M., Busslinger M., Beug H. 1996. The Estrogen-dependent c-JunER Protein Causes a Reversible Loss of Mammary Epithelial Cell Polarity Involving a Destabilization of Adherens Junctions. *J Cell Biol* **132** (6): 1115-1132.
- Friedlander M., Hancock K.C., Rischin D. 2010. A Phase II, open-label study evaluating pazopanib in patients with recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **119**: 32–37.
- Fuchs S. Y., Xie B., Adler V., Fried V.A., Davis R.J., Ronai Z. 1997. c-Jun NH2-terminal kinases target the ubiquitination of their associated transcription factors. *J. Biol. Chem.* **272**: 32163–32168.
- Gallo A., Cuozzo C., Esposito I., Maggiolini M., Bonofiglio D., Vivacqua A., Garramone M., Weiss C., Bohmann D., Musti A.M. 2002. Menin uncouples Elk-1, JunD and c-Jun phosphorylation from MAP kinase activation. *Oncogene* **21**: 6434–6445.
- Gerald D., Berra E., Frapart Y.M. 2004. JunD Reduces Tumor Angiogenesis by Protecting Cells from Oxidative Stress. *Cell* **118**: 781–794.
- Gioeli D., Black B.E., Gordon V., Spencer A, Kesler C.T., Eblen S.T., Paschal B.M., Weber M.J. 2006. Stress kinase signaling regulates androgen receptor phosphorylation, transcription, and localization. *Mol. Endocrinol.* **20**: 503–515.
- Globocan 2008 <http://globocan.iarc.fr/>.
- Günthert A.R., Grundker C., Hollmann K., Emons G. 2002. Luteinizing hormone-releasing hormone induces JunD-DNA binding and extends cell cycle in human ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **294**: 11–15.
- Gupta S., Barrett T., Whitmarsh A.J., Cavanagh J., Sluss H.K., Dérjard B., Davis R.J. 1996. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* **15**: 2760–2770.
- Gupta S., Campbell D., Dérjard B., Davis R.J. 1995. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* **267**: 389–393.

- Hakim A. A., Barry C.P., Barnes H. J., Anderson K.E., Petite J., Whitaker R., Lancaster J.M., Wenham R.M., Carver D.K., Turbov J., Berchuck A., Kopelovich L., Rodriguez G.C. 2009. Ovarian adenocarcinomas in the laying hen and women have similar alterations in p53, ras and HER-2/neu. *Cancer Prev. Res.* **2**: 114-121.
- Harris R., Whittemore A.S., Itnyre J. 1992. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies II. Epithelial Tumors of Low Malignant Potential in White Women Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol* **136**: 1175-1183.
- Hayakawa J., Depatie C., Ohmichi M., Mercola D. 2003. The activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) by DNA-damaging agents serves to promote drug resistance via activating transcription factor 2 (ATF2)- dependent enhanced DNA repair. *J. Biol. Chem.* **278**: 20582–20592.
- Hein S., Mahner S., Kanowski C., Löning T., Jänicke F., Milde-Langosch K. 2009. Expression of Jun and Fos proteins in ovarian tumors of different malignant potential and in ovarian cancer cell lines. *Oncology Reports* **22**: 177-183.
- Hennessy B., Coleman R. L., Markman M. 2009. Ovarian cancer. *Lancet* **374**: 1371-1382.
- Hernandez J.M., Floyd D.H., Weilbaecher K.N. 2008. Multiple facets of junD gene expression are atypical among AP-1 family members. *Oncogene* **27**: 4757–4767.
- Herrlich P. 2001. Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. *Oncogene* **20**: 2465–2475.
- Hess V., A'Hern R.P., Gore M.E. 2003. Relative Platinum-Resistance of Mucinous Carcinoma of the Ovary. 39th ASCO Annual Meeting, Abstract: 1796.
- Hibi M., Lin A., Smeal T., Minden A., Karin M. 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* **7**: 2135–2148.
- Hilfiker-Kleiner D., Hilfiker A., Kaminski K., Schaefer A., Park J.K., Michel K., Quint A., Yaniv M., Weitzman J.B., Drexler H. 2005. Lack of JunD promotes pressure overload-induced apoptosis, hypertrophic growth, and angiogenesis in the heart. *Circulation* **112**: 1470–1477.
- Hirai S.I., Ryseck R.P., Mechta F., Bravo R., Yaniv M. 1989. Characterization of junD: a new member of the jun proto-oncogene family. *EMBO J* **8**: 1433–1439.
- Høgdaal E.V., Ringsholt M., Høgdaal C.K., Christensen I.J., Johansen J.S., Kjaer S.K., Blaakaer J., Ostfeld-Møller L., Price P.A., Christensen L.H. 2009. YKL-40 tissue expression and plasma levels in patients with ovarian cancer. *BMC Cancer* 2009, 9:8 doi:10.1186/1471-2407-9-8.
- Huang C., Rajfur Z., Borchers C., Schaller M. D., Jacobson K. 2003. JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature* **424**(6945): 219-223.
- Hui L., Zatloukal K., Scheuch H., Stepniak E., Wagner E.F. 2008. Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation. *J Clin Invest* **118**: 3943–3953.
- Huncharek M., Geschwind J.F., Kupelnick B. 2003. Perineal application of cosmetic talc and risk of invasive epithelial ovarian cancer: a meta-analysis of 11.933 subjects from sixteen observational studies. *Anticancer Res* **23**: 1955-1960.

- Hunn J., Rodriguez G.C. 2012. Ovarian Cancer: Etiology, Risk Factors, and Epidemiology. *Clin obstet gynecol* **55**: 3-23.
- Jochum W., Passegue E., Wagner E. F. 2001. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* **20**: 2401–2412.
- Johnson R.S., van Lingen B., Papaioannou V.E., Spiegelman B.M. 1993. A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes & Dev.* **7**: 1309-1317.
- Jonat C., Rahmsdorf H. J. , Park K., Cato A.C., Gebel S., Ponta H., Herrlich P. 1990. Antitumor promotion and antiinflammation: Down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62(6)**:1189-204.
- Kanowski C. 2008. Expression von AP-1-Faktoren in Ovarialtumoren: Korrelation zu klinisch-pathologischen Markern. Dissertation: Institut für Gynäkopathologie, Universität Hamburg
- Karin M. 1995. The Regulation of AP-1-Activity by Mitogen-activated Protein Kinases. *J Biol Chem.* **270(28)**: 16483-16486.
- Karin M. 1998. Mitogen-activated Protein Kinase Cascades as Regulators of Stress Responses. *Ann N Y Acad Sci.* **851**: 139-146.
- Katz, S., Heinrich R., Aronheim A. 2001. The AP-1 repressor, JDP2, is a bona fide substrate for the c-Jun N-terminal kinase. *FEBS Lett.* **506**: 196–200.
- Kim B. J., Ryu S.W., Song B.J. 2006. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **281**: 21256–21265.
- Kim H.-J., Jeon H.-K., Cho Y. J. 2012. High galectin-1 expression correlates with poor prognosis and is involved in epithelial ovarian cancer proliferation and invasion. *Eur J Cancer* **48(12)**: 1914-1921.
- Kimura R., Ishikawa C., Rokkaku T., Janknecht R., Mori N. 2011. Phosphorylated c-Jun and Fra-1 induce matrix metalloproteinase-1 and thereby regulate invasion activity of 143B osteosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta* **1813(8)**:1543-1553.
- Kolbus A., Herr I., Schreiber M., Debatin K.M., Wagner E.F., Angel P. 2000. c-Jun-dependent CD95-L expression is a rate-limiting step in the induction of apoptosis by alkylating agents. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 575–582.
- Kreienberg M. 2009. Klinik. In: *Onkologie aktuell: Management des Ovarialkarzinoms*. Kreienberg R., Prömpeler H.J., Rieber-Brambs A., Baumann K.H., Wagner U., Lück H.-J., Meier W., Gropp M. (Hrg.) Springer, Berlin, Heidelberg, 72-74.
- Kristiansen G., Denkert C., Schlüns K., Dahl E., Pilarsky C., Hauptmann S. 2002. CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival. *Am J Pathol.* **161(4)**: 1215-1221.
- Kuhn W., Schmalfeldt B., Reuning U., Pache L., Berger U., Ulm K., Harbeck N., Späthe K., Dettmar P., Höfler H., Jänicke F., Schmitt M., Graeff H. 1999. Prognostic significance of urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc. *Br. J Cancer* **79**: 1746-1751.
- Lacey J.V., Brinton L.A., Leitzmann M.F, Mouw T., Hollenbeck A., Schatzkin A., Hartge P. 2006. Menopausal Hormone Therapy and Ovarian Cancer Risk in the National Institutes of Health – AARP Diet and Health Study Cohort. *J Natl Cancer Inst* **98(19)**: 1397-1405 .

- Lacey J.V., Mink P.J., Lubin J.H., Sherman M.E., Troisi R., Hartge P., Schatzkin A., Schairer C. 2002. Menopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer. *JAMA* **288**: 334-341.
- Lackmann F., Carey M.S., Kirk M.E., McLachlin C.M., Elit L. 2003. Surgery as sole treatment for serous borderline tumors of the ovary with non-invasive implants. *Gynecol Oncol* **90**: 407-412.
- Langseth H., Hankinson S.E., Siemiatycki J., Weiderpass E. 2008. Perineal use of talc and risk of ovarian cancer. *J Epidemiol Community Health* **62**(4): 358-60.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2013. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 1.0, AWMF Registriernummer: 032-035OL <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien.7.0.html>
- Le-Niculescu H., Bonfoco E., Kasuya Y., Claret F.X., Green D.R., Karin M. 1999. Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 751–763.
- Li B., Tournier C., Davis R.J., Flavell R.A. 1999. Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *EMBO J.* **18**:420–432.
- Lin H.W., Tu Y.Y., Lin S.Y., Su W.J., Lin W.L., Lin W.Z., Wu S.C., Lai Y.L. 2011. Risk of ovarian cancer in women with pelvic inflammatory disease: a population-based study. *Lancet Oncol* **12**: 900-904.
- Mackay H.J., Brady M. F. , Oza A. M. , Reuss A. , Pujade-Lauraine E., Swart A. M., Siddiqui N., Colombo N., Bookman M. A., Pfisterer J., du Bois A.; Gynecologic Cancer InterGroup. 2010. Prognostic relevance of uncommon ovarian histology in women with stage III/IV epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* **20**(6): 945-952.
- Mahner S., Baasch C., Schwarz J. 2008. C-Fos expression is a molecular predictor of progression and survival in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer* **99**(8): 1269-1275.
- Mahner S., Schwarz J., Jänicke F. 2009. Früherkennung, Vorsorge und Prophylaxe. In: *Onkologie aktuell: Management des Ovarialkarzinoms*. Kreienberg R., Prömpeler H.J., Rieber-Brambs A., Baumann K.H., Wagner U., Lück H.-J., Meier W., Gropp M. (Hrsg.) Springer. Berlin, Heidelberg: 60-68.
- Maki Y., Bos T. J., Davis C., Starbuck M., Vogt P.K. 1987. Avian sarcoma virus 17 carries the Jun oncogene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**: 2848–2852.
- Mathas S., Hinz M., Anagnostopoulos I., Krappmann D., Lietz A., Jundt F., Bommert K., Mehta-Grigoriou F., Stein H., Dörken B., Scheiderei C. 2002. Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *EMBO J.* **21**(15): 4104-4113.
- Mayr D., Dettmar P., Schmalfeldt B., Schwarz-Böger U. Histologische Klassifikation maligner und potentiell maligner Ovarialtumoren, Stadieneinteilung und Prognosefaktoren. In: *Manual Maligne Ovarialtumoren*. Tumorzentrum München (Hrsg.). W. Zuckschwerdt Verlag. 9. Auflage, München: 19-26.
- Mazieres J., Pradines A., Favre G. 2004. Perspectives on farnesyl transferase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Letters* **206**: 159–167.
- Mechta F., Lallemand D., Pfarr C. M., Yaniv, M. 1997. Transformation by ras modifies AP1 composition and activity. *Oncogene* **14**: 837–847.

- Medeiros F., Muto M., Lee Y., Elvin J.A., Callahan M.J., Feltmate C., Garber J.E., Cramer D.W., Crum C.P. 2006. The tubal fimbria is preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. *Am J Surg Pathol* **30**: 230-236.
- Menon U., Gentry-Maharaj A., Hallett R., Ryan A., Burnell M., Sharma A., Lewis S., Davies S., Philpott S., Lopes A., Godfrey K., Oram D., Herod J., Williamson K., Seif M.W., Scott I., Mould T., Woolas R., Murdoch J., Dobbs S., Amso N.N., Leeson S., Cruickshank D., McGuire A., Campbell S., Fallowfield L., Singh N., Dawney A., Skates S.J., Parmar M., Jacobs I. 2009. Sensitivity and specificity of multimodal and ultrasound screening for ovarian cancer, and stage distribution of detected cancers: results of the prevalence screen of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS). *Lancet Oncol* **10**: 327–340.
- Merz E., Weber G., Bahlmann F., Kießlich R. 1998. A new sonomorphologic scoring system (Mainz Score) the assessment of ovarian tumors using transvaginal ultrasonography. Part I Premenopause. *Ultraschall Med* **19**: 99-107.
- Milde-Langosch K. 2005. The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis. *Eur J Cancer* **41(16)**: 2449-2461.
- Milde-Langosch K., Janke S., Wagner I., Schröder C., Streichert T., Bamberger A.M., Jänicke F., Lönning T. 2008. Role of Fra-2 in breast cancer: influence on tumor cell invasion and motility. *Breast Cancer Res Treat* **107(3)**: 337-347.
- Morton S., Davis R.J., McLaren A., Cohen P. 2003. A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *EMBO J.* **22**: 3876–3886.
- Naito J., Kaji H., Sowa H., Hendy G.N., Sugimoto T., Chihara K. 2005. Menin suppresses osteoblast differentiation by antagonizing the AP-1 factor, JunD. *J Biol Chem* **280**: 4785–4791.
- Nakabeppu Y., Ryder K., Nathans D. 1988. DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. *Cell* **55(5)**: 907-915.
- Nateri A.S., Spencer-Dene B., Behrens A. 2005. Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. *Nat.* **437 (7056)**: 281-285.
- National Cancer Institute 2009. Ovarian low malignant potential tumours: Treatment. Health professional version.
- Ness R.B. 2003. Endometriosis and ovarian cancer: thoughts on shared pathophysiology. *Am J Obstet Gynecol.* **189(1)**: 280-294.
- Ness R.B., Cottreau C. 1999. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* **90**: 1459-1467.
- Neyns B., Katesuwanasing, Vermeij J., Bourgain C., Vandamme B., Amfo K., Lissens W., DeSutter P., Hooghe-Peters E., DeGrève J. 1996. Expression of the jun family of genes in human ovarian cancer and normal ovarian surface epithelium. *Oncogene* **12**: 1247–1257.
- NIH Consensus Conference. 1995. Ovarian cancer. Screening, treatment, and follow-up. NIH Consensus Development Panel on Ovarian Cancer. *JAMA* **273(6)**: 491-497.
- Nossov V., Amneus M., Su F., Lang J., Janco J.M., Reddy S.T., Farias-Eisner R. 2008. The early detection of ovarian cancer: from traditional methods to proteomics. Can we really do better than serum CA-125? *Am J Obstet Gynecol* **199**: 215–223.

- Olsen C.M., Green A.C., Nagle C.M., Jordan S.J., Whiteman D.C., Bain C.J., Webb P.M.; Australian Cancer Study Group (Ovarian Cancer) and the Australian Ovarian Cancer Study Group. 2008, Epithelial ovarian cancer: testing the "androgens hypothesis". *Endocr Relat Cancer* **4**: 1061-1068.
- Omura G.A., Brady M.F., Homesley H.D., Yordan E., Major F.J., Buchsbaum H.J., Park R.C. 1991 Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. *J Clin Oncol.* **9**(7): 1138-1150.
- Passegué E., Jochum W., Behrens A., Ricci R., Wagner E.F. 2002. JunB can substitute for Jun in mouse development and cell proliferation. *Nat genet* **30**: 158-166.
- Passegué E., Wagner E.F. 2000. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J.* **19**: 2969-2979.
- Perren T.J., Swart A.M., Pfisterer J., Ledermann J.A., Pujade-Lauraine E., Kristensen G., Carey M.S., Beale P., Cervantes A., Kurzeder C., du Bois A., Sehouli J., Kimmig R., Stähle A., Collinson F., Essapen S., Gourley C., Lortholary A., Selle F., Mirza M.R., Leminen A., Plante M., Stark D., Qian W., Parmar M.K., Oza A.M.; ICON7 Investigators. 2011. A Phase 3 Trial of Bevacizumab in Ovarian Cancer. *N Engl J Med* **365**: 2484-2496.
- Petricoin E.F., Ardekani A.M., Hitt B.A., Levine P.J., Fusaro V.A., Steinberg S.M., Mills G.B., Simone C., Fishman D.A., Kohn E.C., Liotta L.A. 2002. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*; **359**: 572.
- Pfarr C.M., Mechta F., Spyrou G., Lallemand D., Carillo S., Yaniv M. 1994. Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell* **76**: 747-760.
- Prömpeler H.-J. 2009. Bildgebende Verfahren. Sonographie. In: *Onkologie aktuell: Management des Ovarialkarzinoms*. Kreienberg R., Prömpeler H.J., Rieber-Brambs A., Baumann K.H., Wagner U., Lück H.-J., Meier W., Gropp M. (Hrg.) Springer, Berlin, Heidelberg, 74-83.
- Psyri A., Kassab M., Yu Z., Bamias A., Weinberger P.M., Markakis S., Kowalski D., Camp R.L., Rimm D.L., Dimopoulos M.A. 2005. Effect of epidermal growth factor receptor expression level on survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* **11**(24 Pt 1): 8637-8643.
- Qin J., Yao J., Cui G., Xiao H., Kim T.W., Fraczek J., Wightman P., Sato S., Akira S., Puel A., Casanova J.L., Su B., Li X. 2006. TLR8- mediated NFkappa B and JNK activation are TAK1-independent and MEKK3-dependent. *J. Biol. Chem.* **281**: 21013-21021.
- Rassidakis G.Z., Thomaides A., Atwell C., Ford R., Jones D., Claret F.X., Medeiros L.J. 2005. JunB expression is a common feature of CD30+ lymphomas and lymphomatoid papulosis. *Mod Pathol.* **8**(10): 1365-1370.
- Rauscher F. J., Cohen D.R., Curran T., Bos T.J., Vogt P.K., Bohmann D., Tjian R., Franza B.R. Jr. 1988. Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene. *Science* **240**: 1010-1016.
- Rieber-Brambs A. 2009. Bildgebende Verfahren. CT, MRT, Röntgen. In: *Onkologie aktuell: Management des Ovarialkarzinoms*. Kreienberg R., Prömpeler H.J., Rieber-Brambs A., Baumann K.H., Wagner U., Lück H.-J., Meier W., Gropp M. (Hrg.) Springer, Berlin, Heidelberg, 83-90.
- Robert Koch-Institut (RKI) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) (Hrsg.) (2012) *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends*. 8. Auflage, Berlin.

- Rodriguez G.C., Nagarsheth N.P., Lee K.L., Bentley R.C., Walmer D.K., Cline M., Whitaker R.S., Isner P., Berchuck A., Dodge R.K., Hughes C.L. 2002. Progesterin-induced apoptosis in the macaque ovarian epithelium: differential regulation of transforming growth factor-beta. *J Natl Cancer Inst* **94**: 50-60.
- Rodriguez-Burford C., Barnes M.N., Oelschlager D.K., Myers R.B., Talley L.I., Partridge E.E., Grizzle W.E. 2002. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory agents (NSAIDs) on ovarian carcinoma cell lines: Preclinical Evaluation of NSAIDs as chemopreventive agents. *Clin Cancer Res* **8**: 202-209.
- Rose S.L., Robertson A.D., Goodheart M.J., Smith B.J., DeYoung B.R., Buller R.E. 2003. The impact of p53 protein core domain structural alteration on ovarian cancer survival. *Clin Cancer Res*. **15** (11): 4139-4144.
- Ryder K., Lanahan A., Perez-Albuerne E., Nathans D. 1989. Jun-D: A third member of the Jun gene family *Proc. Nad. Acad. Sci. USA* **86**: 1500-1503.
- Ryder K., Lau L.F., Nathans D. 1988. A gene activated by growth factors is related to the oncogene v-jun. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**(5): 1487-1491.
- Schildkraut J.M., Risch N., Thompson W.D. 1989. Evaluating genetic association among ovarian, breast, and endometrial cancer: evidence for a breast/ovarian cancer relationship. *Am J Human Genet.* **4**: 521–529.
- Schorpp-Kistner M., Wang Z. Q., Angel P., Wagner, E. F. 1999. JunB is essential for mammalian placentation. *EMBO J.* **18**: 934–948.
- Schreiber M., Kolbus A., Piu F., Szabowski A., Möhle-Steinlein U., Tian J., Karin M., Angel P., Wagner E.F. 1999. Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev.* **13**(5): 607–619.
- Schröck R., Rauthe G., Schalm R., Sommer H. 2010. Nachsorge und Rehabilitation. In: *Manual Maligne Ovarialtumoren*. Tumorzentrum München (Hrsg.). W. Zuckschwerdt Verlag. 9. Auflage, München: 88-97.
- Schüle R., Rangarajan P., Yang N., Kliewer S., Ransone L.J., Bolado J., Verma I.M., Evans R.M. 1990. Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Cell* **62**: 1217-1226.
- Schütte J., Minna J.D., Birrer M.J. 1989. Deregulated expression of human c-jun transforms primary rat embryo cells in cooperation with an activated c-Ha-ras gene and transforms rat-1a cells as a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2257-2261.
- Scully R.E. 1999. World Health Organization International Histological Classification of Tumours – Histological typing of ovarian tumours, second edition. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Shan W., Liu J. 2009. Inflammation: a hidden path to breaking the spell of ovarian cancer. *Cell Cycle.* **8**: 3107-3111.
- Shao Z., Bhattacharya K., Hsich E., Park L., Walters B., Germann U., Wang Y.M., Kyriakis J., Mohanlal R., Kuida K., Namchuk M., Salituro F., Yao Y.M., Hou W.M., Chen X., Aronovitz M., Tschlis P.N., Bhattacharya S., Force T., Kilter H. 2006. c-Jun N-terminal kinases mediate reactivation of Akt and cardiomyocyte survival after hypoxic injury in vitro and in vivo. *Circ. Res.* **98**: 111–118.
- Shaulian E. 2010. AP-1 – The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressor in disguise?. *Cellular Signalling* **22**: 894-899.
- Shaulian E., Karin M. 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**, 2390–2400.
- Shaulian E., Karin M. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature cell biology* **4**: E131-E136.

- Shaulian E., Schreiber M., Piu F., Beeche M., Wagner E.F., Karin M. 2000. The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell* **103**: 897–907.
- Short J.D., Pfarr C.M. 2002. Translational regulation of the JunD messenger RNA. *J Biol Chem* **277**: 32697–32705.
- Silverberg S.G. 2000. Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol* **19(1)**: 7-15.
- Smeal T., Binetruy B., Mercola D. A., Birrer M., Karin M. 1991. Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* **354**: 494-496.
- Sreeramaneni R., Chaudhry A., McMahon M., Sherr C.J., Inoue K. 2005. Ras-Raf-Arf signaling critically depends on the Dmp1 transcription factor. *Mol Cell Biol*. **25(1)**: 220-232.
- Srinivas H., Juroske D.M., Kalyankrishna S., Cody D.D., Price R.E., Xu X.C., Narayanan R., Weigel N.L., Kurie J.M. 2005. c-Jun N-terminal kinase contributes to aberrant retinoid signaling in lung cancer cells by phosphorylating and inducing proteasomal degradation of retinoic acid receptor alpha. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 1054–1069.
- Statistisches Bundesamt Deutschland. 2012. Gesundheit: Todesursachen in Deutschland. Fachserie 12 Reihe 4. Wiesbaden.
- Stickeler E., Wäsch R., Runnebaum I.B., Waller C.F. 2010. Maligne Ovarialtumoren. In: Das Rote Buch: Hämatologie und Internistische Onkologie. Berger D.P., Engelhardt R., Mertelsmann R., ecomed Medizin. 4. Auflage, Heidelberg: 824-832.
- Tchernitsa O.I., Sers C., Zuber J., Hinzmann B., Grips M., Schramme A., Lund P., Schwendel A., Rosenthal A., Schäfer R. 2004. Transcriptional basis of KRAS oncogene-mediated cellular transformation in ovarian epithelial cells. *Oncogene* **23(26)**: 4536-4555.
- Tingulstad S., Skjeldestad F.E., Halvorsen T.B., Hagen B. 2003 Survival and prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Obstet Gynecol* **101(5 Pt 1)** :885-891.
- Toft D. J., Rosenberg S. B., Bergers G., Volpert O., Linzer D.I. 2001. Reactivation of proliferin gene expression is associated with increased angiogenesis in a cell culture model of fibrosarcoma tumor progression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**: 13055–13059.
- Trimbos J.B., Parmar M., Vergote I., Guthrie D., Bolis G., Colombo N., Vermorken J.B., Torri V., Mangioni C., Pecorelli S., Lissoni A., Swart A.M. 2003 International Collaborative Ovarian Neoplasm 1; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Collaborators-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm. International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1 and Adjuvant ChemoTherapy In Ovarian Neoplasm trial: two parallel randomized phase III trials of adjuvant chemotherapy in patients with early-stage ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* **15;95(2)**: 105-112.
- Tropé C., Kaern J. 2007. Adjuvant Chemotherapy for Early-Stage Ovarian Cancer: Review of the Literature. *J Clin Oncol* **25**: 2909-2920.
- Tsuruta F., Sunayama J., Mori Y., Hattori S., Shimizu S., Tsujimoto Y., Yoshioka K., Masuyama N., Gotoh Y. 2004. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J.* **23**: 1889–1899.

- Valentin L. 2000. Comparison of Lerner score, Doppler ultrasound examination, and their combination for discrimination between benign and malignant adnexal masses. *ultrasound Obstet Gynecol* **15**: 143-147.
- Vega A. 2010. Beyond BRCA1 and BRCA 2 wild-type breast and/or ovarian cancer families: germline mutations in TP53 and PTEN. *Clin Genet* **77**: 193-196.
- Vesely P. W., Staber P.B., Hoefler G., Kenner L. 2009. Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutation Research* **682**: 7–12.
- Vinciguerra M., Vivacqua A., Fasanella G., Gallo A., Cuozzo C., Morano A., Maggiolini M., Musti A.M. 2004. Differential phosphorylation of c-Jun and JunD in response to the epidermal growth factor is determined by the structure of MAPK targeting sequences. *J. Biol. Chem.* **279**: 9634–9641.
- Vivas-Mejia P., Benito J.M., Fernandez A., Han H.D., Mangala L., Rodriguez-Aguayo C., Chavez-Reyes A., Lin Y.G., Carey M.S., Nick A.M., Stone R.L., Kim H.S., Claret F.X., Bornmann W., Hennessy B.T., Sanguino A., Peng Z., Sood A.K., Lopez-Berestein G. 2010. c-Jun-NH2-kinase-1 Inhibition Leads to Antitumor Activity in Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* **16**:184-194.
- Vogt P.K. 2001. Jun, the oncoprotein. *Oncogene* **20**: 2365-2377.
- Vogt, P.K. 2002. Fortuitous convergences: the beginnings of JUN. *Nature Rev. Cancer* **2**: 465–469.
- Wagner U. Köhler S., Reinartz S., Giffels P., Huober J., Renke K., Schlebusch H., Biersack H.J., Möbus V., Kreienberg R., Bauknecht T., Krebs D., Wallwiener D. 2001. Immunological consolidation of ovarian carcinoma recurrence with monoclonal anti-idiotypic antibody ACA 125: immune responses and survival in palliative treatment. *Clin Cancer Res* **7**: 1112-1115.
- Weber G., Merz E., Bahlmann F., Leber A.M. 1999. A new sonomorphologic scoring system (Mainz Score) the assessment of ovarian tumors using transvaginal ultrasonography. Part II Postmenopause. *Ultraschall Med* **20**: 2-8.
- Weiss C., Schneider S., Wagner E.F., Zhang X., Seto E., Bohmann D. 2003. JNK phosphorylation relieves HDAC3-dependent suppression of the transcriptional activity of c-Jun. *EMBO J.* **22**:3686–3695.
- Weitzman J B., Fiette L., Matsuo K., Yaniv M. 2000. JunD protects cells from p53-dependent senescence and apoptosis. *Mol. Cell* **6**: 1109–1119.
- Wellen, K. E., Hotamisligil G.S. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Investig.* **115**: 1111–1119.
- Whiteman D.C., Siskind V., Purdie D.M., Green A.C. 2003. Timing of pregnancy and the risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **12**: 42-46.
- Wisdom R., Johnson R. S., Moore C. 1999. c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J.***18**: 188–197.
- Wittekind Ch., Meyer H.J., (Hrsg.). 2009. UICC, TNM Klassifikation maligner Tumoren. 7. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg.
- Yang D. H., Smith E. R., Cohen C., Wu H., Patriotis C., Godwin A.K., Hamilton T.C., Xu X.X. 2002. Molecular events associated with dysplastic morphologic transformation and initiation of ovarian tumorigenicity. *Cancer* **94**: 2380-2392.

Yang, D. D., Kuan C.-Y., Whitmarsh A.J., Rincón M., Zheng T.S., Davis R.J., Rakic P., Flavell R.A. 1997. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* **389**: 865-870.

Yazgan O., Pfarr C.M. 2002. Regulation of two JunD isoforms by Jun N-terminal kinases. *J Biol Chem* **277**: 29710–29718.

Yokoyama Y., Charnock-Jones D.S., Licence D., Yanaihara A., Hastings J.M., Holland C.M., Emoto M., Umemoto M., Sakamoto T., Sato S., Mizunuma H., Smith S.K. 2003. Vascular endothelial growth factor-D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma. *BJC* **88**: 237-244.

Yoshida H., Hastie C.J., McLauchlan H., Cohen P., Goedert M. 2004. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-Jun N-terminal kinase (JNK). *J. Neurochem.* **90**: 352–358.

Zoumpourlis V., Papassava P., Linardopoulos S., Gillespie D., Balmain A., Pintzas A. 2000. High levels of phosphorylated c-Jun, Fra-1, Fra-2 and ATF-2 proteins correlate with malignant phenotypes in the multistage mouse skin carcinogenesis model. *Oncogene*. **19**: 4011-4021.

Zhou H., Gao J., Lu Z.Y., Lu L., Dai W., Xu M. 2007. Role of c-Fos/JunD in protecting stress-induced cell death. *Cell Prolif.* **40**: 431-444.

Lebenslauf

Danksagung

Auf diesem Wege möchte ich mich sehr gerne bei Frau Dr. rer. nat. Karin Milde-Langosch für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas bedanken. Zu jeder Phase dieser Arbeit stand sie mir warmherzig mit Rat und Tat zur Seite. Ihre Unterstützung und die zahlreichen anregenden Diskussionen zum Thema haben somit maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen. Vielen Dank dafür.

Bedanken möchte ich mich ebenso bei Maila Rossberg, Kathrin Eylman sowie Kathi Beck für die professionelle Einarbeitung in die Methodik. Kathrin Eylmann danke ich besonders für die Unterstützung bei der Anfärbung zahlreicher immunhistochemischer Präparate. Die hilfsbereite Art aller hat zu einer außerordentlich freundschaftlichen Atmosphäre im Labor geführt. Die Zeit in dieser Arbeitsgemeinschaft wird mir immer in positiver Erinnerung bleiben.

Ein herzliches Dankeschön gilt Herrn PD Dr. med. Sven Mahner sowie Herrn Dr. med. Fabian Trillsch für die äußerst konstruktiven Diskussionen bezüglich des im Oktober mit Teilen dieser Arbeit veröffentlichten Artikels.

Herrn Prof. Dr. med. Udo Schumacher danke ich recht herzlich für die Bereitstellung von Paraffinschnitten des Würzburger Ovarialtumor-Kollektivs zur Anfertigung von immunhistologischen Untersuchungen.

Weiterhin möchte ich mich bei Roland Flurschütz für die Aktualisierung der Ovarialkarzinom-Datenbank bedanken.

Mein großer Dank gilt Lennart für die unermüdliche Unterstützung und die aufmunternden Worte, wann immer ich welche gebraucht habe.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern ganz besonders danken. Sie haben mir nicht nur das Medizinstudium ermöglicht, sondern standen mir auch in allen Lebenslagen liebevoll zur Seite.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Ort, Datum, Unterschrift

Kerstin Eckhoff