

Aus der Medizinischen Klinik  
mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Deregulation von Zellzyklus und Apoptose beim Ovarialkarzinom**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Natascha Engel  
aus Frankfurt am Main

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. P. T. Daniel  
2. Prof. Dr. K. Schulze-Osthoff  
3. Prof. Dr. med. A. Schneider

Datum der Promotion: 19.09.2008

## **Meinen Eltern**

<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Ovarialkarzinom – Epidemiologie und klinische Praxis	1
1.1.1 Epidemiologie, Pathogenese und Pathologie	1
1.1.2 Diagnose und Stadieneinteilung	6
1.1.3 Therapie und klinische Prognose	8
1.2 Tumorbiologie – Deregulation von Zellzyklus und Apoptose	13
1.3 Molekulare Diagnostik des Ovarialkarzinoms	26
<b>2 Aufgabenstellung und Vorgehensweise</b>	<b>31</b>
<b>3 Patienten und Methoden</b>	<b>33</b>
3.1 Patienten	33
3.1.1 Avidin-Biotin-Methode	33
3.1.2 Immunhistochemisches Protokoll	34
3.1.3 Immunhistochemische Auswertung und Interpretation	36
3.2 P53-Mutationsanalyse	37
3.3 Statistische Auswertung	37
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>39</b>
4.1 Patientenkollektiv und Nachbeobachtung	39
4.2 Analyse der Expressionsprofile von Zellzyklus- und Apoptosegenen	41
4.3 Untersuchung der Expressionsprofile von Bax, Bak, Bok, p21 <sup>Cip/WAF-1</sup> und p16 <sup>INK4a</sup> in Relation zu den klinisch-pathologischen Parametern	42
4.4 Klinisch-pathologische Parameter im Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben	45
4.5 Korrelation zwischen Genexpression und Gesamtüberleben	46
4.6 Kombination von Einzelgenanalysen zur Erstellung von Risikoprofilen	48
4.7 Mutationsanalyse von p53 in Relation zu Protein-Expressionsprofilen	55
4.8 Multivariate Regressionsanalyse für das Gesamtüberleben	60
<b>5 Diskussion</b>	<b>62</b>
5.1 Klinische Ergebnisse - bisherige Wegweiser in der medizinischen Praxis	62
5.2 Molekulare Ergebnisse - Einordnung in den Stand des Wissens	63
5.3 p21 <sup>Cip/WAF-1</sup> - zwischen Zellzyklusarrest und Zelltod	64
5.4 Rolle von Bak im Vergleich zu seinen Homologen Bax und Bok	67
5.5 Einfluß von p53-Inaktivierung auf die Effektoren des p53-Signalwegs	69
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>72</b>
<b>7 Literatur</b>	<b>73</b>
<b>Abkürzungen</b>	

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Ovarialkarzinom – Epidemiologie und klinische Praxis

Das Ovarialkarzinom ist nach dem Korpuskarzinom der zweithäufigste Genitaltumor der Frau. Die heute allgemein akzeptierte Therapie besteht aus radikaler tumorreduktiver Operation mit anschließender kombinierter Chemotherapie (Carboplatin und Paclitaxel). Aktuell stellt das Ovarialkarzinom die Hauptursache der Todesfälle als Folge gynäkologischer Erkrankungen in Deutschland dar. Die meisten Patientinnen befinden sich aufgrund des zunächst symptomarmen Verlaufs der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits in einem fortgeschrittenen Stadium. Eine frühere Detektion des Ovarialkarzinoms würde die Prognose verbessern. Laut AGO (Arbeitsgemeinschaft für Onkologie) ist ein Screening mit Hilfe des Transvaginalschalls als präventive diagnostische Maßnahme zur Früherkennung des Ovarialkarzinoms möglicherweise in Risikogruppen (Patientinnen mit Ovarialkarzinom in der Familienanamnese) zu empfehlen. In der Routine erscheint die transvaginale Sonographie als Untersuchung zur Krebsfrüherkennung zum Nachweis des Ovarialkarzinoms ggf. bei postmenopausalen Patientinnen sinnvoll. Nach den Empfehlungen des Tumorzentrums Heidelberg/Mannheim für eine standardisierte Diagnostik des Ovarialkarzinoms [43] würde selbst bei einem Screeningtest mit einer Spezifität von 99% und einer Sensitivität von 100% aufgrund der niedrigen Prävalenz nur eine von 21 Frauen mit positivem Testergebnis tatsächlich an einem Ovarialkarzinom leiden. Zur Zeit rät die AGO daher, die routinemäßige Messung bestimmter molekularer Prognosemarker nur zu Studienzwecken durchzuführen.

Zwei Drittel der Patientinnen sprechen nicht auf eine Chemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel an oder erleiden ein Rezidiv. Eine Chemotherapie beim Ovarialkarzinom wirkt also häufig nicht lebensverlängernd, zudem vermindert sie während der Therapie massiv die Lebensqualität der Patientin. Aktuell gilt, dass der Krankheitsverlauf des Ovarialkarzinoms und seine Prognose abhängig vom Zeitpunkt der Diagnosestellung und der Primärtherapie sind. Ziel dieser Arbeit ist daher, über Messung molekularer Marker die Aggressivität der Tumoren individuell zu bestimmen und neue valide Prognosefaktoren zu erarbeiten. Dadurch könnten Therapien optimiert, unnötige Therapien vermieden und das Überleben der Patientin verbessert werden.

### 1.1.1 Epidemiologie, Pathogenese und Pathologie

Die Inzidenz an Ovarialkarzinomerkrankungen (ICD-10 C56) beträgt in den industrialisierten Ländern aktuell 1-2% [5]. In der Bundesrepublik liegt die Zahl der Neuerkrankungen an

Ovarialkarzinomen bei 23 pro 100.000 Einwohnerinnen pro Jahr. Das Ovarialkarzinom ist die sechsthäufigste Krebserkrankung bei Frauen (Abbildung 1). In Deutschland erkranken rund 10.000 Frauen jährlich an einem bösartigen Tumor der Ovarien. Ihr durchschnittliches Alter beträgt zum Zeitpunkt der Erkrankung 66 Jahre (Abbildung 2). Das mittlere Erkrankungsalter liegt damit etwa ein Jahr niedriger als das aller Malignomkrankungen. Mit zunehmendem Alter steigt die Inzidenz des Ovarialkarzinoms bis auf 54 pro 100.000 Einwohnerinnen. Somit liegt die höchste Inzidenz in der Altersgruppe  $\geq 75$  Jahre (Tabelle 1). Im Vergleich der EU-Ländern zeigt sich ein Nord-Süd-Gefälle der Inzidenz. Am häufigsten tritt das Ovarialkarzinom in Skandinavien, insbesondere Dänemark und Schweden, den Niederlanden und Irland auf. In Südeuropa (Italien, Portugal, Spanien und Griechenland) ist die Inzidenz am geringsten. Amerikanische Statistiken zeigen höchste Inzidenzraten bei weißen und hawaiianischen Frauen, mittlere unter afro-amerikanischen und hispano-amerikanischen Frauen und Amerikanerinnen asiatischer Abstammung sowie niedrigste unter den Ureinwohnerinnen Amerikas [16].

Die Prognose für am Ovarialkarzinom erkrankte Frauen ist schlecht. Etwa 75% der Patientinnen befinden sich bei Erstdiagnose bereits in einem fortgeschrittenen Stadium. Das erklärt, warum die 5-Jahres-Überlebensrate nur 39 % beträgt.

**Tabelle 1:** Altersabhängige Inzidenz und Mortalität maligner Ovarialtumoren in Dtschl. [5]

Alter in Jahren	Fälle pro 100.000	
	Inzidenz	Mortalität
< 45	5,0	0,8
45 bis < 60	24,4	10,6
60 bis < 75	49,7	33,3
75 und älter	77,1	60,7
Insgesamt	23,5	14,3

Rund 90% der Ovarialmalignome sind Ovarialkarzinome. Ovarialkarzinome entwickeln sich aus dem Zölomepithel des Ovars. Trotz weitgehend unklarer Ätiologie sind zahlreiche Risikofaktoren bekannt. Mit Ausnahme genetischer Einflüsse, zeigen diese jedoch eine Risikoerhöhung von maximal 2-3% an. Neben der Inzidenzzunahme bei steigendem Lebensalter erweisen sich Umwelt- und Ernährungsfaktoren (Fleisch und Fett), reproduktive Parameter wie z.B. das Ovulationsalter (kumulative Zahl der Follikelrupturen), als Risikofaktoren. Als Ursache kommen sowohl inflammatorische Prozesse am Ovar, als Folge einer Ovulation, sowie Mutationen im Rahmen der ständigen ovariellen Reparaturprozesse nach Follikelruptur in Frage

[43,3]. Es gibt widersprüchliche Ergebnisse zu der Frage, ob sich das Risiko zu erkranken durch ovulationsauslösende Medikamente, wie sie in der Fertilitätsmedizin Anwendung finden, erhöht [7]. In den Industrienationen sinkt die Inzidenz der betroffenen jüngeren Frauen (unter 45 Jahre), was auf die vermehrte Einnahme von Ovulationshemmern zurückzuführen sein könnte.

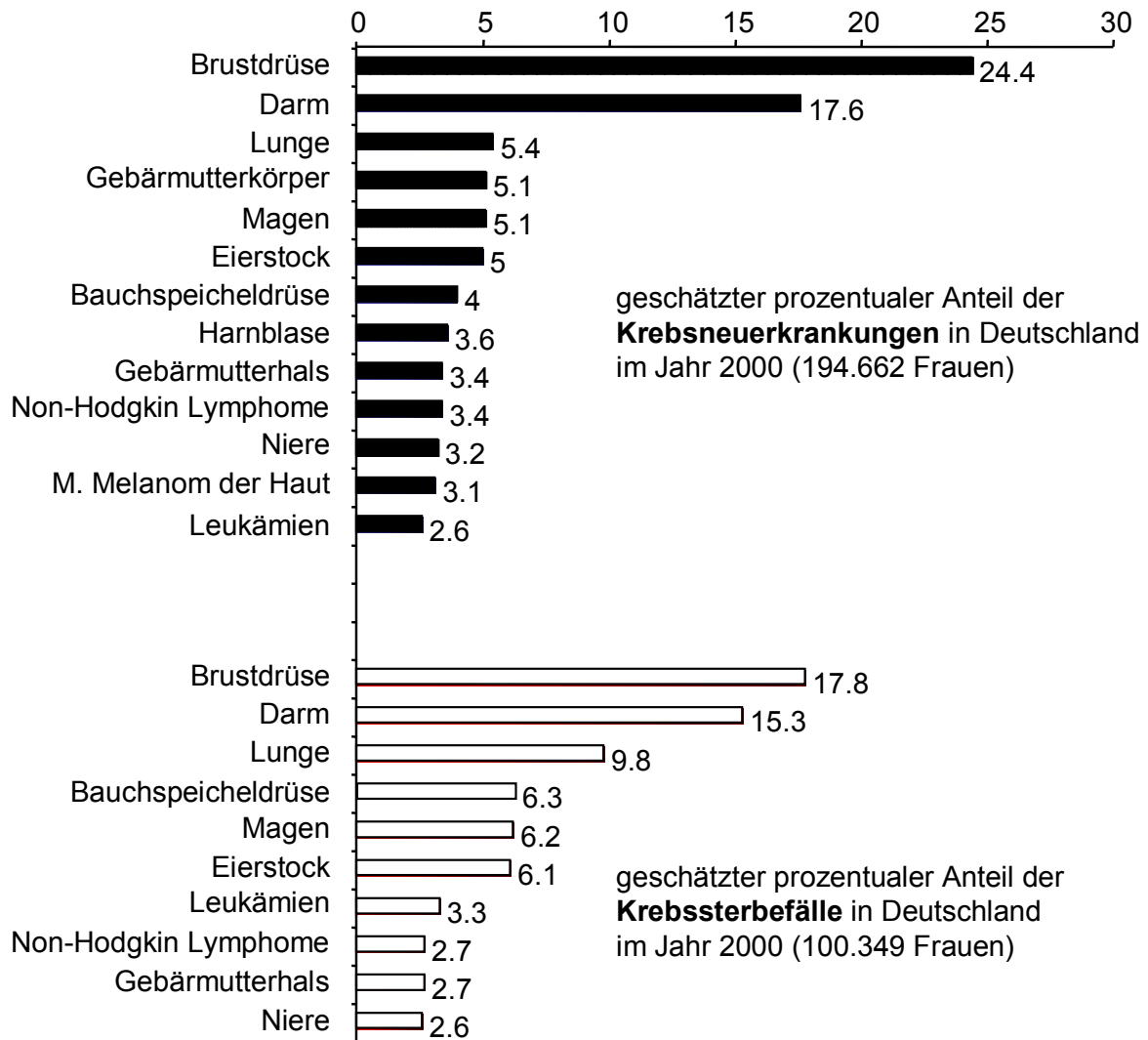


Abbildung 1: Prozentuale Verteilung der Neuerkrankungen von Malignomen in Dtschl. [5]

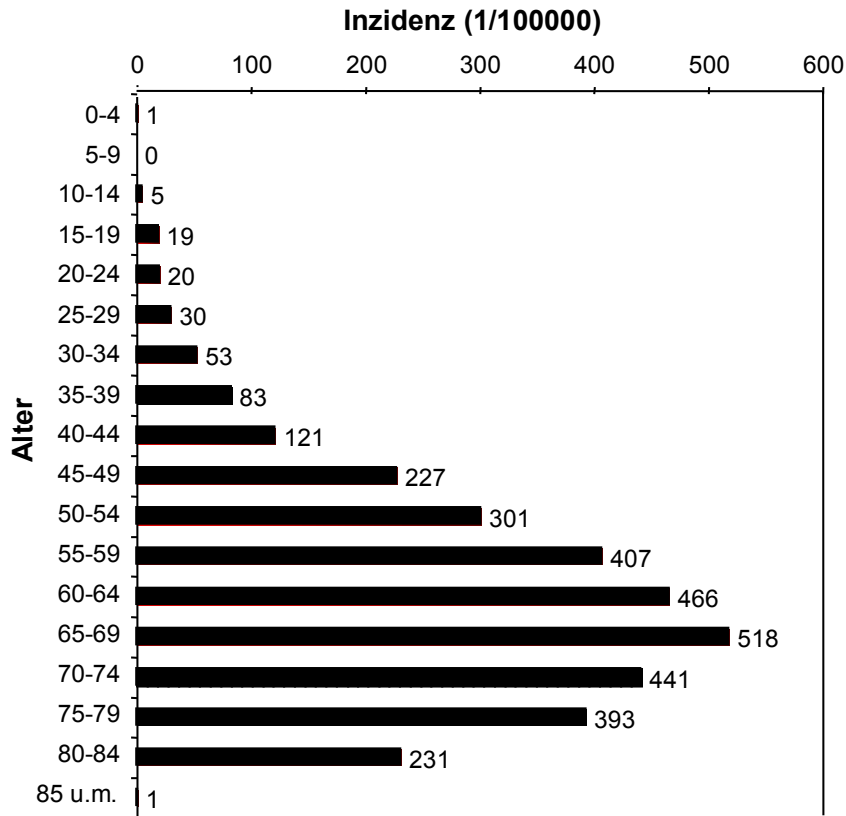


Abbildung 2: Altersabhängige Verteilung der Inzidenz des Ovarialkarzinoms, Saarland [63]

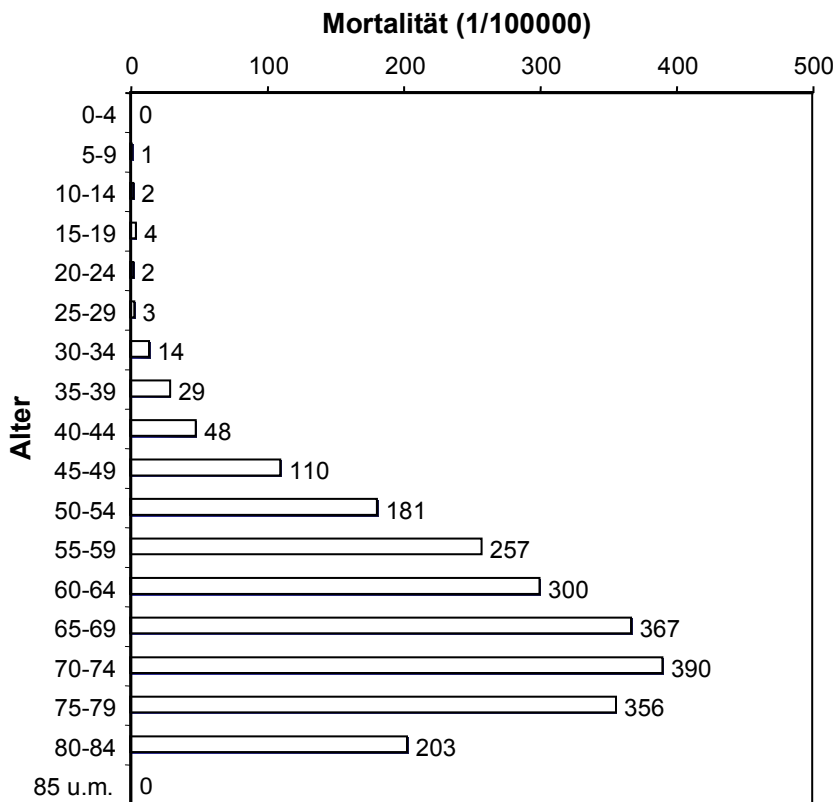


Abbildung 3: Altersabhängige Mortalität des Ovarialkarzinom, Saarland [63]



Zu den protektiven Faktoren zählt neben der Dauer der Einnahme oraler Kontrazeptiva auch die Anzahl der Schwangerschaften. Hysterektomie und Tubenligatur gehören durch die Verkappung der Verbindung zwischen Abdomen und der Umwelt und somit eventuell schädigenden Noxen ebenfalls zu dieser Gruppe [72]. Fettleibigkeit erhöht das Risiko, prämenopausal an einem Ovarialkarzinom zu erkranken [57].

Ein wichtiger Bestandteil der frühen Diagnostik des Ovarialkarzinoms ist die Familienanamnese. Es wird unterschieden zwischen dem Auftreten von Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen bei Verwandten ersten Grades (Lynchsyndrom I-II) und dem multiplen Karzinomsyndrom oder auch Lynch-Syndrom III (Kolorektales Karzinom, Endometriumkarzinom, Karzinome des oberen Gastrointestinaltrakts). Letztgenanntes ist identisch mit dem hereditären, non-polypösen kolorektalen Karzinom [43]. Ist eine Verwandte ersten Grades bereits betroffen, liegt das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, bei 5%. Bei zwei Krankheitsfällen in der Familie steigt das Risiko auf 7%. Handelt es sich um ein hereditäres Karzinom, wovon beim Erkrankungsfall zweier Verwandter ersten Grades zu 3% auszugehen ist, liegt die Wahrscheinlichkeit der Manifestation der Erkrankung bei 40%.

Die genetischen Grundlagen dieser Vererbbarkeit sind häufig ungeklärt. Beschrieben sind Defekte in Tumorsuppressorgenen (p53, BRCA1/2) und des DNA-Mismatch Reparatursystems.

Mutationen der Tumorsuppressorgene BRCA1 und 2 auf den Chromosomen 17 und 13 erhöhen die Wahrscheinlichkeit, an einem Mamma- oder Ovarialkarzinom zu erkranken. Um das Risiko für Verwandte ersten Grades abzuschätzen, wird die Analyse von BRCA1 und 2 bei bestimmten familiären Erkrankungskonstellationen durchgeführt. Für Trägerinnen eines BRCA1-Gendefekts beträgt die Wahrscheinlichkeit bis zum 70. Lebensjahr an einem Ovarialkarzinom zu erkranken 44%, hingegen 17% bei Trägerinnen eines BRCA2-Gendefekts. Derzeit wird ein blindes Screening aufgrund der damit verbundenen hohen Kosten nicht durchgeführt.

Folgende Risikofaktoren sind noch nicht abschließend geklärt: Noxen (Nikotin, Kaffee), Diäten, Infertilität, Alter bei Menarche und Menopause und Alter zum Zeitpunkt der ersten Geburt.

Ovarialtumoren lassen sich in Zysten, Adenome und echte Neoplasien einteilen. Neoplasien gliedern sich weiter in epitheliale, Stroma- und Keimzelltumoren. Rund 90% der malignen Ovarialtumoren sind epitheliale Tumoren. Diese lassen sich in die Gruppe der Borderline Tumore (Low Malignent Potential-Tumore, LMP) und der Ovarialkarzinome einteilen [22]. Das Ovarialkarzinom, als histologische Tumorentität aus der heterogenen Gruppe der Ovarialtumoren, stellt eine bösartige Neoplasie des Epithels an der ovariellen Oberfläche dar.

Man unterscheidet nach dem vorwiegenden Zelltyp seröse von muzinösen, endometrioiden, hellzelligen und kleinzelligen Karzinomen. Eine weitere Einteilung erfolgt, je nach Wachstumsmuster, in papilläre, zystische oder solide Karzinome.

Das Ovarialkarzinom ist dem extraovariellen Peritonealkarzinom sowohl klinisch und biologisch wie auch in Stadieneinteilung und Therapie ähnlich. Der Grund dafür ist, dass sich das Epithel an der ovariellen Oberfläche nicht vom Peritonealepithel unterscheidet. Beide Epithelarten leiten sich vom Zölomepithel (Müllerepithel) ab, aus dem auch das Epithel von Tube und Uterus hervorgeht.

### **1.1.2 Diagnose und Stadieneinteilung**

Der Ausgangspunkt der Diagnosestellung ist der klinische Zustand der Patientin. Meist ist eine unklare Zunahme des Bauchumfangs trotz Gewichtsabnahme bei Appetitverlust der Anlass für den Arztbesuch. Zusätzlich können unspezifische abdominelle Symptome auftreten. Die Extremform der klinischen Ausprägung ist die „Facies Ovarica“, d.h. der abgezehrte, ängstlich wirkende Gesichtsausdruck mit fahler Hautfarbe.

Als bildgebendes Verfahren ist der Transvaginalschall obligat. In den meisten Kliniken wird zudem präoperativ ein CT (Computertomogramm) durchgeführt, welches indiziert ist, wenn die Röntgenuntersuchung der Lunge einen unklaren Befund liefert. Bei Organüberschreitung ist die Durchführung eines MRT (Magnetresonanztomogramm) zusätzlich zur Rekto- und Zystoskopie sinnvoll. So lassen sich Tumorabsiedlungen entlang der Leber und des Diaphragmas detektieren und die Tumorausdehnung abschätzen. Dieses präoperative Staging dient zur optimalen Planung des operativen Eingriffs in interdisziplinärer Abstimmung mit Gynäkologen, Chirurgen und Urologen.

Ovarialtumoren lassen sich nach der TNM-Klassifikation (Tumor-Nodus-Metastase) der UICC (Union International Contre le Cancer) [22] oder nach der FIGO-Klassifikation [22,55,64] gliedern, die als klinisch-pathologische Stadieneinteilung etabliert ist. Eine Übersicht gibt Tabelle 2.

**Tabelle 2:** Tumor-Nodus-Metastase (TNM) und FIGO-Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms

<b>Primärtumor</b>		
T-Stadium	FIGO	
Tx		Primärtumor nicht beurteilbar
T0		kein Hinweis auf Primärtumor
Tis		Karzinom in situ
T1	I	Tumor begrenzt auf Ovarien
T1a	Ia	Tumor auf ein Ovar begrenzt, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars
T1b	Ib	Tumor auf beide Ovarien begrenzt, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche beider Ovarien
T1c	Ic	Tumor begrenzt auf ein Ovar oder beide Ovarien mit Kapselruptur, Tumor an Ovaroberfläche oder maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T2	II	Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus
T2a	IIa	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tuben
T2b	IIb	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
T2c	IIc	Ausbreitung im Becken (IIa oder IIb) und maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T3 und/oder...		
...N1,2	III	Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien, mit mikroskopisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen
...T3a	IIIa	mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
...T3b	IIIb	makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung größer/gleich 2 cm
T3c und/oder...		
...N1,2	IIIc	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens oder N1,2; größte Ausdehnung >2 cm und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
...M1	IV	Fernmetastasen (ausgenommen Peritonealmetastasen)
...Nx		regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
...N0		keine regionären Lymphknotenmetastasen
...N1		regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>Regionale Lymphknoten (N-Stadium)</b>		
Nx		regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
N0		keine lokoregionären Lymphknotenmetastasen
N1		Nachweis regionalen Lymphknotenbefalls
<b>Fernmetastasen (M-Stadium)</b>		
Mx		Beurteilung des Vorhandenseins von Fernmetastasen nicht möglich
M0		kein Nachweis von Fernmetastasen
M1		Vorhandensein von Fernmetastasen

### 1.1.3 Therapie und klinische Prognose

Das Ovarialkarzinom hat trotz Optimierung in der interdisziplinären Zusammenarbeit in der Therapie eine schlechte Prognose, die in erster Linie größtenteils auf eine späte Detektion zurückzuführen ist. Die meisten Ovarialkarzinome werden klinisch erst im Stadium FIGO III und IV evident. Amerikanischen Statistiken zufolge hat sich das Tumorgewebe bei 53% der Patientinnen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits außerhalb des kleinen Beckens ausgebreitet oder es liegt bereits eine Fernmetastasierung vor [29]. Dies trifft vor allem auf die häufig auftretenden serösen und mucinösen Karzinome zu. Endometrioide, klein- und hellzellige Ovarialkarzinome werden zwar häufig früher entdeckt, ihre Prognose ist jedoch auf das Stadium bezogen meist schlechter als die der serösen und mucinösen Karzinome.

Die Standardtherapie besteht aus primärer Operation mit konsekutiver Chemotherapie. Dabei ermöglicht der intraoperativ durchgeführte Schnellschnitt im Fall einer eindeutigen histologischen Diagnosesicherung ein einzeitiges operatives Vorgehen. Bei unklarem histologischen Befund mit oder ohne angestrebter Fertilitätserhaltung ist eine differenzierte morphologische Aufarbeitung des fixierten Operationsmaterials, gegebenenfalls mit zweizeitigem operativen Eingriff, vorzuziehen.

Der Therapieerfolg hängt von der intraoperativ erreichbaren Tumorfreiheit und vom Erkrankungsfortschritt ab. Je früher das Stadium der Erkrankung, desto besser ist die Prognose. Da der Tumor zu Beginn der Erkrankung sehr gut differenziert ist, korreliert der Prognoseerfolg mit einem niedrigen Grading des Tumors. Dagegen ist bei Einsatz einer Chemotherapie die Prognose umso besser, je weniger differenziert das Karzinom ist. Das liegt daran, dass weniger differenzierte Karzinome besser auf eine Chemotherapie ansprechen als differenzierte Karzinome.

Über das therapeutische Vorgehen entscheidet neben dem Allgemeinzustand der Patientin und eventueller Begleiterkrankungen das Ergebnis des intraoperativen Stagings. Hiervon hängt der systemische Behandlungsmodus ab. Die nachfolgend beschriebenen Therapiemodalitäten basieren auf Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften DGOG (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe), Informationszentrum für Standards in der Onkologie (ISTO) und der Arbeitsgruppe gynäkologische Onkologie (AGO).

### *Operative Primär- und Rezidivtherapie*

Ziel der operativen Therapie ist die komplette Reduktion des Tumors. Beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom ist die Größe des postoperativ verbliebenen Tumorrests entscheidend für die Prognose. Ziel ist das Debulking auf 0,5 – 1 cm des Residualtumors.

Die Staginglaparotomie beinhaltet Längslaparotomie, Hysterektomie, beidseitige Adnexektomie mit hoher Resektion der Ovarialgefäßbündel, infragastrische Omentektomie, Appendektomie, Entnahme von Peritonealbiopsien, gegebenenfalls mit Resektion von Douglas- und Blasenperitoneum, Entnahme von zytologischen subdiaphragmatischen Abstrichproben, peritoneale Spülzytologie und die Entfernung allen suspekten Tumorgewebes. Beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom können Darmresektion, Zwerchfelldeperitonealisierung, Splenektomie und die Pankreasteilresektion indiziert sein. Diese Maßnahmen sind aufgrund einer erhöhten perioperativen Mortalität und Morbidität individuell zu diskutieren. Die retroperitoneale pelvine und paraaortale Lymphonodektomie dient prognostischen Zwecken. Sie wird nur bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom mit intraabdominal erreichter Tumorfreiheit empfohlen. Durch die Staging-Operation erfolgt die Stadieneinteilung der Tumorerkrankung, von der die weitere postoperative systemische Therapie abhängt.

Die früher regelmäßig durchgeführte Second-Look-Operation (SLO), dient lediglich der Überprüfung des Therapieerfolges. Sie ist außerhalb von Studien obsolet [67].

Eine Intervalloperation zur Tumorreduktion wird durchgeführt, wenn nach der Primäroperation Resttumore verblieben sind, die auf die konsekutive (adjuvante) Chemotherapie angesprochen haben. Die Intervalloperation dient dann der Prognoseverbesserung [107].

Eine Rezidivoperation ist bei Patientinnen mit Spätrezidiv indiziert, d.h. wenn ein Rezidiv mehr als 12 Monaten nach Ende der Primärtherapie auftritt. Die Rezidivoperation kann die Lebensdauer der Patientinnen verlängern.

Ein fertilitätserhaltendes Vorgehen ist bei jungen Frauen mit Ovarialkarzinom im Stadium FIGO Ia Grading G1 möglich. Dabei werden Uterus und kontralaterales Ovar erhalten.

### *Postoperative (adjuvante) Chemotherapie*

Eine adjuvante Chemotherapie bei Low-Risk-Patientinnen mit Vorliegen eines G1 Tumors im Stadium FIGO Ia/Ib verbessert die Prognose nicht. Frauen mit einem hochdifferenzierten Tumor in diesem Stadium haben postoperativ per se eine 5-Jahres-Überlebensrate von mehr als 90 %. Bei High-Risk-Patientinnen der Gruppe I (Ia/Ib G(2)/3, Ic, ausgeprägter Aszites, klarzelliger Subtyp) wird die Prognose durch eine adjuvante Chemotherapie verbessert. Ergebnisse der

beiden klinischen Studien ACTION und ICON-1 über das frühe Ovarialkarzinom zeigen einen Effekt auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben der Patientenkollektive [106]. In der ACTION-Studie zeigt sich eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens und des krankheitsfreien Überlebens im Falle des inadäquaten operativen Stagings, das heißt wenn Tumorreste unentdeckt in der Abdominalhöhle verblieben sind. Dagegen wird in der ICON-Studie ein positiver Effekt über das gesamte Kollektiv hinweg verzeichnet.

Standard bei Patientinnen der FIGO-Gruppen II bis IV ist die Durchführung einer adjuvanten platinhaltigen Chemotherapie. Es wird davon ausgegangen, dass eine Dosisintensivierung den Therapieerfolg nicht verbessert. Standardmedikation ist Cisplatin 50-75 mg/m<sup>2</sup> oder Carboplatin AUC 4-5 in einer Kombination mit Paclitaxel 175mg/m<sup>2</sup> als Primärtherapie im dreiwöchigen Abstand mit ausreichender Antiemetikaprophylaxe. Diese führt zu besseren Ergebnissen als die Kombination mit Cyclophosphamid, die bezüglich des Therapieerfolges der Platinmonotherapie gleichzusetzen ist. Carboplatin besitzt hierbei ein günstigeres Toxizitätsprofil als Cisplatin. Die Behandlung bei fortgeschrittener Erkrankung sollte fünf bis sechs Zyklen im Rahmen der Primärtherapie dauern. Während weniger Zyklen den Behandlungserfolg verringern, zeigt eine längere Behandlungsdauer keinen Vorteil. Die Integration von Anthracyclinen neben Platin in das primäre Therapieregime bringt möglicherweise Behandlungsvorteile. Die Ergebnisse aktuell laufender Therapiestudien der AGO sollen diese Fragestellung definitiv beantworten.

Eine Konsolidierungstherapie/Erhaltungstherapie wird nur in Studien bei pCR- und PR-Patientinnen durchgeführt, vorausgesetzt, es liegt ein chemosensibler Tumor vor. Es ist allerdings ungeklärt, ob das Rezidivrisiko durch eine Erhaltungstherapie vermindert und/oder das rezidivfreie Intervall und die Gesamtüberlebenszeit verlängert werden.

#### *Chemotherapie bei Tumorprogression oder Tumorrezidiv*

Trotz verbesserter Therapieergebnisse in der Primärbehandlung des Ovarialkarzinoms erleidet die Mehrzahl der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom ein Rezidiv. Eine Chemotherapie bei Tumorprogression oder Tumorrezidiv kann zur Remissionsinduktion unter Beachtung der individuellen Situation der Patientin zur Wahrung der Lebensqualität durchgeführt werden. Diese Durchführung erfolgt jedoch nicht unter kurativem Ansatz. Tritt ein Tumorrezidiv oder Tumorprogression mehr als sechs Monate nach der Primärtherapie eines platinsensiblen Tumors auf, kann erneut Platin angewandt werden. Dabei gilt, dass umso besser auf platinhaltige Substanzen angesprochen wird, je länger das rezidivfreie Intervall ist. Des Weiteren stehen Monotherapien mit Etoposid, Paclitaxel, Topotecan, liposomalem Doxorubicin oder Treosulfan mit seinem günstigen Toxizitätsprofil zur Verfügung. Durch

Kombinationstherapien verspricht sich die AGO keine Verbesserung. Erste Studien zeigen jedoch, dass sich durch kombinierte Anwendung von Carboplatin mit Paclitaxel oder mit Gemcitabine eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens erzielen lässt [79], wobei die Wahl der jeweiligen Kombination von Toxizitätskriterien abhängig ist. Durch die Monotherapie bei Tumorprogression oder Tumorrezidiv lassen sich Remissionsraten (Complete Reduction, CR + Partial Reduction, PR) von etwa 20 % induzieren. Auswirkungen dieser Chemotherapien auf das Gesamtüberleben sind nicht nachgewiesen.

Patientinnen mit primär platinresistenten Tumoren zeigen kein Ansprechen auf die Primärtherapie bzw. weisen innerhalb von 6 Monaten ein Rezidiv auf. Hier sollte gemäß oben beschriebener Therapiealternativen eine platinfreie Monotherapie durchgeführt werden.

### *Endokrine Therapie*

Ovarialkarzinome, die sich in der Primärtherapie als platinresistent erweisen, bieten limitierte Chemotherapiemöglichkeiten. Mit den bisher verfügbaren Zytostatika liegen die Ansprechraten bei unter 25%. Effekte dieser Dritt- oder Viertlinien-Chemotherapien auf das Überleben sind bisher noch nicht nachgewiesen. In solchen Fällen stellen nebenwirkungsarme endokrine Therapien eine wichtige therapeutische Option dar. Zwar liegen die objektiven Ansprechraten unter 20% und damit knapp unter denen von Chemotherapien, allerdings sind endokrine Therapien weniger toxisch. Zumindest bei Patientinnen, die eine weitere Chemotherapie ablehnen oder denen diese wegen der Toxizität nicht mehr zumutbar ist, sollte an eine endokrine Therapie gedacht werden.

Die Analyse vorliegender Studien zur Gestagentherapie bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom ergibt eine mittlere Ansprechrate von 7%. Die Rate an Krankheitsstabilisierungen liegt im Mittel bei 10%. Klinisch relevant sind die roborierenden Effekte von hochdosierten Gestagenen, insbesondere deren statistisch signifikante Wirkung auf das tumorinduzierte Anorexie/Kachexie-Syndrom. Die zusätzliche Behandlung mit Östrogenen erbrachte keine überzeugende Steigerung der Ansprechraten.

Tamoxifen führte in der Rezidivsituation bei 11% der Patientinnen zu einer objektiven Tumorrückbildung. Darüber hinaus ist bei 24% der Behandelten ein Stillstand der Tumorbildung zu beobachten.

Androgene haben sich in der Rezidivsituation als unwirksam erwiesen. Die Ansprechraten von Antiandrogenern liegen unter 10%.

Im Mittel werden etwa 10% objektiver Remissionen und 20% Krankheitsstabilisierungen für die Anwendung von GnRH-Analoga angegeben. Die Ansprechraten variieren je nach Studie von 0 bis 20%.

### *Radiotherapie*

Die Strahlentherapie des Ovarialkarzinoms ist der Chemotherapie hinsichtlich des krankheitsfreien Intervalls und des Gesamtüberlebens unterlegen. Die Nebenwirkungsrate ist im Vergleich zur klassischen Chemotherapie höher.

### *Gentherapie*

Die Fremdgenintegration in somatische Zellen oder Keimbahnzellen wird zur Zeit nur in klinischen Studien durchgeführt. Durch das Einbringen von Fremdgenen, wie etwa p53, wird versucht, die Zellempfindlichkeit gegenüber Zytostatika zu modulieren.

### *Immuntherapie*

Aktuelle Studien zeigen, dass sich mit monoklonalen Antikörpern gegen Ca125, Her2-neu, HMFG u.a. vorgehen läßt.

Eine effiziente molekulare Therapie des Ovarialkarzinoms gibt es jedoch noch nicht. Dagegen hat sich in der klinischen Praxis die Herceptingabe bei cErbB2-Überexpression zur Behandlung des Mammakarzinoms bereits etabliert. In zahlreichen Ovarialkarzinomstudien werden molekulare Prognosemarker gemessen, um die Wirksamkeit konventioneller Therapien erhöhen zu können. Dabei liegt der Schwerpunkt in der Analyse von Proteinexpressionen oder mRNAs in Tumorgewebe. Ziel ist es, prognostische und prädiktive Marker für eine gezielte molekulare Tumortherapie zu entwickeln.

### *Nachsorge und Rehabilitation*

Die Nachsorge dient der Erkennung von Tumorrezidiv und -progression sowie der Behandlung therapiebedingter Nebenwirkungen. Schwerpunkt sollte auch die psychosoziale Betreuung der Patientin sein. In den ersten zwei Jahren nach Therapieabschluß sind bei erreichter Vollremission dreimonatige Intervalluntersuchungen sinnvoll. Danach sollten die Konsultationen alle sechs Monate stattfinden. Im palliativen Fall sind nach Bedarf individuelle Abstände zu wählen. Das postoperative Ca125-Screening zur frühzeitigen Rezidivdiagnostik ist sinnvoll. Bei Ca125-Anstieg und zugleich fehlender Symptomatik muß das Vorliegen eines Rezidiv vor erneuter zytostatischer Behandlung histologisch verifiziert worden sein. Zur Therapie von postmenopausalen Beschwerden erhöht die Östrogengabe vermutlich nicht das Risiko für ein Rezidiv. Beim Vorliegen eines endometrioiden Ovarialkarzinoms wird die kombinierte



Hormonersatztherapie (Hormone Replacement Therapy, HRT) mit Gestagenkomponente empfohlen. Apparatediagnostik (CT, MRT, PET) wird nur bei Verdacht auf ein Tumorrezidiv, z.B. bei entsprechender Klinik, betrieben.

Da die Prozedur zwischen Erstdiagnose und Therapieabschluss häufig belastend ist, ist eine Rehabilitationsmaßnahme zur Wiederherstellung des körperlichen und psychosozialen Wohlbefindens meist eine sinnvolle Ergänzung am Therapieende.

## **1.2 Tumorbiologie – Deregulation von Zellzyklus und Apoptose**

Voraussetzung für die physiologische Teilung von Zellen ist ein intakter und regulierter Ablauf des Zellzyklus. Dieser wird durch Aktivatoren und Inhibitoren kontrolliert. Dabei verdoppelt sich das Genom und verteilt sich exakt auf die beiden entstehenden Tochterzellen. Kontrollmechanismen ermöglichen einerseits die Reparatur auftretender DNA-Schäden, andererseits können sie die Zellen durch Apoptose (den programmierten Zelltod) eliminieren. Die Störung des dynamischen Gleichgewichts der adulten Zelle zwischen Zellproliferation und Apoptose führt zur Entstehung maligner Tumoren [117]. Durch Manipulation bestimmter Gene läßt sich beispielsweise zeigen, dass deren Mutation oder deregulierte Expression durch Steigerung des Zellwachstums bzw. durch Hemmung von Zelltodsignalen zu benignen und malignen Tumoren führt. So zeigte MCDONNELL in Untersuchungen an transgenen Mäusen, dass eine Überexpression des Überlebensgens bcl-2 im lymphozytären B-Zellkompartiment zur B-Zellhyperplasie führte [54]. Nach Ablauf einiger Zeit entwickelten sich hochmaligne B-Zell-Lymphome und bei der Hälfte der Mäuse konnten Mutationen von c-myc gefunden werden. Im Rahmen der Tumorprogression akkumulieren somit häufig weitere genetische Defekte, die das Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung- und Zelluntergang zusätzlich belasten [32]. Das zunehmende Ungleichgewicht erklärt auch die Möglichkeit einer Progression genetisch instabiler Tumoren mit dem Auftreten einer konsekutiven Therapieresistenz, auch als Folge von Chemotherapie oder Radiatio [104]. So bewirkt die Apoptosehemmung die Entstehung hyperplastischen Gewebes, welches wiederum die Wahrscheinlichkeit für das Überleben von Zellen mit tumorrelevanten genetischen Veränderungen erhöht. Folge dieses Vorgangs ist der Verlust der Proliferationskontrolle. Die physiologische Verknüpfung beider zellbiologischen Phänomene bedeutet, dass erst durch die gleichzeitige Störung von Zellzyklus- und Apoptoseregulation die Voraussetzungen für eine onkogene Transformation der betroffenen Zelle geschaffen sind.

### *Zellzyklus*

Zur mitotischen Teilung einer Zelle in zwei Tochterzellen muss die Mutterzelle zunächst aus der G<sub>0</sub>-Phase in die G<sub>1</sub>-Phase (Gap-Phase 1) des Zellzyklus eintreten. Mitogene Stimuli steigern die Cyclinexpression, deren Hoch- und Herunterregulierung sich zu verschiedenen Phasen des Zellzyklus beobachten lässt [28]. Die Cycline A, B, D1-3 und E regulieren als Kofaktoren die Enzymaktivität ihrer cyclinabhängigen Kinasen (CDK). Diese beeinflussen wiederum durch Phosphorylierung von Substratproteinen das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus. Zum Beispiel aktiviert die Phosphorylierung von Mitgliedern der Rb (Retinoblastomprotein)-Familie Transkriptionsfaktoren (TF) mit Promotoraktivität und ermöglicht den Eintritt in die nächste Zyklusphase [49]. Der Eintritt in den Zellzyklus ebenso wie das Fortschreiten in die S-Phase (Synthesephase), in der die Replikation der DNA stattfindet, wird durch den G<sub>1</sub>-Restriktionspunkt oder auch G<sub>1</sub>-Checkpoint in der späten G<sub>1</sub>-Phase reguliert. Checkpunkte verbinden zwei biochemisch voneinander unabhängige Regelwerke und kontrollieren die Befugnis der durch sie hergestellten Vernetzung [19]. Weitere Checkpunkte existieren in der S-Phase und der G<sub>2</sub>-Phase [41,109]. Die Segregation der replizierten DNA wird während des Durchlaufs der G<sub>2</sub>-Phase vorbereitet. Es schließt sich die M-Phase (Mitosephase) an, aus der zwei Tochterzellen hervorgehen, welche sich nun in der G<sub>1</sub>-Phase befinden. Genetische Stabilität ist dann gewährleistet, wenn sich das Genom der Mutterzelle exakt verdoppelt und exakt auf die Tochterzellen verteilt.

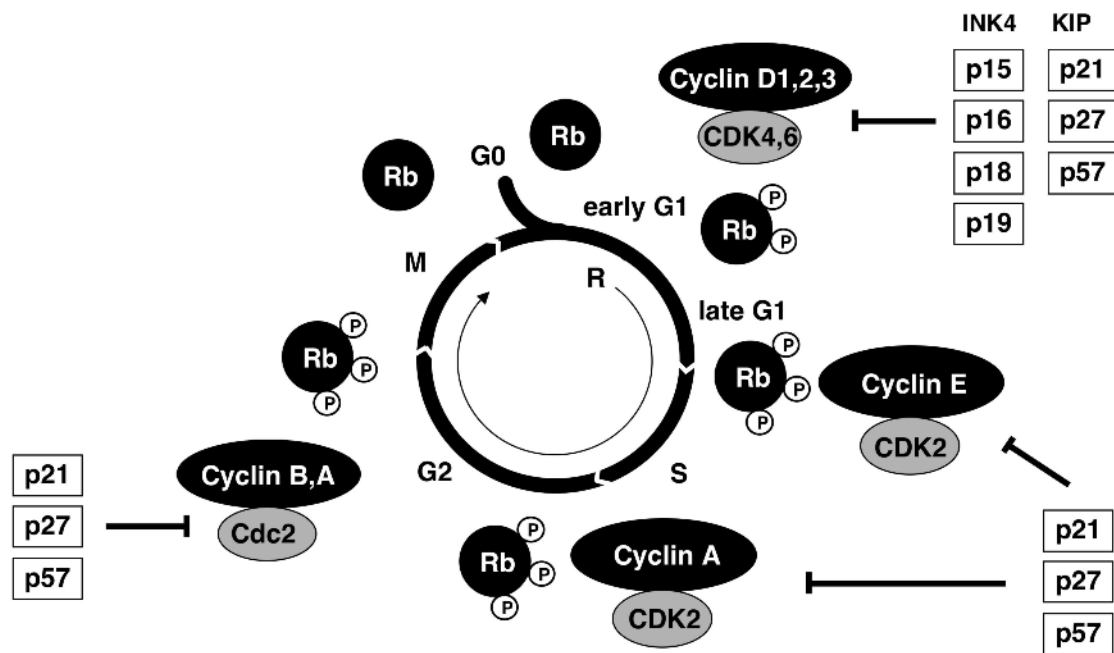
### *Zellzyklusregulatoren: Cycline, Cyclinabhängige Kinasen (CDK) und ihre Inhibitoren (CKI)*

Die Cycline werden als Motor des Zellzyklus bezeichnet. Nach Stimulation der ruhenden Zelle durch Wachstumsfaktoren bzw. proliferationsaktivierende Signale (z.B. vermittelt über die Ras-Aktivierung und die MAP-Kinase-Kaskade [51]) führen Cycline zur Bildung aktiver Cyclin/CDK-Komplexe. Diese sind wiederum durch Substratphosphorylierung in allen Zyklusphasen tätig und ermöglichen das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus [24]. Auch Ras-Aktivierung, Aktivierung der MAP-Kinase Kaskade oder NF- $\kappa$ B-Aktivierung stimulieren z. B. die Expression von Cyclin D1 und dessen beiden Homologen Cyclin D2 und D3. Cyclin D reagiert mit CDK4 und -6 in der frühen, Cyclin E mit seinem Partner CDK2 in der späten G<sub>1</sub>-Phase [44] (Abbildung 4). Cyclin A reagiert im Verlauf der S-Phase mit CDK2 und auch, v.a. in der späten S-Phase und am S/G<sub>2</sub> Übergang, mit CDK1 (Cdc2). In der G<sub>2</sub>-Phase und am G<sub>2</sub>/M-Übergangspunkt reagiert Cyclin B mit CDK1. Hier führt das Herunterregulieren von Cyclin B zur Hypophosphorylierung von Rb, womit über den APC-Mad-Signalweg und der Deaktivierung des Anaphasen-Checkpunkts der Zellzyklus vollendet und abgeschlossen ist [70].

Die cyclinabhängigen Kinasen regulieren den Übergang von der einen in die nächste Phase des Zellzyklus. Als aktive Cyclin/CDK-Komplexe phosphorylieren sie an den Kontrollpunkten des Zellzyklus Substratproteine, wie z.B. die Pocketproteine der Rb-Familie am G1-Restriktionspunkt. Die katalytischen Partner der D-Typ Cycline (Cyclin D1, D2 und D3) sind CDK4 und CDK6. Die Komplexbildung ermöglicht die Kinaseaktivität und somit die Phosphorylierung von Rb. Neben D-Cyclinen reguliert auch Cyclin E den G1-Restriktionspunkt. Cyclin E wird durch die Phosphorylierung von Rb hochreguliert. Cyclin E löst durch Aktivierung von CDK2 einen zweiten Rb-Phosphorylierungsschritt in der späten G1-Phase aus. Dadurch wird sowohl die Progression in die S-Phase und damit der Beginn der DNA-Replikation ausgelöst als auch die Duplikation des Zentrosoms als erster Schritt zur Verdopplung der Chromosomen initiiert.

Die Inhibitoren der CDK werden als CDKI bezeichnet (cyclin-dependent kinase inhibitors) und bremsen die Aktivität der CDK. Die CDKI unterteilen sich in zwei Subfamilien: Vertreter der CIP/KIP Familie hemmen multiple Cyclin/CDK-Komplexe, während INK4-Vertreter spezifisch die Funktion von CDK4 und CDK6 blockieren. Zu den CIP/KIP (CDK inhibiting protein/kinase inhibiting protein) zählen p21<sup>Cip/WAF-1</sup>, p27 und p57. Alle können über ihre homologe Domäne in-vivo an CDK2 und -4 binden, wodurch dessen Aktivität gehemmt wird [69]. In vitro ist eine Interaktion mit allen in der G1-Phase gebildeten CDK-Komplexen möglich.

Zur INK4-Familie (Inhibiert CDK4) gehören die Faktoren p14, p15, p16 und p18 [82]. Sie führen zum Zellzyklusarrest, da sie die Progression aus der G1-Phase in die S-Phase des Zyklus verhindern. Dies geschieht durch Hypophosphorylierung von Rb, indem die D-Cyclin-abhängige CDK4 und CDK6 gehemmt werden. Das hypophosphorylierte Rb hemmt wiederum die Aktivität bestimmter Transkriptionsfaktoren, u.a. E2F, wodurch die Expression von Cyclin E und weiterer Faktoren, die die G1-S-Transition ermöglichen, verhindert wird. Im Gegensatz zu den CDK zeigen die Cycline im Zellzyklusverlauf keine lange Halbwertszeit und werden rasch über das Proteasom abgebaut. Das nächste Cyclin wird währenddessen bereits wieder hochreguliert. So führt das Herunterregulieren des Cyclin B-Spiegels am Ende der G2- und zu Beginn der M-Phase zur Hypophosphorylierung von Rb. Hierdurch wird im Zusammenspiel mit dem APC/Mad-Signalweg und der Deaktivierung des Anaphase-Checkpunkts der Zellzyklus nach Abschluss der Mitose beendet [70]. Eine hemmende Wirkung von hypophosphoryliertem Rb wurde auch in der S-Phase beschrieben, seine Funktion im Zellzyklusverlauf ist jedoch bisher noch nicht weiter untersucht.



**Abbildung 4:** Regulation der Zellzyklusphasen durch Cycline und Cyclinabhängige Kinasen (CDK) sowie deren Inhibitoren (CDKI) [18]

Die Cycline reagieren in allen Zellzyklusphasen mit spezifischen CDK (Cyclin Dependent Kinases), wodurch diese aktiviert werden. Rb wird am G1-Restriktionspunkt in zwei Schritten phosphoryliert. Am Ende des Zellzyklus wird Rb dephosphoryliert. CDK- Inhibitoren können diese Cyclin/CDK Komplexe in jeder Zellzyklusphase hemmen und Zellzyklusarrest auslösen: Angehörige der INK4a-Familie hemmen ausschließlich G1-Phase-Cycline. CDKI der KIP-Familie hemmen auch Cyclin/CDK-Komplexe der S- und G2-Phase.

### Check-/Restriktionspunkte und Rb-Signalweg

Die Check- bzw. Restriktionspunkte befinden sich an bestimmten Stellen der Zyklusphasen. Durch Expression bestimmter Gene wird die Aktivität der CDK gesteuert und das Fortschreiten im Zellzyklus kontrolliert. Die Zellzyklusprogression setzt bestimmte Signalkombinationen im Bereich der Checkpunkte voraus. Liegen diese Signalkombinationen nicht vor, so kommt es entweder zum Zellzyklusarrest, um Reparaturen zu ermöglichen, oder zur Apoptose. Neben dem G1-Restriktionspunkt in der späten G1-Phase existieren weitere Restriktionspunkte im S-Phasenverlauf sowie der G2/M-Kontrollpunkt in der späten G2-Phase [61,83]. Ionisierende Strahlung und DNA-Schädigungen durch Chemotherapien aktivieren die Checkpunkte also auf mehreren Ebenen des Zellzyklus und es kommt zum Zellzyklusarrest, um entstandene Schäden reparieren zu können [77]. Führen Störungen zur Dysregulationen auf Checkpunktebene, bzw. der dort ablaufenden Reparaturmechanismen, führt dies zur erhöhten Mutagenese. Die Progression der Zelle im Zellzyklus wird durch den Rb-Signalweg kontrolliert.

PRb (Rb-Protein) gilt als ein transkriptioneller Repressor der Transkriptionsmaschinerie, vollzogen durch die reversible, hemmende Bindung an Transkriptionsfaktoren, wodurch die

Promotoraktivierung ausbleibt. Zur Rb-Familie gehören die funktionell und strukturell nahe verwandten Genprodukte Rb, p107, p130 [101]. Der Name Rb leitet sich von Retinoblastom ab. Retinoblastome können durch Inaktivierung beider Rb-Allele (vorwiegend durch Keimbahnmutationen) im Kindesalter entstehen. Eine somatische Mutation oder Deletion des Genlokus findet sich auch bei Tumoren des Erwachsenen. Die wachstumskontrollierende Funktion von Rb-Proteinen wird dadurch gewährleistet, dass sie reversibel an Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie binden können. Diese Eigenschaft erlaubt die spezifische Hemmung der Promotoraktivierung Zellzyklus-regulierender Gene und den Zyklusarrest. Aufgrund der Bindungstasche für die Transkriptionsfaktoren in Rb wird synonym auch der Ausdruck Pocketproteine verwendet [30].

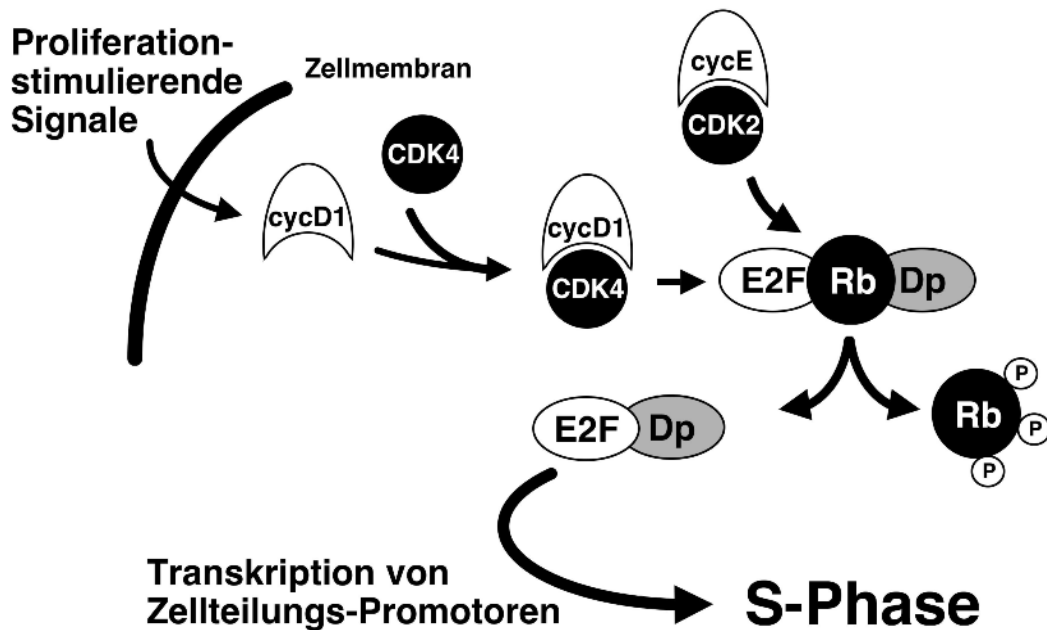
Der Rb-Signalweg vollzieht sich in zwei Schritten: Im ersten Phosphorylierungsschritt werden Cyclin D und seine Partner CDK 4 und 6 aktiv. Im zweiten Schritt, in der späten G1-Phase reagieren CDK 2 und Cyclin E miteinander und führen zum Zellzyklusarrest. Die Bindung von pRb an E2F wird durch den Phosphorylierungsstatus von pRb reguliert. In seiner hypophosphorylierten Form inhibiert pRb Transkriptionsfaktoren der E2F/Dp Familie. Hierdurch verhindert es die Hochregulation von zellzyklusregulierenden Genen wie z.B. Cyclin E, Cyclin A, cdc2, p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und Protoonkogen c-myc. Ebenso wirkt es sich auf Faktoren aus, die für die Aktivierung der DNA-Synthese während der S-Phase benötigt werden (darunter Dihydrofolatreduktase, Thymidinkinase [61] vgl. Abbildung 5). Der Zellzyklus schreitet fort, indem Rb phosphoryliert und damit funktionell inaktiviert wird. C-myc führt zur Amplifikation der G1-S-Transition, da es, nachdem Rb phosphoryliert wurde, selbst als TF aktiv wird und sowohl zur Expression von S-Phasegenen als auch von Cyclin E führt [40].

Durch Phosphorylierung von Rb werden also Transkriptionsfaktoren aktiviert. So vermitteln E2F/Dp Heterodimere [119] dann ihre Promotoraktivität über Genaktivierung und letztlich den Eintritt der Zelle in die S-Phase. Auch Transkriptionsfaktoren wie c-myc oder c-fos benötigen einen Dimerisierungspartner, um als aktiver TF fungieren zu können. CDKI übernehmen eine weitere Kontrolle: p14, 15, 16, 18 (INK4) auf Ebene des ersten und p21, 27, 57 (CIP/KIP) auf Höhe des zweiten Schritts der Rb-Phosphorylierung und führen zum Zellzyklusarrest.

### *Kontrolle von Zellzyklus und Apoptose durch p53*

Das Tumorsuppressorgen p53 gehört zu den am häufigsten inaktivierten Genen in malignen Tumoren. Seine wichtigste Aufgabe ist die Hemmung der Zellproliferation und Initiierung der Apoptose, um Tumorstilstand zu supprimieren. Das p53 Gen wird z.B. nach DNA-Schädigung, unter anderem durch ionisierende  $\gamma$ -Strahlung, aktiviert und kontrolliert eine Vielzahl von

Zellantworten. Die Inaktivierung von p53 findet durch Mutationen oder Deletion der chromosomalen Region auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (17p) statt. Es ist bekannt, dass eine solche p53-Inaktivierung zu einer schlechteren Prognose einer bestehenden Tumorerkrankung führen kann. Die Regulation von p53 findet auf transkriptioneller und auf posttranslativeller Ebene statt. Die p53-Proteinexpression erhöht sich durch genotoxische Schäden (Bestrahlung, Chemotherapie) oder andere zelluläre Stressfaktoren wie Hypoxie, Hitze, virale Infektion oder Onkogen-Aktivierung. Über das Tumorsuppressorgen p14<sup>ARF</sup>, das die p53-ε3 Ligase Hdm-2 hemmt, wird das p53 Protein stabilisiert, da der proteasomale p53-Abbau hierdurch verhindert wird. Das p53 Gen dient einerseits als Transkriptionsfaktor für zyklushemmende Gene wie p21<sup>Cip/WAF-1</sup> [6] und 14-3-3-δ, andererseits aktiviert es die Expression von apoptosefördernden Genen wie CD95/FAS, DR5, Bax, Puma, Noxa, p53-AIP1 (p53 Apoptose – induzierendes Protein), Gadd45, IGF-BP3 und PIG-Genen. Darüber hinaus fungiert es auch als transkriptioneller Repressor, der die Expression von Überlebensgenen direkt oder indirekt reprimiert (z.B. Bcl-2, Cdc2/Cyclin B). Das p53 Gen und seine Homologen, wie p73 und p63, wirken über gleiche Effektormechanismen (Zellzyklusarrest, Aktivierung von Apoptose-Signalwegen). Sie können alle Deletion im Verlauf der Tumorentwicklung und Tumorprogression durch Deletion inaktiviert werden. Vermittelt p53 als transkriptioneller Aktivator von p21 Zellzyklusarrest, hat die Zelle die Möglichkeit, durch Bestrahlung oder Chemotherapie geschädigte DNA-Abschnitte zu reparieren. Da p53 zusätzlich auch Aktivator von Zelltodsignalen ist, kann es bei anhaltendem Arrest nach schwerer, irreparabler Schädigung der DNA oder Replikationsfehlern den programmierten Zelltod einleiten. Fehlt p53 oder liegen p53-Mutationen vor, sind Zellzyklusarrest und Apoptose gestört. Dies erklärt den Selektionsvorteil, den Tumorzellen mit p53-Inaktivierung nach Radiatio oder Chemotherapie entwickeln können. Durch p53-Mutation kann es zur Therapieresistenz und somit zum Tumorrezidiv kommen. Diesen Selektionsvorteil besitzen auch Zellen, die im Rahmen der Tumorprogression mit Inaktivierung von p14<sup>ARF</sup> oder auch Bax andere Defekte der Apoptose-Signalwege aufweisen.

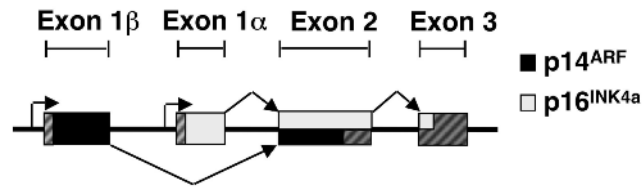


**Abbildung 5:** G1-Restriktionspunkt: Regulation der S-Phase-Progression durch E2F [18]

Hypophosphoryliertes Rb inhibiert E2F. Cyclin D- und Cyclin E vermittelt, wird Rb in 2 Schritten phosphoryliert. Im ersten Schritt reagiert Cyclin D mit den Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6. Der zweite Phosphorylierungsschritt wird durch den Cyclin E/CDK2-Komplex ermöglicht. Rb kann nun Transkriptionsfaktoren wie E2F nicht mehr inhibieren. Freie E2F/Dp Heterodimere führen zur Promotoraktivierung und zur Expression von S-Phase-Promotoren, die S-Phase Progression auslösen.

### *P14<sup>ARF</sup>/p53 Signalweg*

Auf eine Deregulation im Zellzyklus durch DNA-Schäden, beispielsweise durch ionisierende Gammastrahlung, Chemotherapie, virale Infekte, E2F, c-myc, kann die Zelle nicht zuletzt aufgrund der Vernetzung mit Apoptosesignalwegen vielfältig reagieren. So kommt es neben der Transkription von S-Phase-Genen am G1-Restriktionspunkt über Ras-, c-myc und E2F-vermittelte Signale einerseits über die Expression vom CDKI p16<sup>INK4a</sup> zum Zellzyklusarrest. Über ARF (alternatives Leseraster/reading frame) wird durch Nutzung des gleichen Genlokus ebenfalls p14 exprimiert. Das Prinzip beruht auf der Benutzung unterschiedlicher Gene dieses Genlokus (INK4a) - im Vergleich zu p16<sup>INK4a</sup> - mit eigenem Promotor, sodass ein alternatives Exon 1 (Exon 1β) in mRNA transkribiert mit verändertem Leseraster des Exons 2 in Protein translatiert wird. Es entsteht ein strukturell und funktionell differentes Protein. Die verschiedenen und voneinander unabhängigen Promotoren liegen in Tumorzellen unterschiedlich aktiviert vor.



**Abbildung 6:** Leseraster des *INK4a* Genlokus [18]

Exon  $\alpha$ , Exon 2 und Exon 3 bilden den Genlokus für  $p16^{\text{INK4a}}$ . Der CDKI  $p14^{\text{ARF}}$  benutzt Exon 1  $\beta$ , und einen Teil von Exon 2. Zur Synthese von  $p14^{\text{ARF}}$  wird Exon 2 durch alternatives Spleißen in einem verschobenen Leseraster translatiert.  $p14^{\text{ARF}}$  ist dem  $p16^{\text{INK4a}}$  auf Aminosäure-Ebene nicht homolog.

$p14^{\text{ARF}}$  initiiert durch Bindung an das Mdm-2-Protein (**m**urine **d**ouble **m**inute), Hdm-2 beim Menschen, Apoptose. Ungebunden verringert Hdm-2 den p53-Spiegel durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus, indem es als  $\epsilon 3$ -Ubiquitin-Ligase den Abbau von p53 über das Proteasom bewirkt. P53 wiederum ist ein transkriptioneller Aktivator des Hdm-2 Gens. Nach Bindung durch  $p14^{\text{ARF}}$  wird Hdm-2 ubiquitinyliert, destabilisiert und dem Proteasom zum Abbau zugeführt (Abbildung 7).

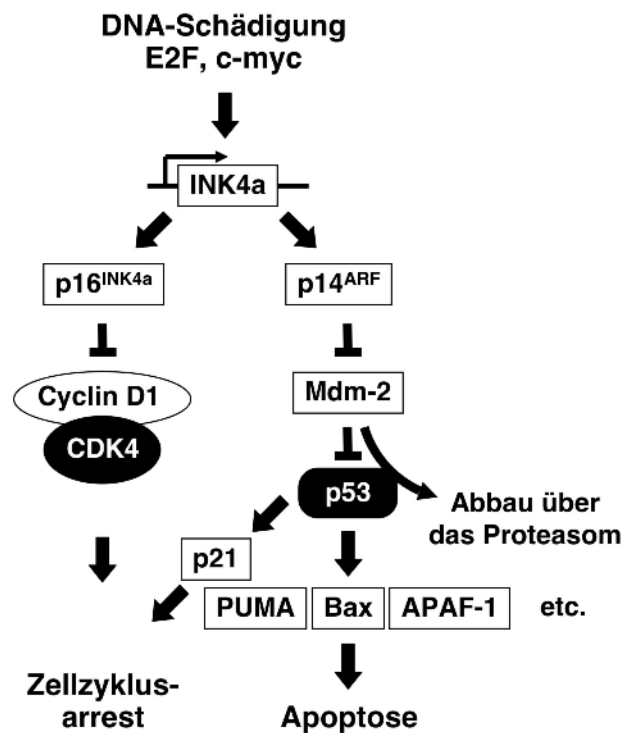
$p14^{\text{ARF}}$  kann auch unabhängig von p53 Apoptose vermitteln. Auch wurden die Beteiligung p21- und p27-unabhängiger Signalwege beschrieben, die Zellzyklusarrest auslösen. Es liegen Hinweise vor, dass unabhängig von p53 und Bax der mitochondriale Zelltodsignalweg initiiert werden kann. Das Beispiel des p14/p53 Signalwegs verdeutlicht, dass Proliferationssignale initiiert durch E2F-1, c-myc, Cyclin D1, die den Progress von Zellen im Zellzyklus vorantreiben, gleichzeitig auch Zelltodsignale entfachen. Hier sorgen Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> Überlebenssignale und zellzyklusarretierende Signale für die Kontrolle überschießender Apoptose. Durch diese Mechanismen können sowohl die gesunde als auch die maligne Zelle überleben. Dass p21 anti-apoptotisch wirkt, wurde bereits erläutert. Jedoch kann eine langanhaltende Arretierung von Zellen im Zellzyklus an Checkpunkten der S- und G2-Phase auch Apoptose aktivieren.

#### *Inaktivierung von Zellzyklusregulatoren in Tumoren*

In malignen Tumoren tritt neben Apoptosedefekten auch eine Deregulation von zellzyklusaktivierenden Genen auf. Durch diese zellzyklusaktivierenden Gene gelingt der Zelle der Übertritt von der G1- in die S-Phase. Die ungehemmte Aktivität dieses gestörten Regulationsmechanismus ermöglicht die ungebremste Vermehrung der transformierten Zelle. Hier sind z.B. die Cyclin-D-Gruppe(1-3), E2F-Homologe und das c-myc-Gen betroffen. Auf Ebene der Effektoren findet sich häufig eine gestörte CDKI-Aktivität. Diese läßt sich auf genetische Störungen, Mutation der zugehörigen CDK oder geschädigte Regulation der CDKI-



Expression zurückführen. Nicht vollständig geklärt ist, ob diese Störungen ursächlich an der Tumorentwicklung beteiligt sind oder durch Akkumulation im Rahmen der Tumorprogression entstehen. In jedem Fall verschlechtert sich die Prognose bei CDKI-Verlust. Dies konnte im Fall eines p16-Verlusts z.B. beim Ösophaguskarzinom und auch bei der malignen Transformation des Barrett-Ösophagus nachgewiesen werden. Bei ersterem zeigten sich auch Verluste von p21 bzw. p27 und eine Überexpression von Cyclin E und A.



**Abbildung 7:** Der  $p14^{ARF}/p53$  Signalweg [18]

Nach Aktivierung von  $p16^{INK4a}$  und  $p14^{ARF}$  vermittelt der CDKI  $p16^{INK4a}$  Zellzyklusarrest in der G1-Phase durch Hemmung von Cyclin D/CDK4/6-Komplexen.  $p14^{ARF}$  destabilisiert den p53-Inhibitor Mdm-2, welches über das Proteasom abgebaut wird. Dadurch wird p53 nun seinerseits als transkriptioneller Aktivator von Zellzyklus-hemmenden Genen (z.B.  $p21^{Cip/WAF-1}$ , 14-3-3 $\sigma$ ) und Apoptose-fördernden Genen (PUMA, Bax, APAF-1) aktiv. In seiner weiteren Funktion als transkriptioneller Repressor hemmt es darüber hinaus Überlebens-Gene (z.B. Bcl-2).

### Zelltodsignalwege

Die bisher beschriebenen Zelltodsignalwege haben alle ein gemeinsames Prinzip. Sie bilden zytosolische Signaltransduktionskomplexe und somit den DISC (death inducing signaling complex). DISC-Signalwege rekrutieren sogenannte Inducercaspasen (Caspase-2, 8, 9, 10), welche über einen kaskadenartigen Mechanismus das initiale Signal verstärken können, um dann über Aktivierung von Effektorcaspasen (Caspase-3, -6- und -7) die Zelle zu zerstören. D.h., durch Degradation regulatorischer Proteine und Aktivierung weiterer Proteasesysteme von

Endonukleasen vollzieht sich der Zelltod. Bekannt sind mitochondriale Signalwege und über Todes-Rezeptoren der TNF-Superfamilie vermittelte Apoptosesignalwege. Beide Signalwege sind miteinander über das Caspasensystem verknüpft, sodass sie sich nicht nur über dieses System gegenseitig aktivieren können, sondern auch eine Signalverstärkung über Amplifikation möglich ist. Desweiteren ist anzunehmen, dass am Endoplasmatischen Retikulum ein weiterer Signalweg existiert und, ER-Stress-vermittelt, über Caspase-2, -4 oder -8 Apoptose exekutiert wird.

**Tabelle 3:** *Zelltodsignalwege der verschiedenen Zellkompartimente*

---

**Death-Rezeptor** (Plasmamembran)

Death-Ligand → CD95 → FADD → Caspase-8 → Apoptose

---

**Mitochondrien**

BAX, BAK, BOK (Zelltodeffektor/Cytochrom C) → APAF-1 → Caspase-9 → Apoptose

---

**ER**

BAK → unbekannte Signaltransduktoren → Caspase-12 → Apoptose

---

Der CD95/FAS-Rezeptor und die durch Bildung eines DISC vollzogene Apoptose wurden bereits vor mehr als zehn Jahren beschrieben. Die Bindung von FADD (FAS-associated death domain)-Adapterproteinen über die zytosolisch lokalisierte Todesdomäne (death domain) des Rezeptors führt über die Bindung an DED (Todes-Effektor-Domäne von FADD) zur Rekrutierung und Aktivierung von Procaspase-8, bzw.-10. Hemmende Mechanismen dieses Signalwegs sind die sogenannten SOD-Proteine (silencer of death domain), welche die Rekrutierung von FADD verhindern und FLIP-Proteine, welche die Bindung (FLIP<sub>S</sub>, FLIP<sub>L</sub>) bzw. die Aktivierung (FLIP<sub>L</sub>) der Procaspase-8 hemmen. In diesem Signalweg wird der DISC vom CD95/FAS-Rezeptor, vom FADD-Adapterprotein und der aktivierten Caspase-8 bzw. -10 gebildet.

Die Todesrezeptoren sind in der Plasmamembran verankert, wo ihre äußere Domäne Liganden bindet, die zu Rezeptorclustern führen, was intrazellulär die Bindung zytosolische Adapterproteine über ihre Death-Domäne (DD) zur Folge hat. Bisher ist die Existenz von 6 Todesrezeptoren bekannt (TNF-R1, CD95/Fas, Todes-Rezeptor 3 (DR3), DR4, DR5, DR6 (DR6

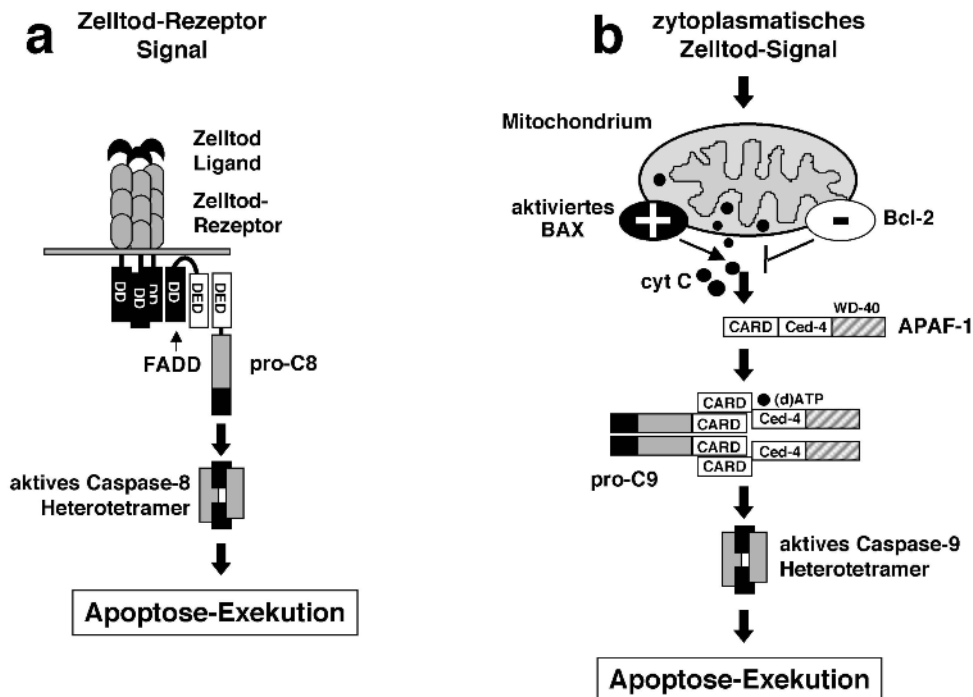
mit unbekanntem Liganden). Nach Bindung der Adapterproteine (FADD im TNF-R1 und CD95/FAS-Signalweg, RIP und RAIDD im TNF-1-Weg) werden die Initiatorcaspasen rekrutiert. Caspase-8 wird von den Trailrezeptoren DR4 und -5 sowie von CD95/FAS und TNF-R1 aktiviert. Caspase-10 wirkt vorwiegend über den TRAIL-Rezeptorweg und Caspase-2, TNF-R1- vermittelt, über die RAIDD- und RIP- bzw. PIDD-Adapterproteine rekrutiert.

Etwas später wurde ein weiterer Komplex nicht homologer Signalproteine beschrieben. Hier besteht der DISC aus APAF-1, Cytochrom c, Procaspase-9 und ATP. Bei DNA-Schädigung sind die Bcl-2-Familienmitglieder Bax, Bak und Bok (HSU et al. beschreiben Bok erstmals [35]) durch Aktivierung über p53 in der Lage, Mitochondrien direkt zu aktivieren. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem Spalt zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran. Die hierzu nötige Öffnung der Kanäle wird durch die Konformationsänderung im N-Terminus von im Zytoplasma befindlichem Bax bewirkt, wodurch seine Insertion in die äußere Mitochondrienmembran stattfindet. Während die Atmungskette anfangs im Gegensatz zu den Abläufen der Zellnekrose noch lange aktiv bleibt, führen dann der Einstrom zytosolischer Ionen und H<sub>2</sub>O zum Zusammenbrechen des mitochondrialen Membranpotentials, der sogenannten mitochondrialen Permeabilitäts-Transition. Konsekutiv schwellen die Mitochondrien an und durch das Platzen der Membran bricht die Atmungskette zusammen. Der genaue Mechanismus der Kanalentstehung ist noch unklar. Untersuchungen an künstlichen Membranen zeigten, dass Bax und Bak über die BH-Domänen (Bcl-2 Homologie) oligomerisieren und selbst Kanäle bilden können. Dass auch Bok derartige Aktivitäten besitzt, liegt nahe, ist jedoch noch ungeklärt.

Eine Hemmung des Bax-katalysierten Mechanismus des Cytochrom c- und ATP-Einstroms in den Zwischenraum der Mitochondrienmembran erfolgt durch Bcl-2 bzw. dessen Bcl-2-Homologie-Domänen BH1, -2 und -3. Das über Apoptoseaktivierung freigesetzte Cytochrom c bindet an APAF-1 über dessen WD40-Domäne. ATP bindet an die CED-4 Homologiedomäne von APAF-1, wodurch eine energieabhängige Konformationsänderung in APAF-1 ausgelöst und die CARD (Caspasenrekrutierungsdomäne) freigelegt wird. Hier bindet Procaspase-9. Aufgrund der Konformationsänderung kommt es zudem zur Oligomerisierung von APAF-1, wodurch mindestens zwei Procaspasen in nachbarschaftliche Beziehung geraten. Hierdurch wird autokatalytisch Procaspase-9 gespalten und zu Caspase-9 aktiviert. Die Aktivierung der Effektorcaspasen 3, -6 und -7 leitet die Apoptose ein.

Apoptose im ER (Endoplasmatischen Retikulum) erfolgt wahrscheinlich über das Bax-Homolog Bak. Aktivierende ER-Stresssignale sind: Proteinakkumulation im ER, Hypoxie und

Glucoseentzug, deregulierte Entleerung des Calcium-Speichers, Akkumulation pathologischer Proteine (Unfolded Protein Response, UPR) bei Virus-Infektionen des Amyloid-Proteins. Letzteres ist wahrscheinlich Ursache für den neuronalen Zelltod beim M. Alzheimer.



**Abbildung 8:** Aktivierung des mitochondrialen und des Death-Rezeptor-vermittelten Apoptose-Signalwegs [18]

Inhibitoren: Bcl-2 hemmt Bax, CARD9 hemmt APAF-1, IAP hemmt Caspase-9, SOD und FLIP-S, FLIP-L Caspase-8 Inhibitoren können diese Signalwege auf jeder Ebene inhibieren; auf der Ebene der Aktivatoren (z.B. Bcl-2), der Adapter (z.B. Bcl-2, FLIP, SOD, CARD-9), bzw. auf der Ebene der Caspasen: FLIPL und IAPs.

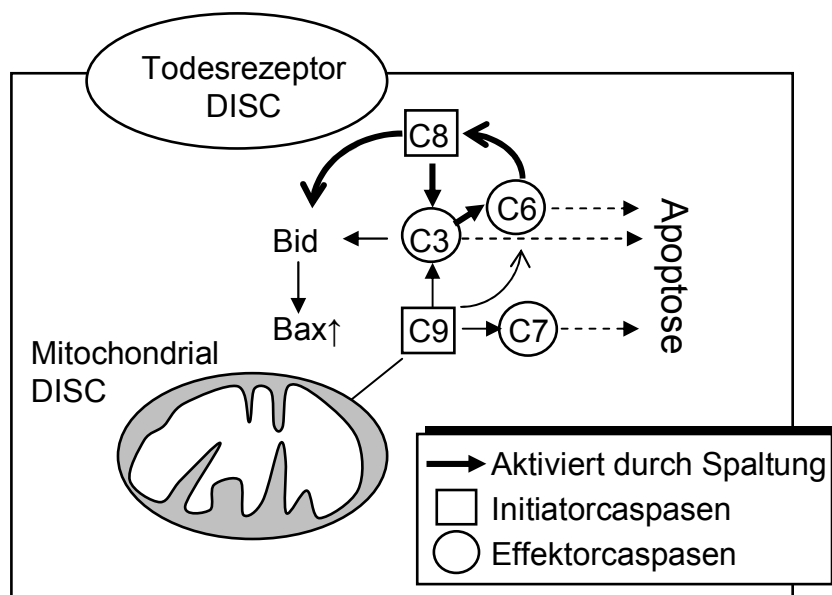
CED: C elegans death gene, ER: endoplasmatic reticulum, UPR: unfolded protein response, SOD: silencer of death domain. FLIPS: short splice variant of Fas-linked inhibitory protein, FLIPL: long splice variant, FADD: Fas-associated death domain, IAP: Inhibitor of Apoptosis Proteins, CARD: Caspase-Rekrutierungs-Domäne. (Beschreibung in Anlehnung an [18])

*Amplifikation im Caspasensystem*

Wie bereits beschrieben, werden sowohl der mitochondriale als auch der Todesrezeptor-vermittelte Signalweg an verschiedenen Stellen durch das Caspasensystem miteinander verknüpft. So führt die Aktivierung von Caspase-8 (Todesrezeptor-vermittelt) zur Spaltung und Aktivierung der Effektorcaspase-3. Ebenso spaltet und aktiviert Caspase-9 die Effektorcaspase-3. Die Procaspase-9 wurde wiederum zuvor durch den mitochondrialen Apoptosesignalweg zur autokatalytischen Spaltung angeregt. Über den mitochondrialen DISC werden zusätzlich die Effektorcaspasen Caspase-6 und Caspase-7 aktiviert. Amplifikation des Todesrezeptorsignalwegs erfolgt über Caspase-8- bzw. Caspase-3-vermittelte Spaltung von Bid.

Bid wiederum ist in der Lage, Bax zu aktivieren, sowie Caspase-8, Caspase-6-vermittelt, zu spalten. Gleichzeitig wird hier über Bid-Spaltung eine Verknüpfung mit dem mitochondrialen Apoptosom hergestellt, indem über Bax/Bak-Aktivierung die Cytochrom c Freisetzung stimuliert wird. Amplifikation des mitochondrialen Wegs wird vollzogen durch Caspase-6-vermittelte Spaltung von Caspase-8 (s.o.) oder Caspase-3-vermittelte Spaltung (Abbildung 9).

Die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 aktivieren die Proteasesysteme der Calpaine und Cothepsine, wodurch überlebenswichtige regulatorische Proteine inaktiviert werden. Zytoskelett, Kernmembran und andere Zellorganellen werden dadurch zerstört. Darüber hinaus werden andere Protease-Systeme und Endonucleasen aktiviert, wie z.B. Chromatinspaltende DNAsen. Dieses System erreicht, dem Blutgerinnung- und Komplementsystem ähnlich, eine kaskadenartige Verstärkung des initialen Signals. Hierdurch leitet sich die irreversible Zerstörung der Zelle ein.



**Abbildung 9:** Caspasesystem: Amplifikation durch Verknüpfung von DISC-Signalwegen

#### *Mitochondrien und Apoptose - Inhibitoren und Deregulation*

Die Kontrolle des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs erfolgt durch hemmende Wirkung von Bcl-2 (B-cell lymphoma gene 2), Bcl-x<sub>L</sub> (lange Spleissvariante des Bcl-x Proteins) und andere Apoptose-hemmende Mitglieder der Bcl-2-Genfamilie. Im Gegensatz hierzu können Apoptose-fördernde Mitglieder der gleichen Genfamilie, wie z.B. Bax (Bcl-associated x protein), Bak und Bok, Mitochondrien direkt aktivieren. Diese setzen daraufhin Cytochrom c aus dem Raum zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran frei. Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> hemmen diesen

Vorgang. Der Verlust der Bax Expression führt zur Resistenz gegen zytotoxische Therapien. Wahrscheinlich wird der Apoptose-hemmende Effekt über die Bcl-2 Homologie-Domänen BH1, BH2, und v.a. BH3 ermöglicht. Sie hemmen diese Vorgänge jedoch nicht auf Ebene des APAF-1, welches nachgeschaltet wirkt und dort die Aktivierung der Induktionscaspasen zur Folge hat.

Die Aktivierung von Bax, Bak und Bok wird durch eine dritte Untergruppe der Bcl-2-Genfamilie bewirkt. Die Vertreter dieser Gruppe verfügen nur über die BH3-Homologiedomäne und werden daher als BH3-only Proteine bezeichnet. Sie binden hochaffin an die anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine und verdrängen sie aus der Bindung an Bax, Bak und Bok [19]. Neben Cytochrom c werden noch weitere Proteine aus den apoptotischen Mitochondrien freigesetzt. Dazu zählt (1) AIF (Apoptosis Inducing Factor), der hohe Homologie zu bakteriellen Flavoproteinen aufweist, in den Zellkern transloziert und dort eine Caspase-unabhängige DNA-Fragmentierung in hochmolekulare Fragmente auslöst [98]. Die Morphologie des AIF-induzierten Zelltods ähnelt allerdings mehr der Nekrose. Der Beitrag dieses Faktors zum apoptotischen Zelltod ist nach wie vor nicht völlig geklärt. (2) SMAC (second mitochondrial activator of caspases) [23] ist ein Protein, das die Aktivität der anti-apoptotischen IAPs hemmt und hierdurch die Exekution der Apoptose verstärkt, während (3) Hsp10, das anti-apoptotische Funktion hat, die Aktivierung der Procaspase-9 blockieren kann [84].

### 1.3 Molekulare Diagnostik des Ovarialkarzinoms

Es gibt noch keine von der AGO akzeptierten molekularen Prognosefaktoren. Das Tumorzentrum Heidelberg empfiehlt jedoch drei Screening Methoden: Die rektovaginale Untersuchung, die Bestimmung des Tumormarkers CA125 (Karzinom-assoziiertes Antigen mit relativer Spezifität für das Ovar) und den transvaginalen Ultraschall (TVS) [43]. Der TVS detektiert Adnexbefunde zu 90 %. Bei jüngeren Frauen kann diese Methode oft nicht zwischen benignen und malignen Befunden unterscheiden, mit der Folge, dass es häufig zu überflüssigen bauchchirurgischen Eingriffen kommt. Bei 80% der Ovarialkarzinome werden erhöhte CA125-Serumwerte gefunden, jedoch nur bei 50% der im FIGO-Stadium I befindlichen Karzinome. Durch die Kombination der genannten Methoden lässt sich die Spezifität des Screenings bei postmenopausalen Frauen auf 92% steigern.

Einige Veröffentlichungen postulieren die Existenz weiterer molekularer Prognosefaktoren. Aufgrund der Kenntnis, dass chronische Entzündungen und Tumorgenese in Zusammenhang stehen können [62], konzentrierten sich zahlreiche Arbeitsgruppen auf die Untersuchung von Cyclooxygenase-2 [52,91,102]. Cox-2 gilt als ein Schlüsselenzym bei Entzündungsreaktionen

und besitzt überwiegend eine pro-inflammatorische Funktion. Beim Ovarialkarzinom ist der Cox-2 Spiegel erhöht. Ein vermehrtes Auftreten von Malignomen wird nach Endometriose und PID (pelvic inflammatory disease) registriert [8,78].

P53 ist als Initiator von Zellzyklusarrest und Apoptose ein unspezifischer Parameter für das Ovarialkarzinom. Die Kenntnis von p53 liegt zahlreichen Studien jedoch als wichtiger Baustein der Tumorbiologie zugrunde.

Der EGF-Rezeptor (Epidermal Growth Factor-Rezeptor) gehört zur funktionellen Familie der Wachstumsfaktorrezeptoren. TOMOV et al. postulierten EGFR-Expression als einen signifikanten prognostischen Faktor für das Ovarialkarzinom [105]. Des Weiteren fanden sie heraus, dass das Vorliegen eines erhöhten EGFR und N1-Nodalstatus mit einer Tumorprogression verbunden ist.

Es existiert eine Vielzahl von Studien zur Erforschung der molekularen Abläufe beim Ovarialkarzinom (Tabelle 4). Diese Studien lassen sich nach der zu Grunde liegenden Methode wie folgt gliedern: (1) In-vivo-Untersuchungen am Genom der gesunden Zelle, d.h. es wird das Blut der Probanden analysiert. Die Analysen erkrankter und gesunder Probanden werden miteinander verglichen. Die Tumorzelle wird dabei nicht analysiert. (2) In-vitro-Untersuchungen am Genom der Tumorzelle und dessen Expressionsprofil in Tumorzelllinien oder Untersuchungen an primärem Tumorgewebe (3). Die zuletzt genannten sind die am häufigsten verwendeten Methoden bisheriger Arbeiten. Andere Arbeiten basieren auf funktionellen Analysen (4). Hier werden, auf Gentransfer basierend, sowohl in vitro-Untersuchungen als auch Modelle in vivo in transgenen Mausmodellen und Tumor-Xenograftmodelle angewandt.

Vergleichende Untersuchungen, die sich mit der Analyse des Genprofils gesunder und am Ovarialkarzinom erkrankten Patienten befassen, zeigten dabei neue Perspektiven (1). Bisherige Analysen konnten durch Darstellung des Genprofils einen Beitrag zur Abschätzung der Chemosensitivität und Dauer des krankheitsfreien Intervalls leisten [87]. Träger des Genotypen TP53 Arg/Arg haben im Gegensatz zu heterozygoten p53 Pro-Allelträger eine bessere Prognose. Ein Vergleich des p53-Genotyps bei gesunden und erkrankten Patienten ergab ein zwei- bis dreifach höheres Risiko, mit einem vererbten heterozygoten p53-Gendefekt (TP53 Arg/Pro) an einem Ovarialkarzinom zu erkranken [58,86].

Die Kenntnis von Defekten biochemischer Abläufe verbessert nicht nur die Möglichkeit, die Prognose der Ovarialkarzinompatientin besser abzuschätzen, sie erlaubt auch die Entwicklung neuer Therapieansätze. In vitro-Untersuchungen (2) ermöglichen das Testen der Wirkung von Gendefekten auf Strahlen- und Chemotherapien in Tumorzelllinien [14,15]. So ließ sich

beispielsweise bei defekter p53-Expression ein Ansprechen platinresistener Tumorzellen auf Etoposid zeigen [4].

Eine Reihe von *in vivo* Studien (3) beschreiben die Rolle von Apoptose- und Zellzyklusmediatoren in Bezug auf Prognose und Therapieerfolg beim Ovarialkarzinom [13,56]. Zentrum der Untersuchungen bilden der p53-Mutationsstatus, Vertreter der Bcl-2-Genfamilie [90] sowie der Zellzyklusinhibitor p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und das pro-apoptische Bax. Das Vorliegen des p53-Wildtyps, also des nicht mutierten p53-Gens, wird in der Mehrzahl der Veröffentlichungen als positiver Prognosefaktor bezüglich eines verlängerten Überlebens postuliert [13,21,27,80]. Die bessere Chemosensitivität platinhaltiger Chemotherapien beim Vorliegen des p53-Wildtyps im Gegensatz zu dessen mutierter Form ist ebenfalls belegt [13].

Bei negativer p53-Expression zeigt das Ovarialkarzinom eine höhere Chemosensitivität gegenüber der Kombination Carboplatin-Cyclophosphamid als gegenüber einem Carboplatin-Paclitaxel-Regime [120]. Neben den molekulargenetischen Analysen [81] führen auch die immunhistochemischen Bestimmungen exprimierter Gene zum besseren Verständnis der Tumorbiologie. So stellt die niedrige p21-Expression einen guten Prognosefaktor dar [119]. Hohe Bax-Expressionen weisen auf intakte Apoptose hin und signalisieren ein potentiell gutes Ansprechen auf Carboplatin-Paclitaxel [2,89,99].



**Tabelle 4:** Studien zu molekularbiologischen Untersuchungen des Ovarialkarzinoms

<b>Untersuchungsgegenstand/ Methode</b>	<b>Autor</b>	<b>Jahr</b>	<b>Thema</b>
(1) In-vivo Untersuchung am Genom der gesunden Zelle *	Santos [86]	2006/2	Analyse des Genprofils bei Karzinompatienten in Bezug auf Prognostik und Therapieplanung
	Morari [58]	2006	Wahrscheinlichkeit der Karzinomentwicklung und Chemosensitivität in Abhängigkeit vom Genprofil
(2) In-vitro Untersuchungen am Genom und Genexpressionsprofil von Tumorzelllinien **	Concin [14]	2003	Wirkung von Strahlentherapie auf Zellzyklus und Strahlensensitivität in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus
	Wu [116]	2002	Untersuchungen zum p53-unabhängigen Zelltod durch p21
	Balan [4]	2006	Wirkung von Etoposid auf platinresistente Ovarialkarzinomzelllinien mit negativer p53-Expression
(3) In-vivo Untersuchung am Genom und Genexpressionsprofil primärer Tumorgewebe ***	De Graeff [21]	2006	Einflußfaktoren multizentrischer Studien auf p53-Expression
	Shigemasa [90]	2002	Prognostische Relevanz einzelner Mitglieder der Bcl-2-Gen-Familie
	Milde-Langosch [56]	2003	Korrelation von p21- und Rb-Expression mit Gesamtüberleben
	Concin [13]	2005	Untersuchung zur Korrelation zwischen Therapieerfolg Platinhaltiger Chemotherapie und p53-Mutationsstatus
	Schuyer [89]	2001	Multifaktorielle Analyse von p53, p21, Bax und Bcl-2
	Tai [99]	1998	Bax-Expression in Tumorzellen im Hinblick auf Prognose
	Rose [80]	2003	Prognostische Relevanz von p21 in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus
	Yan [119]	2004	P21 als Prognosefaktor für das Ovarialkarzinom
	Baekelandt [2]	2000	Analyse von Apoptoseregulatoren in fortgeschrittenen Karzinomen
	Gadducci [27]	2006	Lebenszeitanalyse in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus

(4) Gentransfer/in vitro, in vivo oder Xenograft****	Tai [100]	1999	Tumorzelleradiation nach Bax-Gentransfer
	Huang [38]	2002	Wirkung kombinierter TRAIL-Bax-Gentherapie auf die Überlebensdauer
	De Freudis [20]	2000	Ansprechen von Tumorzelllinien auf Taxol nach Bax-Gentransfer in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus
	Xiang [118]	2000	Ansprechen heterogener Tumorzelllinien auf Bax-Gentransfer mit und ohne Chemotherapie
	Ramirez [75]	2001	Abhängigkeit von p16, p12, p53 auf Zellzyklusmediatoren
	Wen [113]	2003	Klinische Studie zum p53-Gentransfer beim Tumorrezidiv

- \* Genom der gesunden Zelle bedeutet, dass die Untersuchung nicht am Tumorpräparat stattfand, sondern unabhängig von Erkrankungen der genetische Apparat über Blutproben analysiert wurde
- \*\* Untersuchungen von Ovarialkarzinom-Zelllinien auf ihre genetischen Veränderung und ihr Expressionsprofil
- \*\*\* überwiegend retrospektive Analysen von Tumorzellen von Ovarialkarzinompatienten
- \*\*\*\* Untersuchungen, in denen der Gentransfer adenoviral-vermittelt stattfand

In Studien, die auf Gentransfer basieren, wird durch den Gentransfer eine gewünschte Expression von Markern erreicht [75]. Dadurch lässt sich die Wirkung bestimmter Marker auf das Ansprechen von Chemotherapien analysieren [118,20]. Durch Gentransfer wird darüber hinaus ermöglicht, Signalwegtherapien gezielt zu erproben [38]. In Xenograft-Versuchen lassen sich Tumoreradikationen erzielen [100]. Therapeutischer Gentransfer, z.B. des p53-Gens, wird auch in einer in-vivo-Studie am Menschen untersucht [113].

Trotz der Vielzahl molekularbiologischer Untersuchungen konnte bis heute kein molekularer Prognosefaktor die Aussagefähigkeit traditioneller Prädiktoren wie Resttumorgröße, Grading und Staging (FIGO) überbieten [108]. Die Forschungssituation ist von einer Fülle unterschiedlicher Methoden und Kohorten geprägt. Es ist zu vermuten, dass uneinheitliche Analysen und fehlende Standardisierungen methodischer Ansätze Ursache teils inkonsistenter, teils widersprüchlicher Ergebnisse sind.

## 2 Aufgabenstellung und Vorgehensweise

Die vorangegangene Darstellung zeigt, dass die Prognose des Ovarialkarzinoms in der medizinischen Praxis durch klinische Faktoren bestimmt wird. Dazu zählen das Alter der Patientin, das Stadium der Erkrankung, die Größe des Resttumors nach der Operation und die Histologie des Tumorgewebes. Nach diesen klinischen Faktoren richtet sich auch die Behandlung der Patientin. Dieses Instrumentarium ist jedoch für Ärzte wie Patientin wenig zufriedenstellend. Zwei Drittel der Patientinnen entwickeln Tumorrezidive nach der Primärtherapie, die 5-Jahresüberlebensrate beträgt weniger als 20% im fortgeschrittenen Stadium. Häufig lässt sich das Ansprechen auf eine Chemotherapie nur unzureichend voraussagen. Das Ovarialkarzinom wird fast immer erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt, was sich nachteilig auf den Behandlungserfolg auswirkt.

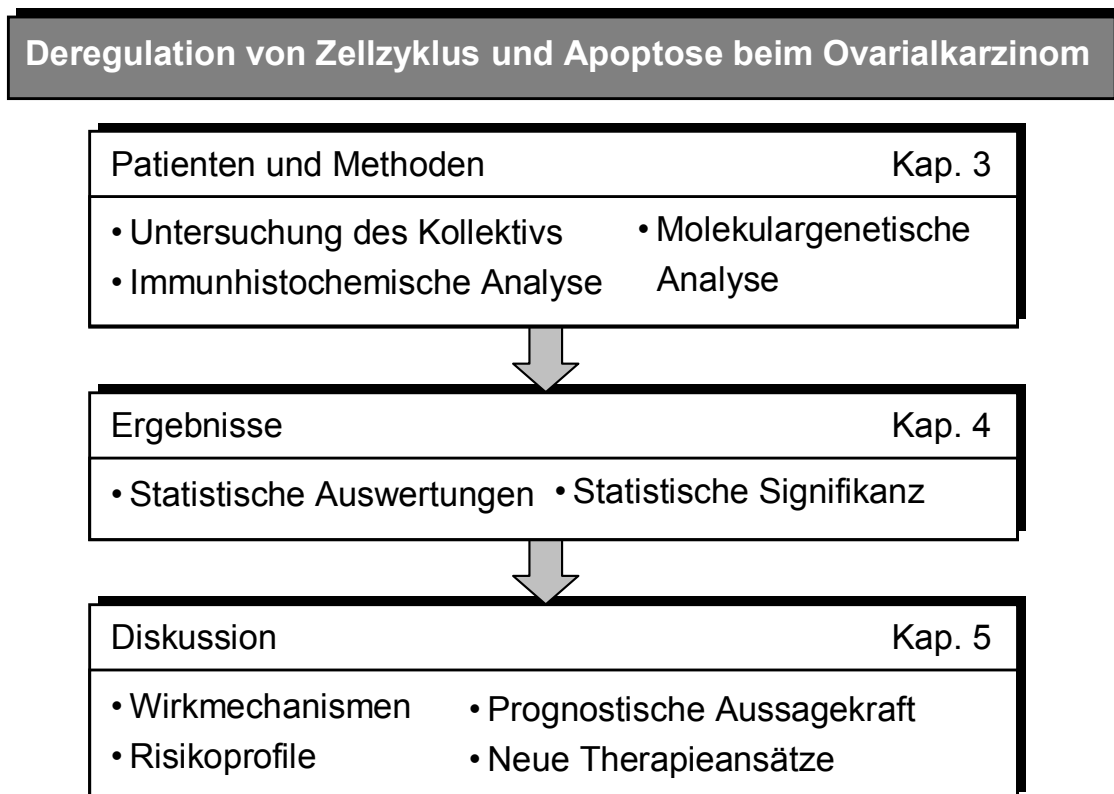
Für eine bessere Prognoseabschätzung und die Entwicklung neuer Therapieansätze ist ein tieferes Verständnis der Tumorbiologie hilfreich. Zahlreiche Untersuchungen zum Gebiet der Tumorbiologie liegen bereits vor. Die verfügbaren Erklärungsmodelle beschreiben auf zellbiologischer Ebene Mechanismen der Tumorentstehung und deren Bekämpfung.

Trotz der Fortschritte in der molekularen Diagnostik und Prognose haben die neuen Methoden und Modelle keinen Eingang in die medizinische Praxis gefunden. Bis heute sind die konventionellen klinischen Faktoren hinsichtlich ihrer Diagnose- und Prognosefähigkeit den molekularbiologischen Ansätzen überlegen. Offenbar sind die komplexen molekularbiologischen Wirkmechanismen bisher noch nicht ausreichend durchdrungen, als dass ein überlegenes Prognoseinstrumentarium entwickelt werden kann. Hier setzt die vorliegende Arbeit an.

Die Fragestellung dieser Arbeit ist, wie sich mit Hilfe der Bestimmung von molekularen Markern die Prognose von Ovarialkarzinomen individuell abschätzen lässt und ob darüber hinaus neue prognostische oder gar prädiktive Marker etabliert werden können. Das Ziel ist die Optimierung der Tumorthherapie, um das Überleben der Patientinnen zu verbessern und unnötige Therapien zu vermeiden.

Die Vorgehensweise dieser Arbeit wird in Abbildung **10** dargestellt. Zunächst wurden retrospektiv Tumorproben eines Kollektivs von 94 Patientinnen mit immunhistochemischen und molekulargenetischen Methoden untersucht. Auf diese Weise wurden zell- und zellzyklusregulierende Gene bezüglich des Niveaus ihrer Proteinexpression und ihres Mutationsstatus bestimmt. Im nächsten Schritt wurden diese Ergebnisse statistisch ausgewertet, indem die Genotyp/Phänotypdaten auf Korrelationen mit den klinischen und pathologischen

Rahmendaten, insbesondere dem Überleben der Patientinnen, getestet wurden. Abschließend wurden die Korrelationsergebnisse vor dem Hintergrund bisher bekannter Wirkmechanismen der Tumorbilogie diskutiert und eingeordnet, um so einen Beitrag zum besseren Verständnis der molekularbiologischen Wirkmechanismen zu leisten.



*Abbildung 10: Vorgehensweise dieser Arbeit*

### **3 Patienten und Methoden**

#### **3.1 Patienten**

Durchgeführt wurde eine retrospektive Untersuchung von 94 Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Die Patientinnen wurden zwischen 1996 und 2004 in vier Krankenhäusern im Einzugsgebiet der Universitätsklinik Halle operiert. Es erfolgte zusätzlich zur Ovarektomie, je nach in-situ-Befund, präoperativem Staging und Allgemeinzustand der Patientin, eine Erweiterung der Operation (siehe Kapitel 1.1). Die im universitären Institut für Pathologie eingefrorenen Tumor-Präparate wurden zur Durchführung der Analysen wieder aufgetaut und bezüglich des aktuellen Stagings nach FIGO erneut befundet. Zur Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen wurden Präparate in Paraffin eingebettet. Von den ursprünglich 118 operierten Patientinnen konnte von 94 Patientinnen in Paraffin eingebettetes Tumormaterial gesammelt werden. Bei den übrigen 24 Patientinnen, von denen kein Tumormaterial verfügbar war, handelte es sich um Frauen mit einem medianen Alter von 67 Jahren (Range 46-89), die im oben genannten Zeitraum operiert wurden. Die Nachbeobachtungszeit war individuell verschieden. Eine letzte Aktualisierung der klinischen Daten bezüglich der Überlebenszeit erfolgte 2005. Das in Paraffin eingebettete Tumormaterial wurde ebenso wie die klinischen Daten vom Institut für Pathologie, Universität Halle, zur Verfügung gestellt (Tabelle 5).

##### **3.1.1 Avidin-Biotin-Methode**

Die Avidin-Biotin-Methode wird zur Steigerung der Empfindlichkeit in Abwandlung der Immunperoxidase-Färbemethode als immunhistochemische Nachweismethode eingesetzt. Im Sandwichverfahren wird zunächst ein Primärantikörper eingesetzt, welcher spezifisch an das zu interpretierende Antigen bindet. Der mit Biotin konjugierte Sekundärantikörper bindet den ersten Antikörper. Als drittes Agens kommt ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex hinzu. Avidin hat eine sehr hohe Affinität zu Biotin, sodass eine sehr spezifische Sichtbarmachung der lokal an das Antigen gebundenen Peroxidase mit Chromogen erreicht wird. Vorteil einer Enzym-Markierung im Gegensatz zur Sichtbarmachung durch einen Fluoreszenzmarker ist, dass einfache Lichtmikroskope zur Auswertung benutzt werden können. Eine chemische Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin verbessert durch Abgrenzung vom Zellkern die präzise Auswertung und verstärkt die Reproduzierbarkeit.

**Tabelle 5:** *Patientenkollektiv und klinische Daten*

Alter (Jahre) zum Zeitpunkt der OP	Median Range	63,4 41-85
FIGO-Stadium	1	29 (30,9%)
	2	7 (7,4%)
	3	52 (55,3%)
	4	6 (6,4%)
Lymphknotenbefall	LK-Extirpationen insges.	37(39,4%)
	Nodal negativ bzw. unbekannt	25(26,7%)
	Dignität	12(12,7%)
	Nodal positiv	
Resttumor	ja	44 (46,8%)
	<1cm	15(16%)
	>1cm	29(30,9%)
	nein	37 (39,4%)
	nicht bekannt	13 (13,8%)
Grading	G1	26(27,7%)
	G2	37(39,4%)
	G3	31(3,2)
Therapie	Platin/Taxol	55(58,5%)
	Platin/andere	16 (17%)
	Platin mono	3(3,3%)
	andere Chemotherapie	2(2,1%)
	keine CHT bei Figo 1a	5(5,3%)
	verweigert	4(4,3%)
	vor CHT verstorben	4(4,3%)
	nicht bekannt (keine Daten)	5(5,3%)
Tumorbedingt verstorben	Ursache Ovarial-Ca	42(44,7%)
Operationsart	USO/BSO	5 (5,3%)
	TAH und BSO	5 (5,3%)
	Radikale Operation	84 (89,4%)
Histologie	serös	53(56,4%)
	andere	41(43,6%)

\* Die Abkürzungen sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen

### 3.1.2 Immunhistochemisches Protokoll

Um die Proteinexpression von Bax, Bak, Bok, p16<sup>INK4a</sup> und p21<sup>Cip/WAF-1</sup> zu messen, wurde das in Paraffin eingebettete Tumormaterial auf  $-10^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und anschließend 4  $\mu\text{m}$  dünne Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen. Um die Präparate gründlich zu entparaffinieren wurden sie mit Hilfe von Färbekörben 4x5 Minuten in Xylol gewaschen. Die Herauslösung des Xylol und dem darin gelösten Paraffin erfolgte durch Waschung in absteigender Alkoholreihe: je zweimal 2 Minuten in 96%, 80%, 70%, 50% Ethanol.

Anschließend folgte eine je zweiminütige Rehydrierung in destilliertem Wasser und dann eine Äquilibrierung des pH-Wertes durch zweiminütiges Waschen in TBS-Puffer (Tris-buffered saline-Puffer). Um die Bindungsstellen wieder zu befreien, also zur Antigen-Demaskierung, wurden die Proben 4-5 Minuten im Schnellkochtopf in TEC-Puffer gekocht. Zur Abkühlung wurde der Topf anschließend ins Wasserbad gestellt. Um die Gewebseroxidasen zu inaktivieren wurden die Schnitte für 10 Minuten in 3 prozentige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung getaucht. Schwenkende Bewegungen verhinderten dabei die Entstehung von Luftblasen im Gewebe. Es folgte eine jeweils fünfminütige Waschung der Objektträger in Aqua bidestillata (Aqua bidest.) und TBS-Puffer, um das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu entfernen und den pH-Wert erneut zu äquilibrieren. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig abgetropft und die Objektträger auf Filterpapier geblottet. Die Schnitte wurden danach aus den Färbekörben entnommen und nebeneinander auf ein Färbetablett gelegt. Um ein Überlaufen der folgenden Lösungen zu verhindern, wurden die Schnitte mit dem PAP-Pen (Fettstift oder DAKO Pen) umrandet, das Beschriftungsfeld also hydrophob abgegrenzt. Im folgenden Schritt erfolgte die gleichmäßige Verteilung von 2-3 Tropfen unverdünntem Sea-Block Reagenz (Pierce) pro Objektträger mittels Pipette, um unspezifischer Bindungsstellen zu blockieren. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde der Sea-Block von den Schnitten abgegossen. Es folgte die Beschichtung mit dem Primärantikörper gegen die jeweiligen Zellzyklus- und Apoptoseregulatoren (150 µl pro Schnitt). Voraussetzung war die vollständige Bedeckung des Gewebes. Das Verdünnungsverhältnis für den jeweiligen Antikörper in TBS-Puffer ist Tabelle 6 zu entnehmen. Es folgte eine Inkubationszeit von zehn Minuten bei Raumtemperatur (RT) in einer feuchten Kammer. Nach anschließender Waschung mit TBS-Puffer aus der Spritzflasche (ca. 500 ml pro Tablett) erfolgte das Auftragen von 200 µl der jeweiligen sekundären Antikörper (biotinylierte Sekundärantikörper: Ziege-anti-Maus bzw. Ziege-anti-Kaninchen, Jackson Immuno Research) in der Verdünnung 1:500. Es wurde eine weitere Inkubationszeit von 30 Minuten bei RT in einer feuchten Kammer angesetzt. Dann folgte ein dreimaliger Waschvorgang mit TBS-Puffer. Im Anschluß wurde 200 µl des verdünnten Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Dianova, 1:250 in TBS-Puffer verdünnt) auf die Schnitte aufgetragen und 30 Minuten inkubiert, um die gebundenen Antikörper zu detektieren. Nach Waschen mit TBS-Puffer wurde zur immunchemischen Färbung des gebundenen Peroxidase-Komplexes Diaminobenzidin (Pierce; DAB/Metalloclone) 1:10 verdünnt in Stable Peroxidase Substrat Puffer (Pierce) hinzugeben. Die Färbereaktion wurde für 5 Minuten inkubiert und anschließend durch eine Waschung mit Aqua bidest. gestoppt. Alle Schnitte wurden mit Hämatoxylin nach Mayer gegengefärbt. Dieser Färbeschritt dauerte 5-20 Sekunden. Ein Bläuen der Schnitte erfolgte in Leitungswasser. Zur Dehydrierung wurden danach die Präparate in einer

aufsteigenden Alkoholkonzentrationsreihe (50%, 70%, 80%, 96%, reiner Alkohol) je 2 x 2 Minuten eingetaucht. Danach wurden die Objektträger für mindestens 10 Minuten in Xylol getaucht und anschließend mit Histokitt II (Roth) eingedeckt.

**Tabelle 6:** Puffer für die Immunhistofärbung

TEC-Puffer	TBST	Hämatoxylin nach Mayer
2,5 g Tris-Aminomethan	9,0 g Tris-Aminomethan	1g Hämatoxylin, Merck
5,0 g EDTA	68,5g Tris-Hydrochlorid	0,2 g Kaliumjodat, Merck
3,2 g Trinatrium-citrat	87,8 g Natriumchlorid	50 g Kalialan, (Aluminium-Kaliumsulfat-Dodecahydrat, Merck) in 1L Aqua bidest. lösen
Aqua dest. auf 1L auffüllen	2,5 g TWEEN 20	50 g Chloralhydrat, Merck
pH-Wert auf 7,8 einstellen	Aqua bidest. auf 1L auffüllen	1g Citrat
vor Gebrauch 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen	pH -Wert auf 7,4-7,6	vor Gebrauch filtrieren

**Tabelle 7:** In der Immunhistochemie eingesetzte Antikörper

Antigen	Klon	Spezies	Isotyp	Klonalität	Hersteller	Verdünnung
p16	G175-405	Maus	IgG	monoklonal	PharMingen	1:150
p21	6B6	Maus	IgG	monoklonal	PharMingen	1:75
Bax	Ab-1	Kaninchen	IgG	polyklonal	Trevigen	1:750
Bak	A3538058	Kaninchen	IgM	polyklonal	Daco Cytomation	1:150
Bok	4521	Kaninchen	IgM	polyklonal	Cell Signaling	1:100

### 3.1.3 Immunhistochemische Auswertung und Interpretation

Es folgte die lichtmikroskopische Auswertung der Färbungen. Vier hochvergrößerte (400x) Gesichtsfelder wurden bezüglich der Prozentzahl positiv gefärbter Zellen (0-100% in 5% Schritten) für Bax, Bak, Bok, p16<sup>INK4a</sup> und p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und der Färb-Intensität (0 bis 3)



ausgewertet. Zur Errechnung des Färbeindex wurden die Zahlenpaare jeweils miteinander multipliziert. Die Ergebnisse des Färbeindex und die Prozentzahl gefärbter Zellen wurden miteinander verglichen. Im Ergebnisteil erfolgte die Analyse anhand des Färbeindex. Der Färbeindex korreliert gut mit dem Prozentsatz positiver Zellen.

Die Analysen wurden von 2 unabhängigen Personen jeweils zweimal durchgeführt, um so eine hohe intra- und interbeobachter-Korrelation zu erzielen. Diskordante Fälle wurden durch beide Personen gemeinsam nachbegutachtet. Die Analysen erfolgten ohne Kenntnis der klinisch-pathologischen Daten.

### **3.2 P53-Mutationsanalyse**

Die Extraktion genomischer DNA aus den Tumorproben zur Durchführung der p53 Mutationsanalysen wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Bartels, Institut für Pathologie Universitätsklinik Halle, durchgeführt. Mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) wurden die Exone 5-8 des p53 Gens amplifiziert. Im Anschluss daran wurden mittels SSCP-PCR (Single-Strand-Conformation-Polymorphism-PCR) die Sequenzaberrationen in den PCR-Amplifikaten nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse zum p53-Status (Wildtyp versus Mutation) in Relation zur Proteinexpression der Apoptose- und Zellzyklusregulatoren betrachtet.

### **3.3 Statistische Auswertung**

Das Gesamtüberleben wurde ab dem Zeitpunkt der Operation mit Hilfe der Kaplan-Meier Produktlimit-Methode geschätzt. Der Vergleich der Überlebenskurven erfolgte mittels des Log-Rang Mantel-Cox Tests. Uni- und multivariate Analysen wurden mittels des Cox-Proportionalen Risiko-Modells berechnet. Die Mehrzahl der Parameter wurde als dichotomisierte (kategoriale) Variablen eingesetzt. Verglichen wurde FIGO Stadium I versus II bis IV, Grading G1 versus G2 und G3, postoperative Tumorfreiheit ja versus nein, adäquate Chemotherapie ja versus nein, Nodalstatus N0 versus N1, p53 Mutation ja versus nein.

Für die Expression der molekularen Kontrollgene: Bax, Bak, Bok, p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und p16<sup>INK4a</sup> wurde jeweils ein Grenzwert (cut-off) für die Färbeindizes gesetzt. Die Färbeindizes berechnen sich als Produkt der Anzahl und der Intensität gefärbter Zellen. Für Bax und Bak gilt der Grenzwert 170, für Bok 50, für p21<sup>Cip/WAF-1</sup> 30 und für p16<sup>INK4a</sup> 140. Die Grenzwerte wurden für die Kategorisierung in „hohe“ bzw. „niedrige“ Expression nahe am Medianwert der Verteilung gewählt. Auf diese Weise ist die Anzahl der Proben beiderseits des Grenzwerts etwa gleich verteilt.

Um Patientengruppen in „intakter“ bzw. „defizienter“ Genotyp/Phänotyp zu dichotomisieren wurde die Interaktionsvariable eingesetzt. Die Interaktionsvariable ist definiert als Multiplikationsprodukt kategorialer Variablen, wobei „intakte“ Genotypen als „1“ gesetzt wurden, „defiziente“ hingegen als „0“. Hierdurch wurden alle Patienten bei denen alle untersuchten Parameter „intakt“ waren durch den Wert „1“ der Interaktionsvariablen definiert und kategorisiert. Für alle anderen Patienten (mit einem oder mehreren Defekten der in der Analyse enthaltenen Parameter) wurde hingegen ein Wert „0“ der Interaktionsvariable errechnet.

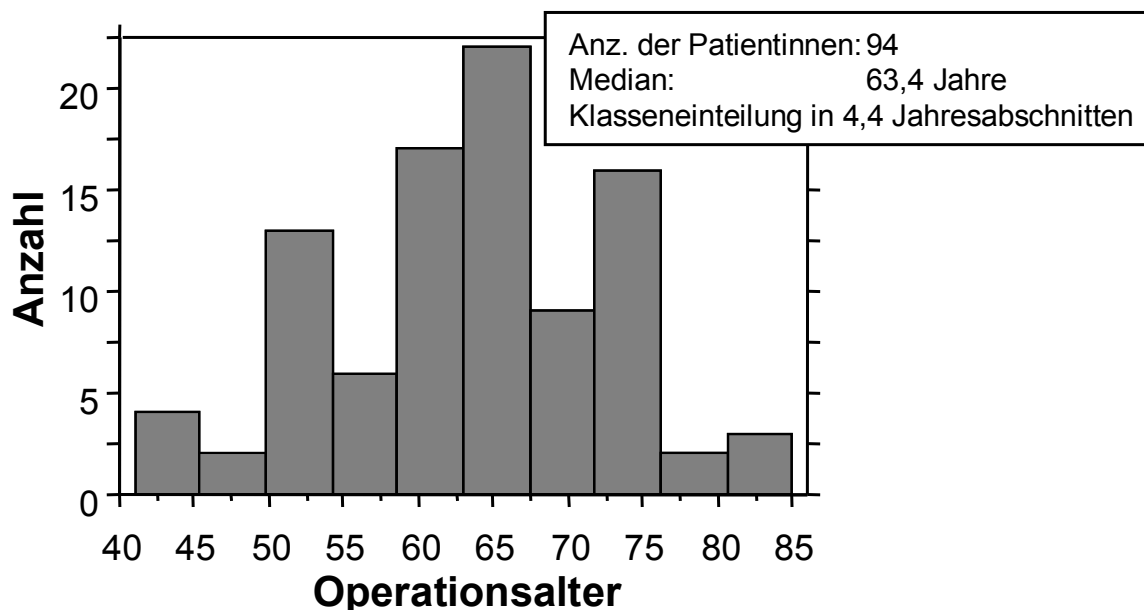
Univariate Analysen bezüglich des Gesamtüberlebens wurden mittels Berechnung des Proportionalen Risiko-Modells für jeden Parameter einzeln durchgeführt. Für den Vergleich von Variablen untereinander wurden, je nach Fall, der Mann-Whitney U-Test für nicht normalverteilte kontinuierliche Variablen bzw. für kategoriale Variablen der  $\chi^2$ -Test oder Fisher's exakter F-Test eingesetzt. Für die multivariate Regressionsanalyse wurde das Proportionale Risiko-Modell nach Cox sowohl vor- als auch rückwärts entwickelt zur schrittweisen Selektion bzw. Elimination kategorialer Variablen basierend auf Veränderungen der Wahrscheinlichkeitsinteraktion zwischen den verschiedenen Parametern.

Sämtliche statistische Analysen wurden mittels des Statview 5 Softwarepakets der Firma SAS für Apple Macintosh Rechner durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patientenkollektiv und Nachbeobachtung

Es wurden 94 an einem Ovarialkarzinom erkrankte Patientinnen analysiert, die in kurativer Absicht primär operiert wurden. Das mediane Erkrankungs- bzw. Operationsalter der Patientinnen betrug 63,4 Jahre. Die Altersverteilung bezüglich Erkrankungszeitpunkt der Patientinnen ist in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11:** Altersverteilung bezüglich Erkrankungszeitpunkt im Patientenkollektiv (Kategorisiert wurde in 4,4-Jahresschritten, beginnend mit der Altersgruppe 41-45,4 Jahre hochgerechnet bis 85 Jahre)

Bei 84 Patientinnen (89,3%) wurde eine radikale abdominelle Operation durchgeführt. 5 (5,3%) Frauen erhielten eine uni- oder bilaterale Salpingoophorektomie und wiederum 5 eine abdominelle Hysterektomie mit bilateraler Salpingoophorektomie. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung befanden sich 29 Patientinnen (30,9%) im FIGO-Stadium I, 7 (7,4%) im Stadium II, 52 (55,3%) im Stadium III und 6 (6,4%) in Stadium IV (Tabelle 5). Es wurde bei insgesamt 37 (39,4%) Patientinnen eine Lymphadenektomie durchgeführt. Bei 12 dieser Frauen lag ein positiver Lymphknotenstatus vor. Bezüglich der Tumorgadeinteilung ergab sich folgende Aufteilung: 26 Tumore (27,7%) waren G1-Tumore, 37 (39,4%) G2- und 31 (33%) G3-Tumore. Nach chirurgischer Intervention lag insgesamt bei 44 (46,8%) der Patientinnen noch ein Residualtumor vor. Bei 15 (16%) dieser Patientinnen war der Residualtumor kleiner, bei 29 (30,9%) größer als 1 cm. Bei 37 (39,4%) der Patientinnen verblieb postoperativ kein Residualtumor (R0-Resektion), zu den restlichen 13 (13,8%) Fällen lagen keine Daten vor. 74

der Frauen (78%) erhielten eine platinhaltige Chemotherapie und 2 (2,1%) eine Platin-freie Chemotherapie. 5 Frauen (5,3%) erhielten aufgrund des Vorliegens von FIGO-Stadium Ia keine adjuvante Therapie. 9 (9,6%) Patientinnen wiederum erhielten postoperativ keine adäquate Therapie, da sie diese entweder verweigerten, vor Therapiedurchführung verstarben, bzw. lagen in dieser Gruppe keine Daten hierzu vor. Die Patientinnen wurden in den Jahren 1996 bis 2004 operiert. Die letzte Aktualisierung der Daten erfolgte im Dezember 2005. Zum Zeitpunkt der letzten Datenerhebung waren 42 Patientinnen infolge des Tumorleidens verstorben. Somit wurden die anderen 52 (55,3%) für die Errechnung der Überlebensanalysen zensiert. Das heißt, Patientinnen, deren Todesursache nicht das Tumorleiden war oder die zum Zeitpunkt der Nachbeobachtung noch lebten, wurden entsprechend der Kaplan-Meier-Kriterien als zensiertes Ereignis definiert. Die mediane postoperative Nachbeobachtungszeit (Follow-up) für diese zensierten 52 Patientinnen betrug 44 Monate (Range 0-97 Monate). Eine Patientin, die unmittelbar postoperativ verstorben war und somit eine Nachbeobachtungszeit von 0 Monaten aufwies, ging mit in die Berechnung ein. Die mediane Gesamtüberlebenszeit für die zum Zeitpunkt der letzten Aktualisierung bereits verstorbenen Patientinnen betrug 24 Monate für das gesamte Kollektiv (Range 1-65 Monate).

Anhand Tabelle 8 ist zu erkennen, dass das Kollektiv ein repräsentatives Kollektiv bezüglich Erkrankungsalter, Tumorstadium, Therapieeffekt und Histologie darstellt.

**Tabelle 8:** Das Patientenkollektiv dieser Arbeit im Vergleich mit Daten der AGO [66]

Ovarial-Ca	Daten der AGO [66]	Daten vorliegender Arbeit
<b>Stadium zum Zeitpunkt der Erstdiagnose</b>	FIGO III/IV: 75%	61%
<b>Rezidiv/Nichtansprechen auf die Chemotherapie</b>	66%	51-80% *
<b>Diagnosezeitpunkt</b>	66 Jahre	63 Jahre
<b>5-Jahres-Überlebensrate</b>	39%	37% **

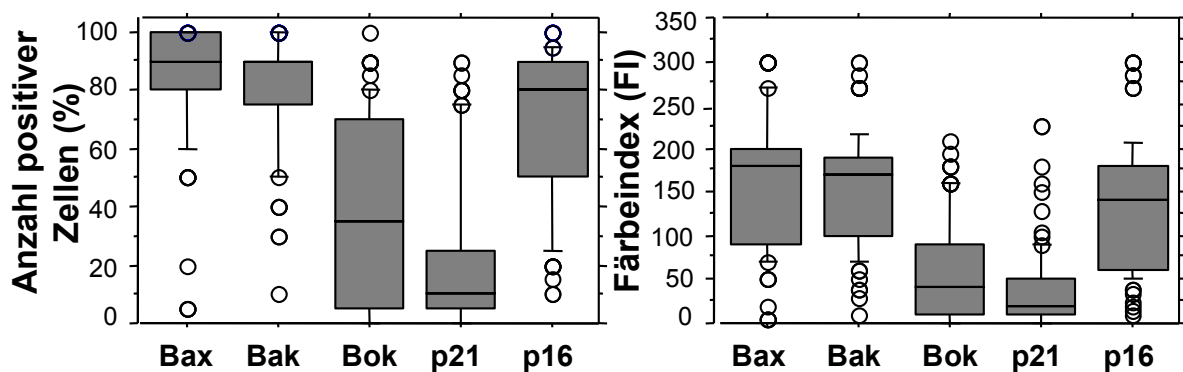
\* Der Status bezüglich Rezidivfreiheit war bei 29% der Patientinnen unbekannt

\*\* um den Nachbeobachtungszeitraum von 5 Jahren einzuhalten, bezieht die Rechnung nur Patientinnen ein, die bis 2000 operiert wurden

#### 4.2 Analyse der Expressionsprofile von Zellzyklus- und Apoptosegenen

Die immunhistochemisch ermittelten Ergebnisse der Proteinexpression für die Gene Bax, Bak, Bok, p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und p16<sup>INK4a</sup> werden in Form eines Boxdiagramms wiedergegeben (Abbildung 12). Es ist der Prozentsatz gefärbter Tumorzellen, der Gewebeschnitte sowie der Färbeindex (FI) dargestellt. Der FI wurde, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, durch die Multiplikation der Prozentzahl gefärbter Tumorzellen mit dem Intensitätsfaktor 0-3 (negativ, einfach, zweifach, dreifach positiv) errechnet. Sowohl FI als auch der Prozentsatz gefärbter Tumorzellen gelten als Maß für die Stärke der Proteinexpression.

Der mediane Prozentsatz für die zytoplasmatische Expression von Bax lag bei 90% (Mittelwert 86%, Interquartil-Abstand 20, Standardabweichung 21) mit einem medianen FI von 180 (Mittelwert 156, Interquartil-Abstand 110, Standardabweichung 74). 40 Ovarialkarzinome (42,7%) zeigten einen FI von weniger als 170 und waren somit niedrig exprimierend. Es lag kein Bax-negativer Tumor vor.



**Abbildung 12:** Expressionspiegel von Bax, Bak, Bok, p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und p16<sup>INK4a</sup>

Dargestellt sind Boxgraphiken für den Prozentsatz positiver Zellen (links) und für den Färbeindex (rechts).

Auch die Analyse von Bak zeigte eine hohe Proteinexpression. Der mediane Prozentsatz Bak-exprimierender Ovarialkarzinome betrug 90% (Mittelwert 81%, Interquartil-Abstand 15, Standardabweichung 20) mit einem medianen FI von 170 (Mittelwert 154, Interquartil-Abstand 90, Standardabweichung 65). 45 der Tumore (47,9%) zeigten eine Expression von weniger als 170 und waren somit niedrig exprimierend. Nur ein Tumor zeigte keinerlei Expression.

Eine generell niedrigere Expression zeigten die Resultate für Bok. Der Median der Bok-Expression betrug 35% positive Zellen mit einer breiten Variabilität (Mittelwert 39%,

Interquartil-Abstand 65, Standardabweichung 33) und einen medianen FI von 43 (Mittelwert 61, Interquartil-Abstand 80, Standardabweichung 59). 26 Tumore (27,7%) wiesen eine Expression unter einem FI von 50 auf (niedrig exprimierend) eingestuft. 23 (24,47%) der Tumore zeigten keinerlei Expression.

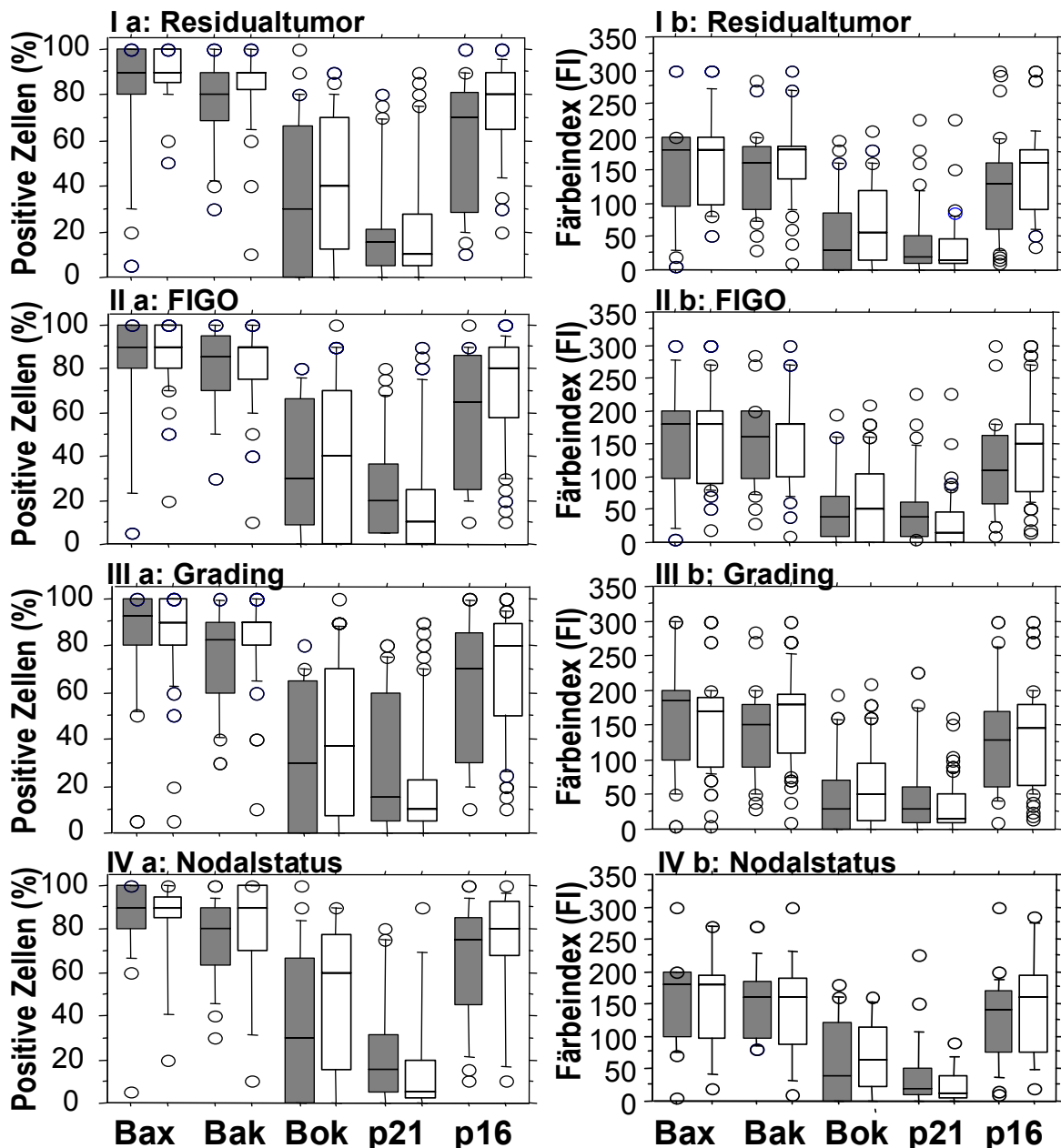
Die niedrigste Expression der analysierten Gene wies  $p21^{Cip/WAF-1}$  auf. Der Median der nukleären  $p21^{Cip/WAF-1}$  Expression lag bei 10% positiven Zellen (Mittelwert 22%, Interquartil-Abstand 20, Standardabweichung 27). Der FI zeigte eine ähnliche Verteilung mit einem Median von 20 (Mittelwert 37, Interquartil-Abstand 40, Standardabweichung 47). 34 Tumore (36%) waren mit einem FI von unter 30 niedrig exprimierend, 20 Tumore (21%) zeigten keine Färbung.

Die nukleäre  $p16^{INK4a}$  Expression zeigte einen Median von 80% positiver Zellen (Mittelwert 67%, Interquartil-Range 40, Standardabweichung 27) mit einem medianen FI von 140 (Mittelwert 133, Interquartil-Abstand 120, Standardabweichung 74). 42 Tumore (45%) zeigten eine  $p16^{INK4a}$  Expression mit einem FI unter 140 (niedrig exprimierend). Ein Tumor zeigte keinerlei Färbung.

Bezüglich Bak, Bok,  $p21^{Cip/WAF-1}$  und  $p16^{INK4a}$  wurden sowohl niedrig exprimierende Tumore als auch Tumore ohne jede Färbung in späteren Analysen zusammenfassend als „negativ“ kategorisiert.

#### **4.3 Untersuchung der Expressionsprofile von Bax, Bak, Bok, $p21^{Cip/WAF-1}$ und $p16^{INK4a}$ in Relation zu den klinisch-pathologischen Parametern**

Es wurden jeweils die Expressionsprofile der Gene Bax, Bak, Bok,  $p21^{Cip/WAF-1}$  und  $p16^{INK4a}$  als kontinuierliche Variablen mit den dichotomisierten kategorisierten Variablen bezüglich des Vorhandenseins von Residualtumor sowie des FIGO-Stadiums, des Tumorgradings und des Lymphknotenstatus in Bezug gesetzt (Abbildung 13). Wie oben beschrieben, wurden die Parameter folgendermaßen dichotomisiert: Residualtumor nein versus ja, FIGO-Stadium I versus II-IV, Grading 1 versus 2-3, Nodalstatus negativ versus positiv. Die Analyse wurde mit Hilfe des ungepaarten Mann Whitney U-Tests durchgeführt.



**Abbildung 13:** Korrelation zwischen Genexpressionsspiegel und klinisch-pathologischen Parametern (Box-Grafiken und Mann-Whitney U-Test)

I: Vergleich zwischen prozentualer Zellfärbung (a) mit Färbeindex (b) in Bezug auf Vorhandensein von Residualtumor nein (graue Box)/ja (weiße Box); II: Vergleich zwischen prozentualer Zellfärbung (a) mit Färbeindex (b) in Bezug auf das Vorliegen von FIGO-Stadium 1 (graue Box)/FIGO-Stadium 2, 3 und 4 (weiße Box); III: Vergleich zwischen prozentualer Zellfärbung (a) mit Färbeindex (b) in Bezug auf das Vorliegen von Grading 1 (graue Box)/bzw. Grading 2 und 3 (weiße Box); IV: Vergleich zwischen prozentualer Zellfärbung (a) mit Färbeindex (b) in Bezug auf das Vorhandensein von befallenen Lymphknoten ja (weiße Box [N1])/nein (graue Box [N0])

Für Bax, Bok und p21<sup>Cip/WAF-1</sup> fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Darstellung des Expressionsniveaus bzw. des Färbeindex mit den klinisch-pathologischen

Prognosefaktoren. In Bezug zum Grading und Lymphknotenstatus gab es kein signifikantes Ergebnis (Mann-Whitney U-Test,  $p > 0,05$ ).

Es zeigten sich erhöhte Proteinspiegel für Bak (Mann-Whitney U-Test,  $p = 0,0345$ ) und  $p16^{INK4a}$  ( $p = 0,0137$ ) in den Tumoren, die nicht R0-reseziert werden konnten. Somit erscheint der positive Einfluß einer niedrigen Bak-Expression auf die Prognose als abhängiges Epiphänomen. Auch war die Expression von  $p16^{INK4a}$  in Tumoren, die der FIGO-Gruppe II-IV angehörten, signifikant höher als in Tumoren der FIGO-Gruppe I (Mann-Whitney U-Test,  $p = 0,0471$ ).

Des Weiteren wurde die Prognosefähigkeit einer Kombination von klinisch-pathologischen Parametern und Proteinexpressionen analysiert. Dabei zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse.

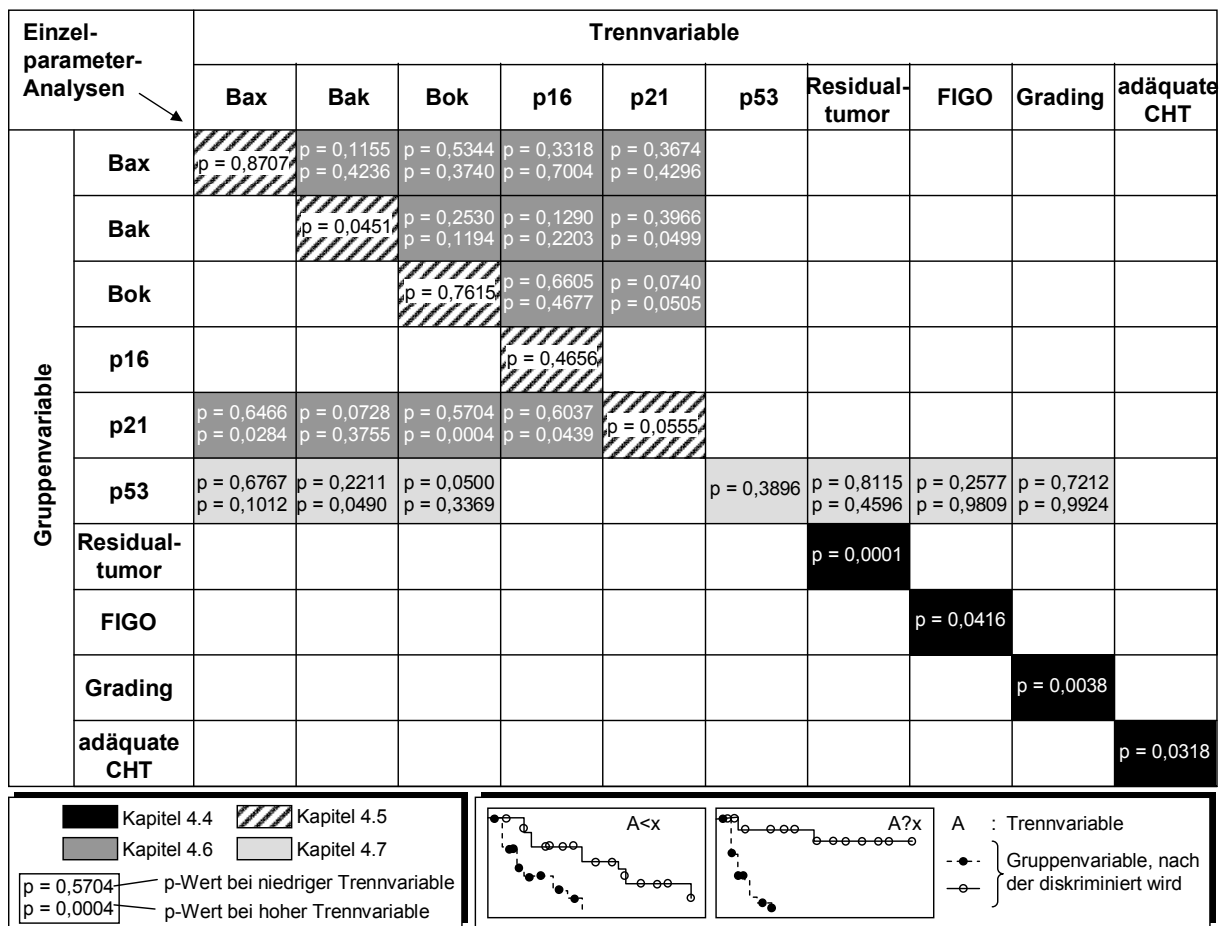


Abbildung 14: Übersichtsdarstellung zu den Kaplan-Meier Analysen im Ergebniskapitel

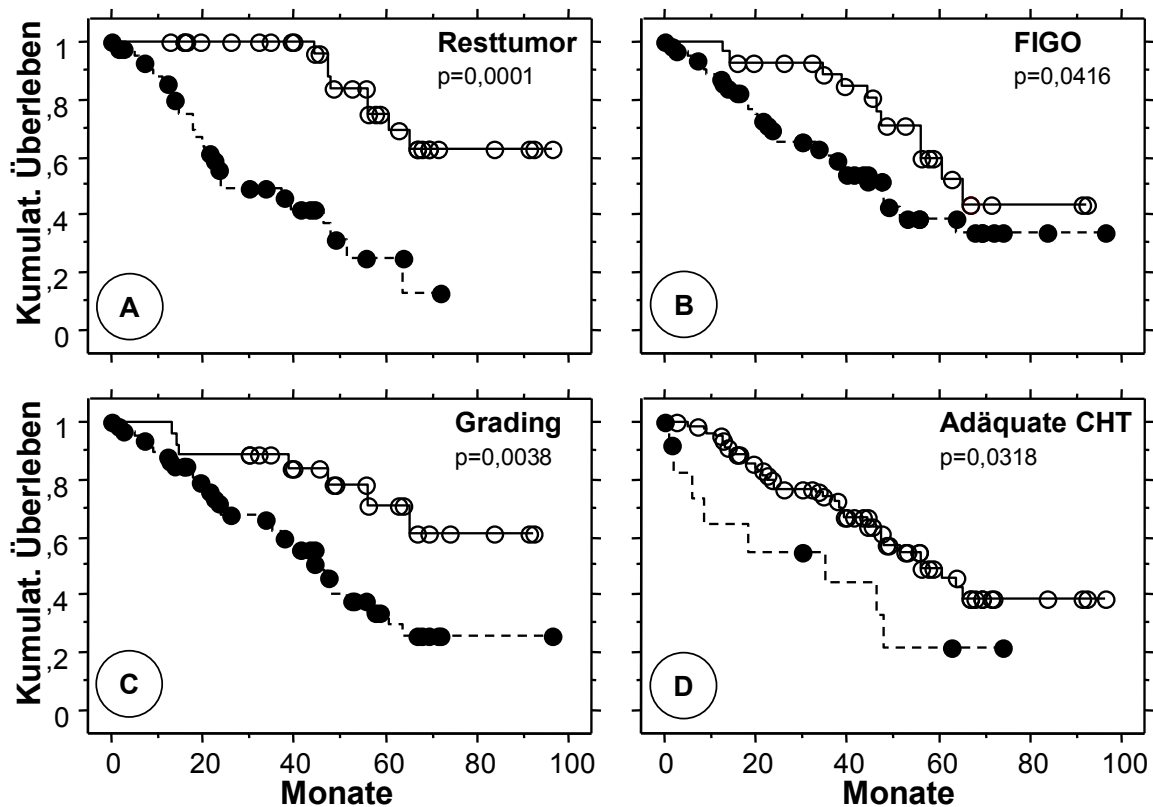
In Abbildung 14 ist die inhaltliche Gliederung der weiteren Teile dieses Kapitels dargestellt. In den Kapiteln 4.4 und 4.5 werden die Ergebnisse der Einzelparameter-Analysen aufgeführt, in



den Kapiteln 4.6 und 4.7 die Analyseergebnisse von Parameterkombinationen. Zu allen farbig hinterlegten Felder in Abbildung 14 finden sich im Kapitel Bild-Darstellungen zugehöriger Kaplan-Meier-Analysen. Die jeweiligen p-Werte zeigen die Signifikanz der berechneten Abhängigkeiten.

#### **4.4 Klinisch-pathologische Parameter im Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben**

Die Kaplan-Meier Überlebenskurven für die verschiedenen klinisch-pathologischen Parameter bestätigen die Eignung dieser als Prognoseparameter. Der von der AGO als wichtigster Prognosefaktor des Ovarialkarzinoms angegebene Parameter ist der postoperative Tumorrest. Patientinnen, bei denen postoperativ Tumorfreiheit bestand, hatten einen eindeutigen Vorteil bezüglich des Gesamtüberlebens (Log-Rang Mantel-Cox Test:  $p < 0,0001$ ) (Abbildung 15). So betrug das mediane Überleben bei postoperativer Tumorfreiheit 61 Monate, hingegen bei Vorliegen von Residualtumor 35 Monate. Patientinnen im FIGO-Stadium I hatten mit einer medianen Überlebenszeit von 55 Monaten ebenfalls eine bessere Prognose als die Gruppe von Patientinnen, die sich mit einer medianen Überlebenszeit von 41 Monaten im FIGO/Stadium II-IV befanden (Log-Rang Mantel-Cox Test:  $p = 0,0416$ ). Eine hohe Signifikanz bezüglich längeren Überlebens zeigte auch das Vorliegen eines niedrigen Tumor-Gradings. Patientinnen mit einem G1-Tumor überlebten median 57 Monate im Gegensatz zu Patientinnen mit G2- oder G3-Tumoren, die im Median 41 Monate überlebten (Log-Rang Mantel-Cox Test:  $p = 0,0038$ ). Frauen, die aufgrund des Alters keine adäquate Therapie erhielten, oder diese verweigerten, verstarben im Median 20 Monate früher als Patientinnen, die eine adäquate Therapie erhielten (Log-Rang Mantel-Cox Test:  $p = 0,0318$ ).

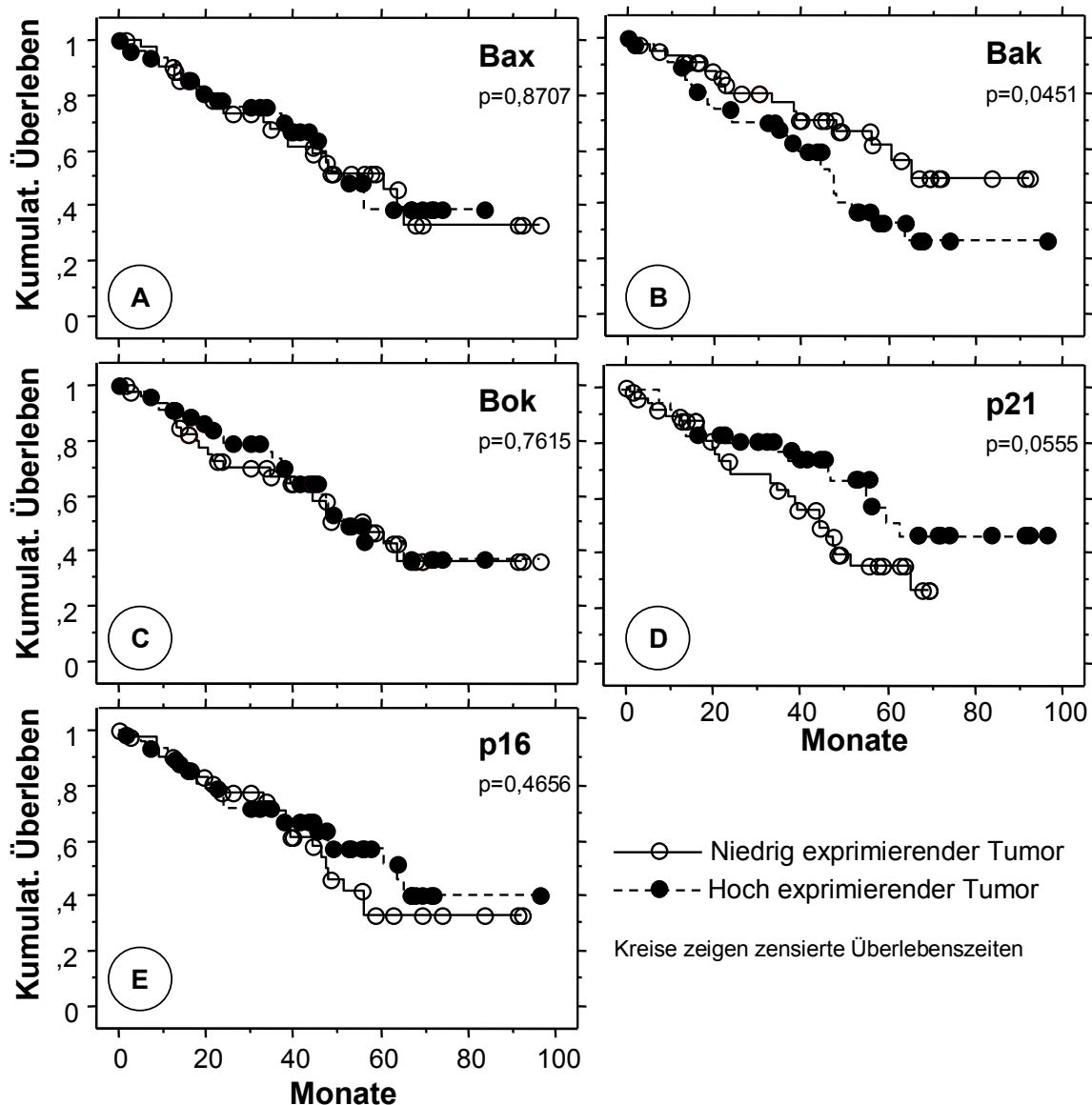


**Abbildung 15:** Kaplan-Meier Überlebensanalyse für die klinisch-pathologischen Parameter

A: Postoperative Tumorfreiheit [weiße Kreise und durchgezogene Linie] versus Residualtumor [schwarze Kreise und gestrichelte Linie]; B: FIGO-Stadium I [weiße Kreise und durchgezogene Linie] versus FIGO-Stadium II-IV [schwarze Kreise und gestrichelte Linie]; C: Grading 1 [weiße Kreise und durchgezogene Linie] versus Grading 2/3 [schwarze Kreise und gestrichelte Linie]; D: adäquate Therapie [weiße Kreise und durchgezogene Linie] versus inadäquate Therapie [schwarze Kreise und gestrichelte Linie]. Kreise zeigen zensierte Überlebenszeiten

#### 4.5 Korrelation zwischen Genexpression und Gesamtüberleben

Zur Abschätzung der Krankheitsprognose mittels Kaplan-Meier Überlebensanalyse wurden die Patientinnen über folgende dichotomisierte Variablen, basierend auf den Färbeindex, stratifiziert: Bax niedrig versus hoch exprimierend, Bak niedrig/negativ versus hoch exprimierend, Bok niedrig/negativ versus hoch exprimierend, p21<sup>Cip/WAF-1</sup> niedrig/negativ versus hoch exprimierend, p16<sup>INK4a</sup> niedrig/negativ versus hoch exprimierend (Abbildung 16). Die Expressionsanalyse basiert auf dem Färbeindex, siehe Kapitel 4.2.



**Abbildung 16:** Kaplan-Meier Überlebensanalyse für Bax, Bak, Bok, p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und p16<sup>INK4a</sup>

A: Bax niedrig exprimierend (durchgezogene Linie mit weißen Kreisen) versus hoch exprimierende Tumore (gestrichelte Linie mit schwarzen Kreisen); cut-off  $\geq 170$ ; B: Bak niedrig exprimierende/negative (durchgezogene Linie mit weißen Kreisen) versus hoch exprimierende Tumore (gestrichelte Linie mit schwarzen Kreisen); cut-off  $\geq 170$ ; C: Bok niedrig exprimierende/negative (durchgezogene Linie mit weißen Kreisen) versus hoch exprimierende Tumore (gestrichelte Linie mit schwarzen Kreisen); cut-off  $\geq 50$ ; D: p21 niedrig exprimierende/negative (durchgezogene Linie mit weißen Kreisen) versus hoch exprimierende Tumore (gestrichelte Linie mit schwarzen Kreisen); cut-off  $\geq 30$ ; E: p16 niedrig exprimierende/negative (durchgezogene Linie mit weißen Kreisen) versus niedrig exprimierende Tumore (gestrichelte Linie mit schwarzen Kreisen); cut-off  $\geq 140$

In der univariaten Analyse zeigte weder Bax (Log-Rang Mantel-Cox Test:  $p=0,8707$ ) noch Bok ( $p=0,7615$ ) einen Unterschied im Gesamtüberleben bei hoher bzw. niedriger/negativer Expression.

Ein signifikanter Unterschied bestand im Vergleich hoher und niedriger/negativer Bak-Konzentration. Frauen mit einem niedrigen Bak-Expressionsspiegel wiesen eine bessere Prognose bei einem medianen Gesamtüberleben von 51 Monaten auf als die Patientinnen, bei denen eine hohe Bak-Expression vorlag mit einem medianen Überleben von 42 Monaten (Log-Rang Mantel-Cox Test:  $p=0,0451$ ). Hinsichtlich der p21-Expression verhielt es sich hingegen umgekehrt. Patientinnen mit hoher p21-Expression wiesen ein tendenziell, jedoch nicht signifikant längeres medianes Gesamtüberleben (50 Monate) im Vergleich zu Patientinnen mit niedrigen p21-Spiegeln (42 Monate) auf (Log-Rang Mantel-Cox Test:  $p=0,0555$ ). Frauen, deren Tumore eine hohe p16<sup>INK4a</sup>-Expression aufwiesen, überlebten im Median 5,7 Monate länger als Frauen mit niedriger p16<sup>INK4a</sup>-Expression. Dieses Ergebnis war jedoch ebenfalls nicht signifikant ( $p=0,4656$ ).

#### **4.6 Kombination von Einzelgenanalysen zur Erstellung von Risikoprofilen**

In Anlehnung an frühere Studien wurden durch die Kombination von Einzelgenanalysen die Mechanismen von Zellzyklus und Apoptose untersucht. Des Weiteren wurde zur Prognoseabschätzung ein Risikoprofil erstellt.

Hierzu wurde aufgrund gegensätzlicher Trends in der Einzelgenanalyse (Kapitel 4.5) im Vergleich des Verhaltens von Bax, Bak und Bok in Bezug auf das Überleben zunächst jeweils ein Vertreter dichotomisiert. Dieser wurde dann als Gruppenvariable nach anderen gemessenen und ebenfalls dichotomisierten Parametern, inklusive p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und p16<sup>INK4a</sup> mittels Kaplan-Maier Überlebensanalyse in Bezug auf die prognostische Relevanz einer solchen Marker-Kombination untersucht: Anhand der Überlebenskurve sind Patientinnen mit Bax positivem/Bak negativem Profil hinsichtlich eines längeren Überlebens von der Gruppe mit Bax negativem/Bak negativem Profil diskriminierbar (Abbildung 17, Teilbild A). Dieses Ergebnis ist jedoch nicht signifikant (Log-Rang Mantel-Cox Test:  $p=0,1155$ ). Für positive Bak-Expression zeigt sich kein Einfluß der Bax-Expression auf das Überleben (Abbildung 17, Teilbild B). Die Überlebenskurven liegen für Bak negativ insgesamt höher als für Bak positiv, was das Ergebnis der Einzelgenanalyse bestätigt. Bei der Gruppierung von Bax getrennt nach Bok ergaben sich hinsichtlich des medianen Gesamtüberlebens ebenfalls keine Signifikanten Ergebnisse (Abbildung 17, Teilbild C und D).

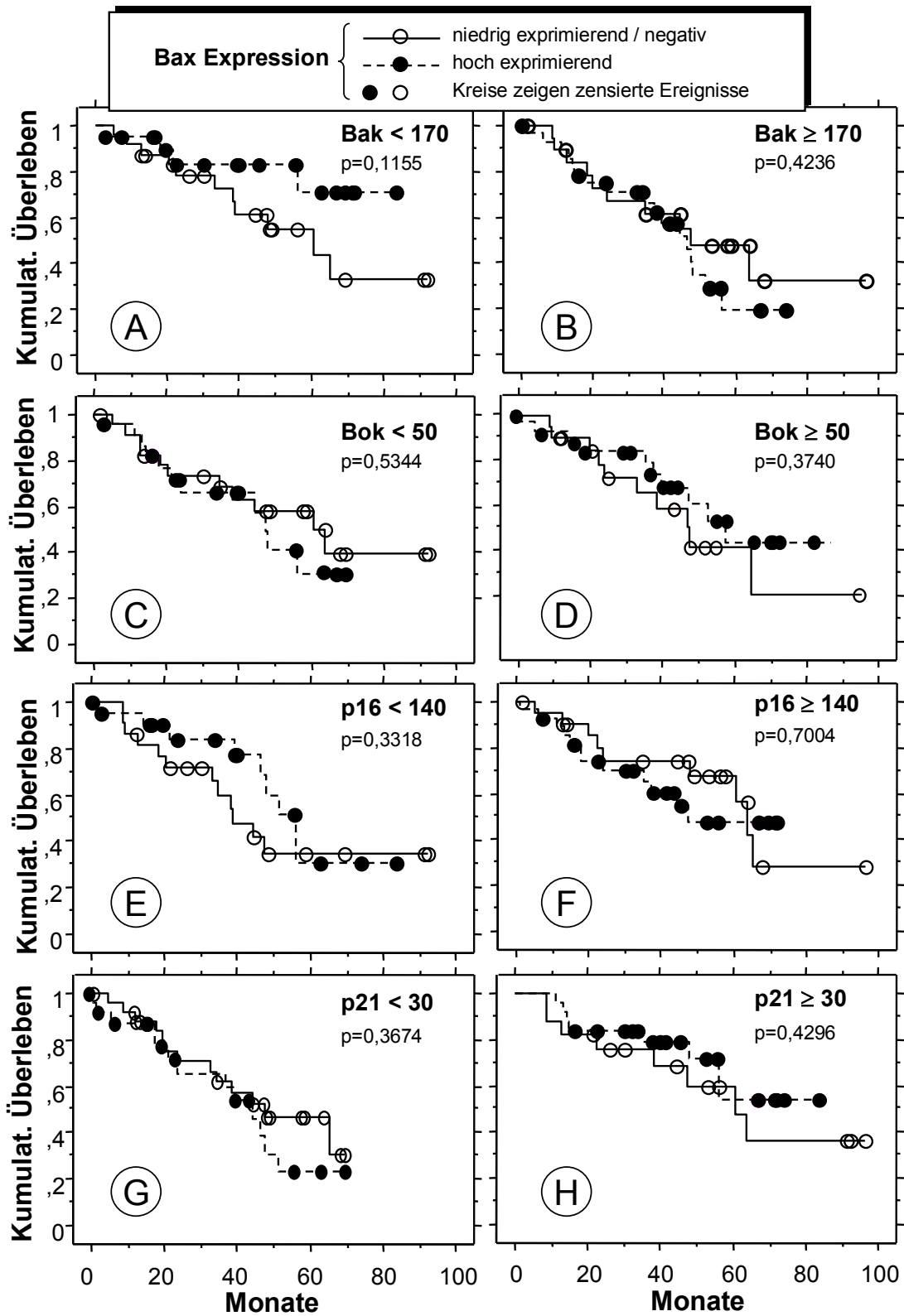
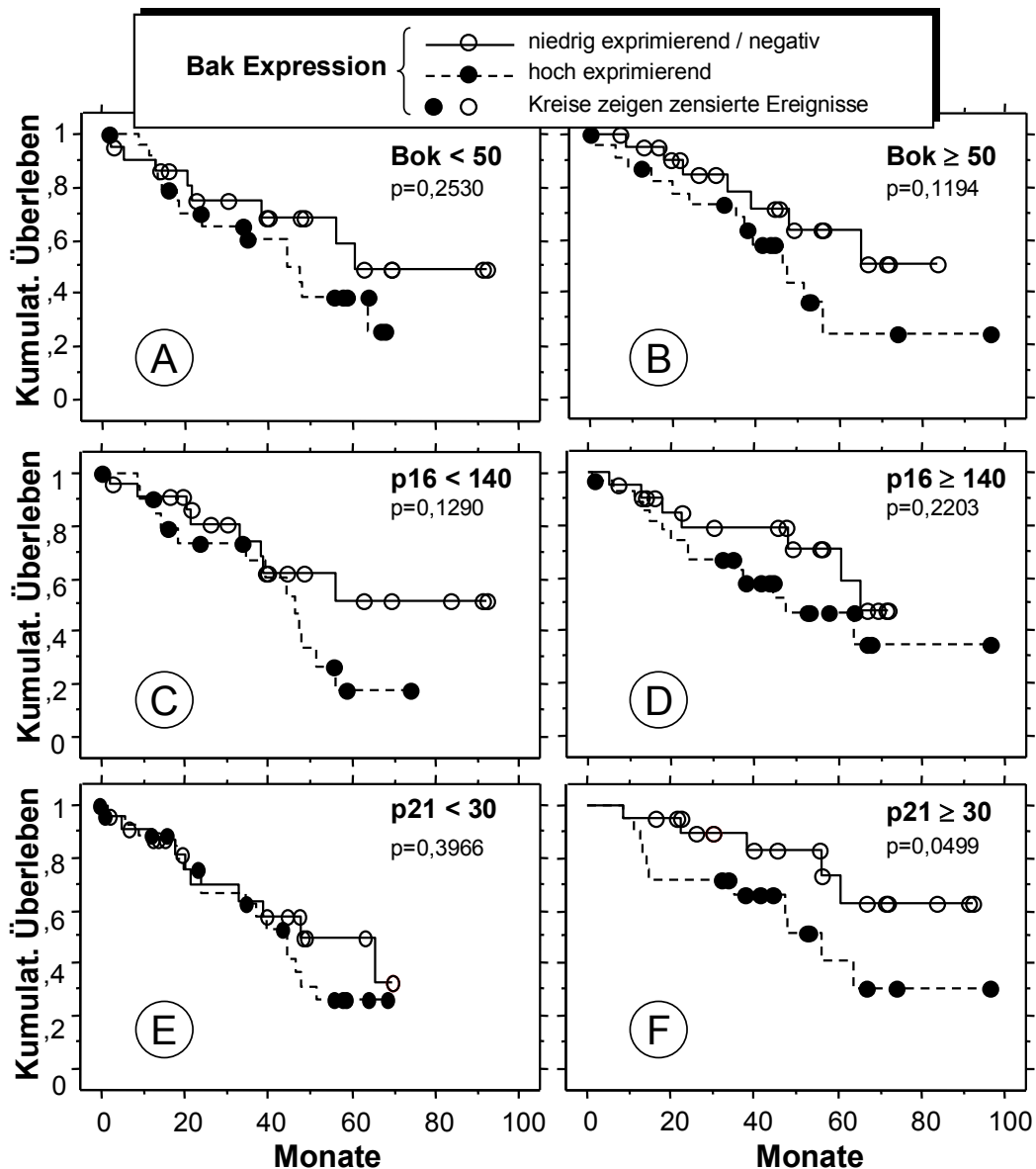


Abbildung 17: Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens für die Gruppenvariable Bax, getrennt nach Bak, Bok, p16<sup>INK4a</sup> und p21<sup>Cip/WAF-1</sup>

Auch die Trennung nach p16<sup>INK4a</sup> bzw. p21<sup>Cip/WAF-1</sup> zeigte hinsichtlich einer besseren Prognose keine signifikanten Ergebnisse (Abbildung 17, Teilbild E-H).

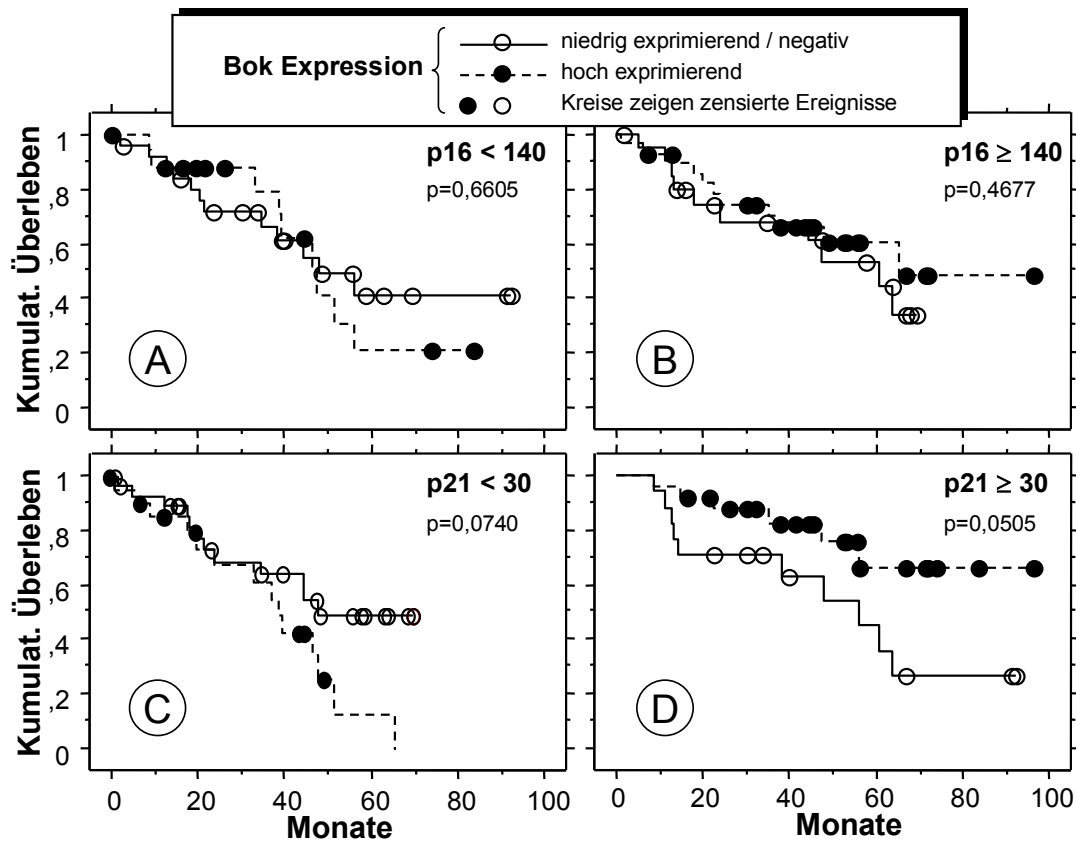
Anschließend wurde Bak als Gruppenvariable getrennt nach Bok, p16<sup>INK4a</sup> bzw. p21<sup>Cip/WAF-1</sup> analysiert. Hier konnte zwar diskriminiert werden zwischen einem längeren medianen Überleben (47 Monate) versus kürzerem medianen Überleben (42 Monate) im Vergleich Bak positiv/Bok negativ versus Bak negativ/Bok negativ ( $p=0,2530$ ), ebenso im Vergleich Bak positiv/Bok positiv (53 Monate) versus Bak negativ/Bok positiv (40 Monate;  $p=0,1194$ ). Eine Signifikanz zeigte sich jedoch in beiden Fällen nicht (Abbildung 18, Teilbild A und B). Andere Ergebnisse ergaben sich bei der Analyse Bak und p16<sup>INK4a</sup>. Die Kurven wiesen übereinstimmend mit der Einzelgenanalyse von Bak ein längeres Überleben bei niedrigem Bak auf. Das längste mediane Überleben besitzen paradoxerweise also Frauen mit Bak negativen/p16<sup>INK4a</sup> positiven Tumoren (53 Monate). Dieses Ergebnis ließ sich von Patientinnen mit Bak positiven/p16<sup>INK4a</sup> positiven Tumoren diskriminieren, welche im Median 43 Monate überlebten (Abbildung 18, Teilbild D). Wiederum war keine Signifikanz zu verzeichnen ( $p=0,2203$ ). Ebenso wenig signifikant war der Vergleich zwischen Bak negativen/p16<sup>INK4a</sup> negativen Tumoren (medianes Überleben 44 Monate) und Bak positiven/p16<sup>INK4a</sup> negativen Tumoren mit einem medianen Überleben von 39 Monaten (Log-Rang Mantel-Cox Test:  $p=0,1290$ , Abbildung 18, Teilbild C).

Im Fall einer negativen Bak-Expression bei p21<sup>Cip/WAF-1</sup> positiven Tumoren war das Ergebnis von 44 Monaten medianen Überlebens im Vergleich zu 53 Monaten bei Bak hochexprimierenden Tumoren in der Analyse mit Bak als Gruppenvariable als einziges signifikant ( $p=0,0499$ ). Wiederum zeigte sich keine Diskriminierbarkeit im Fall niedrig exprimierender p21<sup>Cip/WAF-1</sup> Tumoren in dieser Gruppe (Abbildung 18, Teilbild E und F).



**Abbildung 18:** Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens für die Gruppenvariable Bak, getrennt nach Bok,  $p16^{INK4a}$  und  $p21^{Cip/WAF-1}$

Als nächstes wurde Bok als Gruppenvariable, getrennt nach  $p16^{INK4a}$  bzw.  $p21^{Cip/WAF-1}$ , durchleuchtet. Eindeutig diskriminierbar, wenn auch nicht eindeutig signifikant, war hier lediglich der Vergleich Bok positiv/ $p21^{Cip/WAF-1}$  positiv versus Bok negativ/ $p21^{Cip/WAF-1}$  positiv ( $p=0,0505$ ). Sämtliche Kurven sind in Abbildung 19 dargestellt.

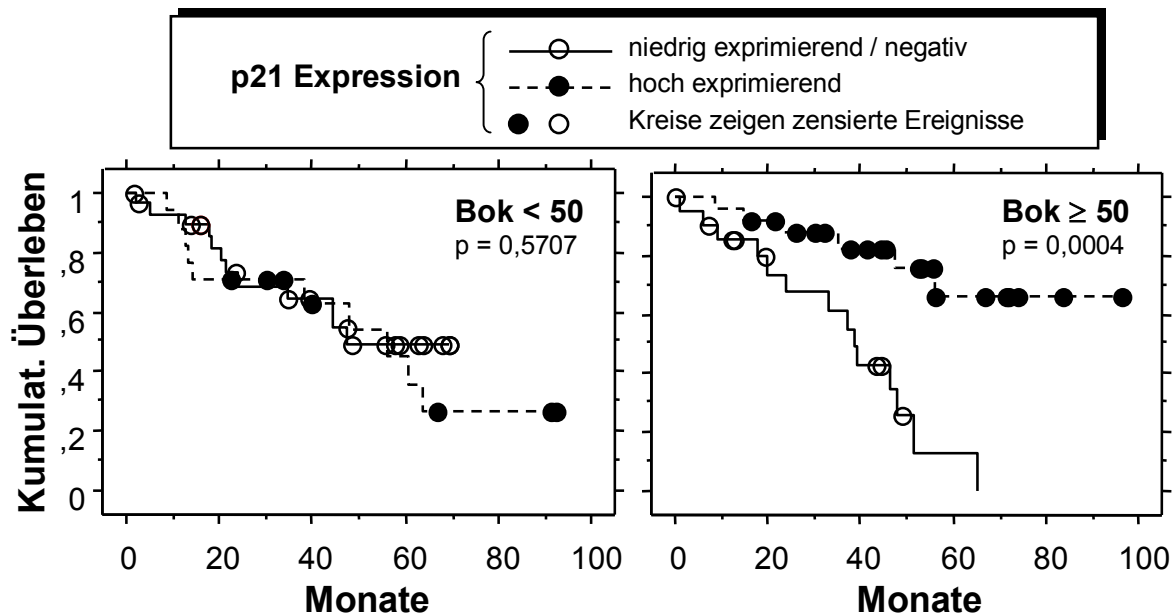


**Abbildung 19:** Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens für die Gruppenvariable Bok, getrennt nach  $p16^{INK4a}$  und  $p21^{Cip/WAF-1}$

Das Ergebnis der Analyse Bok getrennt nach  $p21^{Cip/WAF-1}$  brachte eine weitere Untersuchung mit sich: Umgekehrt wurde nun  $p21^{Cip/WAF-1}$  als Gruppenvariable nach Bok getrennt: Patientinnen mit  $p21^{Cip/WAF-1}$  positiven/Bok positiven Tumoren (Abbildung 20) lebten im Median 49 Monate im Vergleich zu Patientinnen mit  $p21^{Cip/WAF-1}$  negativen/Bok positiven Tumoren mit einem medianen Überleben von 37 Monaten (Log Rank Mantel-Cox Test:  $p=0,0004$ ). Dies ist das signifikanteste Ergebnis dieser Arbeit.

Bei negativer Bok-Expression konnte nicht diskriminiert werden.





**Abbildung 20:** Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens für den kombinierten Expressionsstatus von  $p21^{Cip/WAF-1}$  und Bok

Den gleichen Trend wiesen die Kaplan-Meier Überlebenskurven der Kombination  $p21^{Cip/WAF-1}$  und Bax auf (Abbildung 21, Teilbild A und B). Patientinnen mit  $p21^{Cip/WAF-1}$  positiven und Bax positiven Tumoren lebten im Median 48 Monate verglichen zu 36 Monaten bei  $p21^{Cip/WAF-1}$  negativen und Bax positiven Tumoren ( $p=0,0284$ ). Eine solches Ergebnis konnte im Fall Bax negativ exprimierender Tumoren nicht aufgezeigt werden ( $p=0,6466$ ).

Der p16- und Bak-Expressionsstatus wurde ebenfalls in die Analysen mit  $p21^{Cip/WAF-1}$  als Gruppenvariable einbezogen. Signifikant war die Diskriminierung zwischen  $p21^{Cip/WAF-1}$  positiv/p16<sup>INK4a</sup> positiven Tumoren (medianes Überleben 53 Monate) und  $p21^{Cip/WAF-1}$  negativ/p16<sup>INK4a</sup> positiv mit einem medianen Überleben von 41 Monaten (Log-Rang Mantel-Cox Test:  $p=0,0439$ ). Dies bedeutet, dass die Koexpression des CDK4 Inhibitors p16<sup>INK4a</sup> und des Breitspektrum CDK Inhibitors  $p21^{Cip/WAF-1}$  mit guter Prognose einhergeht. Wie erwartet, wiesen Patientinnen mit  $p21^{Cip/WAF-1}$  negativen/p16<sup>INK4a</sup> negativen Tumoren die kürzeste mediane Überlebensdauer (40 Monate) auf.

Patientinnen mit  $p21^{Cip/WAF-1}$  positiven und Bak negativen Tumoren im Vergleich zu  $p21^{Cip/WAF-1}$  negativen und Bak negativen Tumoren wurden ebenfalls verglichen: Im ersten Fall betrug das mediane Überleben 54 Monate, bei  $p21^{Cip/WAF-1}$  negativen/Bak negativen Tumoren lediglich 45 Monate (Log Rank Mantel-Cox Test:  $p=0,0728$ ). Für Bak positiv läßt sich dagegen nicht nach  $p21^{Cip/WAF-1}$  diskriminieren (Abbildung 21, Teilbild C und D).

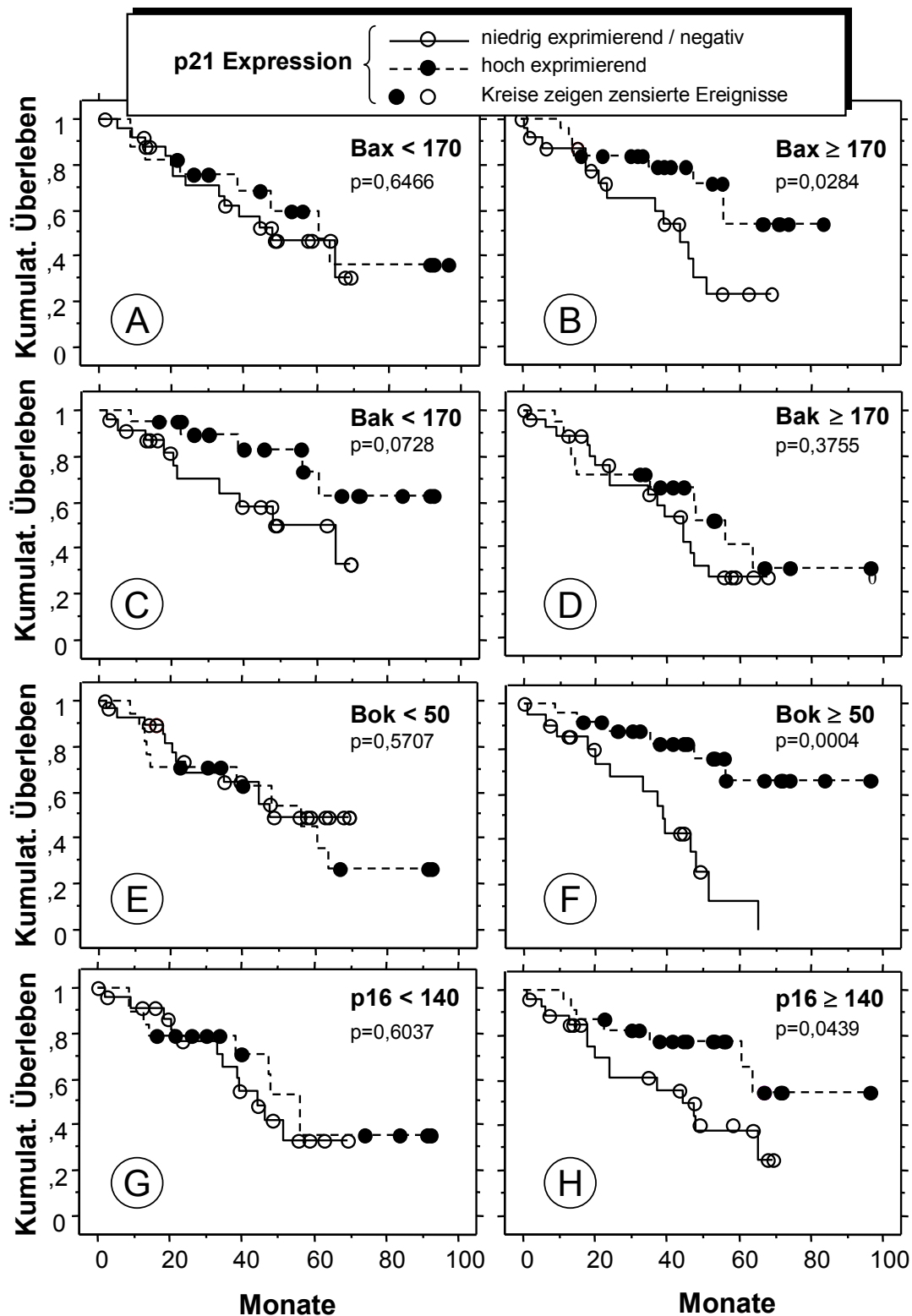
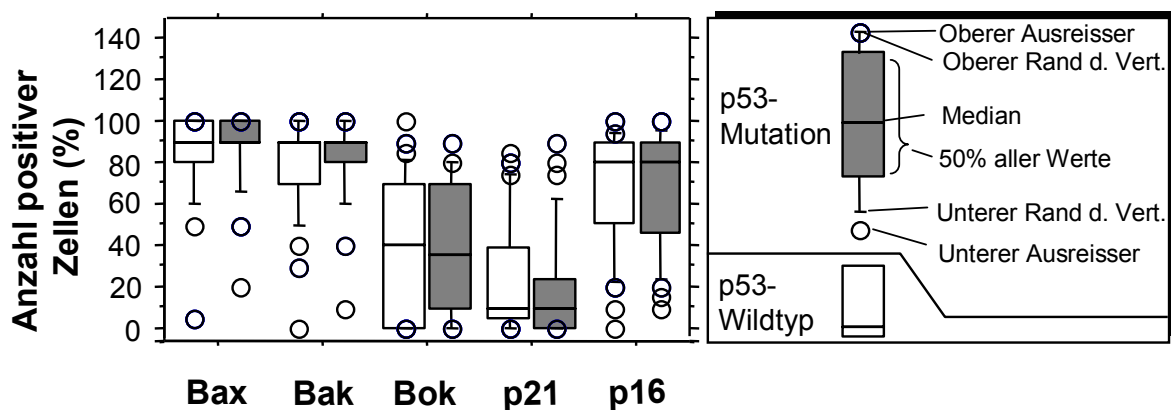


Abbildung 21: Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens für die Gruppenvariable  $p21^{Cip/WAF-1}$ , getrennt nach Bax, Bak, Bok und  $p16^{INK4a}$

#### 4.7 Mutationsanalyse von p53 in Relation zu Protein-Expressionsprofilen

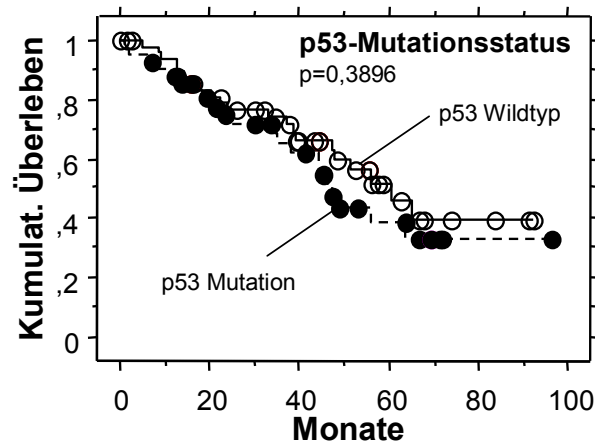
Um einen möglichen Bezug zwischen Expressionsspiegel der gemessenen Gene zum Vorliegen einer p53-Mutation zu untersuchen, wurden die Expressionsspiegel von Bax, Bak, Bok, p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und p16<sup>INK4a</sup> als kontinuierliche Variablen mit den dichotomisiert kategorisierten Variablen für den p53-Mutationsstatus (p53-Wildtyp versus mutierter Typ) analysiert. Die Analyse wurde mit Hilfe des nichtparametrischen ungepaarten Mann-Whitney U-Tests durchgeführt. Es wurde für keines der untersuchten Gene eine Korrelation in Abhängigkeit des p53 Mutationsstatus gefunden. Obwohl p53 als transkriptioneller Aktivator des Bax-Gens gilt, wurde keine Korrelation zwischen dem Vorliegen einer p53 Mutation, also defektem p53-Gen, und einem reduzierten Bax-Spiegel nachgewiesen (Mann-Whitney U-Test,  $p=0,5666$ ). Da auch p21<sup>Cip/WAF-1</sup> durch p53 reguliert wird, wäre hier ebenfalls ein Expressionsverlust zu vermuten ( $p=0,2662$ ). In Abbildung 22 lässt sich solch ein geringfügiger Verlust erkennen. Dieser ist jedoch nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test,  $p=0,2662$ ).



**Abbildung 22:** Expressionsspiegel der untersuchten Proteine in Relation zum p53-Mutationsstatus (Box Plot-Graphik)

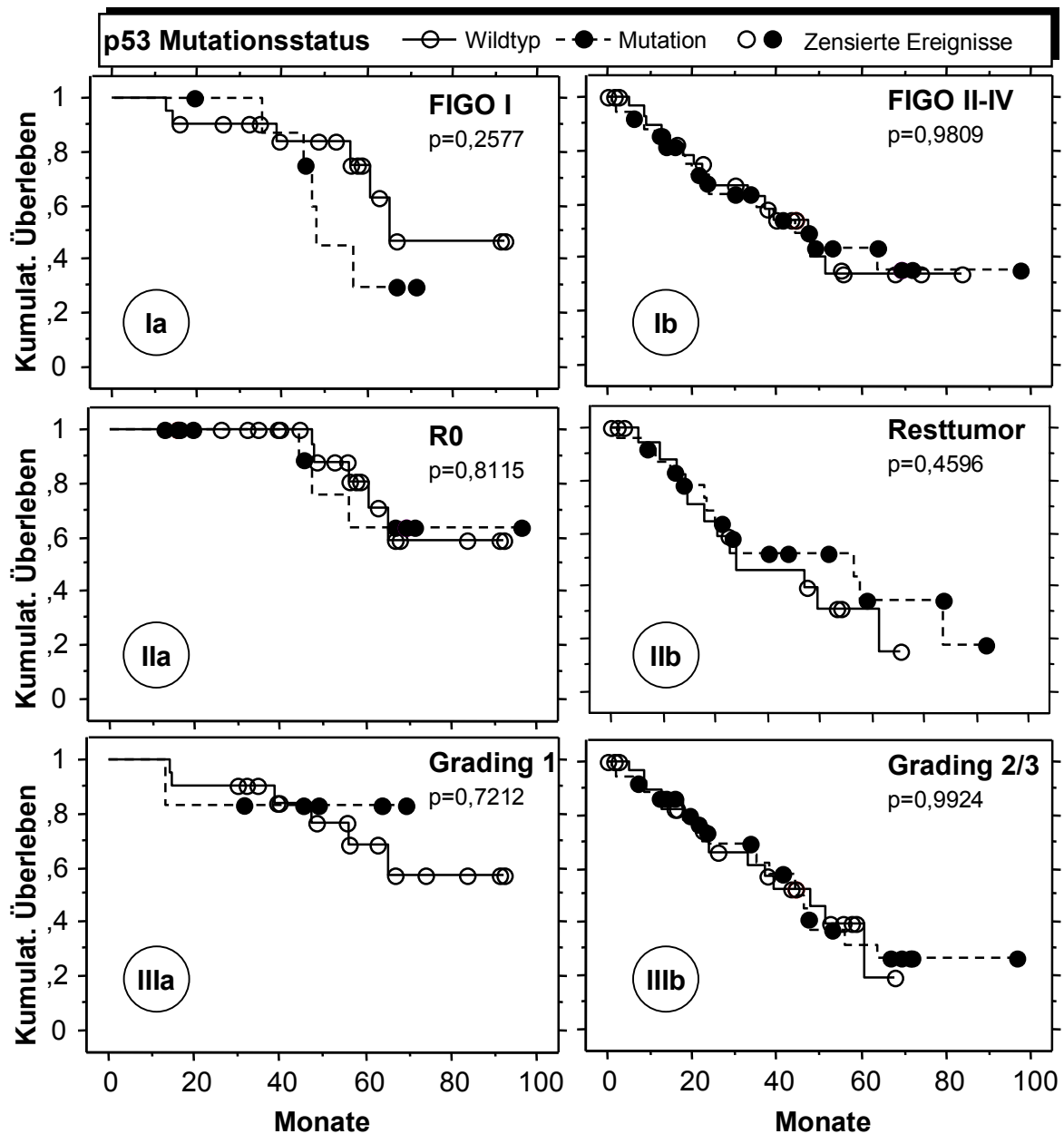
Mittels Kaplan-Meier Überlebensanalysen wurde im folgenden Schritt untersucht, ob der p53-Mutationsstatus das Gesamtüberleben beeinflusst. Zahlreiche frühere Studien bejahen diese Aussage. Mit den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten ließ sich jedoch, im Einklang mit neueren Ergebnissen, nicht signifikant zwischen Tumoren mit dem Vorliegen des p53-Wildtyps und der p53-Mutation hinsichtlich Überlebensdauer diskriminieren (Abbildung 23). Frauen, in deren Tumor p53-Wildtyp nachgewiesen wurde, hatten mit 48 Monaten eine längere

mediane Überlebenszeit als Frauen, deren Tumore eine p53-Mutation vorwiesen (43 Monate). Dieses Ergebnis ist nicht signifikant (Log-Rang Mantel-Cox,  $p=0,3896$ ).



**Abbildung 23:** Univariante Überlebensanalyse in Bezug auf den p53-Mutationsstatus (Kaplan-Meier Überlebenskurve)

Zur Kontrolle wurde überprüft, ob der p53-Mutationsstatus einen Einfluß auf das Gesamtüberleben hat, wenn die klinischen Parameter FIGO-Stadium, Grading und postoperative Tumorfreiheit in die Analyse einbezogen werden (Abbildung 24).



**Abbildung 24:** Überlebensanalysen in Bezug auf den p53-Mutationsstatus und die klinischen Parameter

I: Vergleich Überleben in Bezug auf p53 Status (Wildtyp durchgezogene Linie und weiße Kreise; mutierter Typ gestrichelte Linie und schwarze Kreise) bei FIGO I (Ia) und Tumoren im FIGO-Stadium II-IV (Ib); II: Vergleich Überleben in Bezug auf den p53 Status bei R0resezierten Patientinnen (IIa) und Patientinnen mit Residualtumor (IIb); III: Vergleich Überleben in Bezug auf den p53 Status bei Grading 1 (IIIa) und Grading 2/3 (IIIb)

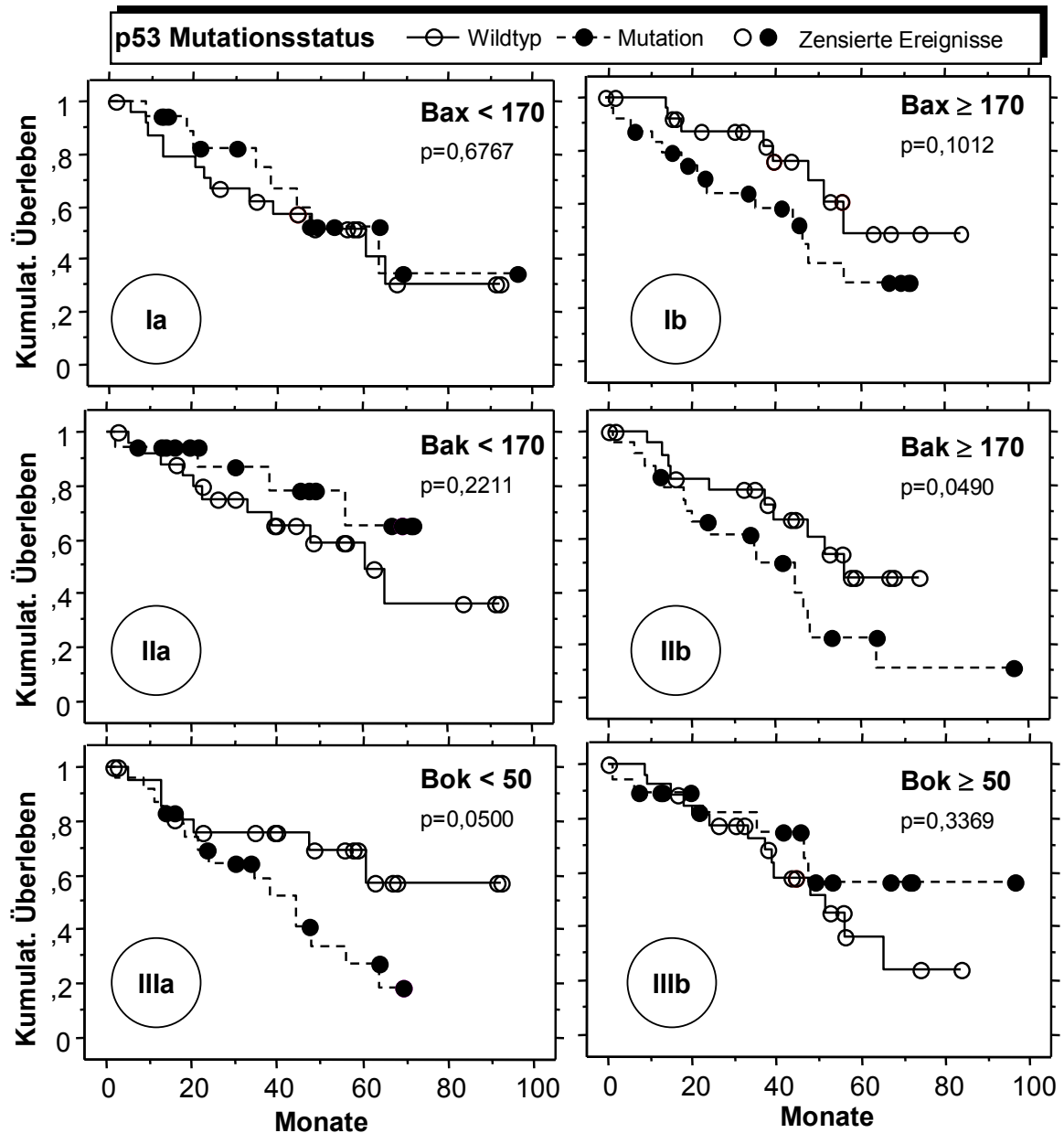
Wie bereits die univariate Analyse in Bezug auf p53 vermuten ließ, zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse bezüglich einer Prognoseverbesserung bei Vorliegen des p53-Wildtyps.

Neben der Einzelgenanalyse von p53 wurde der Einfluß des p53-Mutationsstatus auf die Prognose beim Vorliegen von Defekten der unterschiedlichen Gene analysiert. Zur Validierung der Annahme, p53-Mutationen verschlechterten die Prognose und veränderten das Genprofil von

Zellzyklus- und Apoptoseregulatoren, wurde versucht, ein Risikoprofil unter Einbeziehung des p53-Mutationsstatus zu erstellen. Dazu wurden die Patientinnen in je zwei Gruppen bezüglich der Expression von Bax, Bak, Bok, p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und p16<sup>INK4a</sup> eingeteilt, jeweils dichotomisiert nach hoher bzw. niedriger Expression. Anhand des p53-Mutationsstatus (dichotomisiert nach Wildtyp und mutiertem Typ) wurde die prognostische Relevanz der Kombination dargestellt. Der Vergleich für Bax, Bak und Bok ergibt zwei signifikante Ergebnisse (Abbildung 25). In der Kombination Bak/p53-Mutationsstatus konnte bei den Bak positiven Tumoren bezüglich des Gesamtüberlebens zwischen p53-Wildtyp und p53 mutierten Tumoren diskriminiert werden. Hier zeigte sich mit einem medianen Überleben von 44 Monaten bei Patientinnen mit p53-Wildtyp eine bessere Prognose als bei p53-Verlust. Bei p53-Mutation lag das mediane Überleben bei 36 Monaten (Log Rang-Test 0,049). Das mediane Überleben war bei den Bak negativen Tumoren nicht signifikant verschieden: 48 Monate im Fall des Vorliegens eines p53-Wildtyps und 49 Monate beim Vorliegen einer p53-Mutation (Log-Rang Mantel-Cox Test: p=0,2211). Bax positive Tumoren wiesen ein ähnliches Ergebnis auf. Hier führten Wildtyp-Tumore zu einem medianen Überleben von 48 Monaten, Tumore vom mutierten Typ hingegen zu einem medianen Überleben von 37 Monaten. Dieses Ergebnis war allerdings nicht signifikant (Log-Rang Mantel-Cox Test: p=0,1012).

Das zweite signifikante Ergebnis zeigte sich für Bok. Während p53 nicht signifikant von Bak und Bax abhängt, läßt sich bei niedrigem Bok für den p53 Wildtyp ein längeres Überleben feststellen als beim mutierten Typ (Abbildung 25 IIIa). Die mediane Überlebenszeit bei Bok negativen Tumoren vom Wildtyp betrug 48 Monate verglichen zu einem medianen Überleben von 39 Monaten bei Bok negativen Tumoren vom mutierten Typen (Log-Rang Mantel-Cox, p=0,0500). Die Ergebnisse für p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und p16<sup>INK4a</sup> zeigten keine Signifikanz und werden nicht bildlich dargestellt. Es ergab sich aber der Trend eines längeren Überlebens bei den Wildtyp- und p21<sup>Cip/WAF-1</sup> negativen Tumoren (medianes Überleben 45 Monate) versus den mutierten, p21<sup>Cip/WAF-1</sup> negativen Tumoren mit einem medianen Überleben von 32 Monaten (Log-Rang Mantel-Cox Test: p=0,4722). Der gleiche Trend zeichnete sich bei p16<sup>INK4a</sup> negativ/Wildtyp (44 Monate) versus 38 Monate beim mutierten, p16<sup>INK4a</sup> negativen Typ (Log-Rang Mantel-Cox Test: p= 0,0786) ab.

Mit Ausnahme der Bak negativen sowie der Bok hochexprimierenden Tumore wiesen alle Wildtyp-Tumore in Kombination ein längeres Überleben als die mutierten Typen auf, signifikant jedoch nur für Bak positive und Bok negative Tumore.



**Abbildung 25:** Kaplan-Meier Überlebensanalyse für den kombinierten Status bezüglich p53 Mutationsstatus und Bax-, Bak- und Bok-Expression

I: Bax negativ (a) und Wildtyp (durchgezogene Linie und weiße Kreise) versus mutierter Typ (gestrichelte Linie und schwarze Kreise) bzw. Bax positiv (b) und jeweiliger p53 Mutationsstatus; II: Bak negativ (a) und Wildtyp (durchgezogene Linie und weiße Kreise) versus mutierter Typ (gestrichelte Linie und schwarze Kreise) bzw. Bak positiv (b) und jeweiliger p53 Mutationsstatus; III: Bok (a) und Wildtyp (durchgezogene Linie weiße Kreise) versus mutierter Typ (gestrichelte Linie und schwarze Kreise) bzw. Bok positiv (b) und jeweiliger p53 Mutationsstatus.

#### 4.8 Multivariate Regressionsanalyse für das Gesamtüberleben

Tumorfreiheit gilt in Literatur und medizinischer Praxis als wichtigster Prognosefaktor bezüglich des Gesamtüberlebens bei der Erkrankung am Ovarialkarzinom. Dies zeigt sich auch in den bisher in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen. In einer multivariaten Analyse wurde nun die Unabhängigkeit der einzelnen Apoptoseparameter von den klinisch-pathologischen durchleuchtet. Diese Untersuchung mit Vorwärtsselektion der signifikantesten und Rückwärtsselektion der am wenigsten signifikanten Parameter eliminierte, wenn die Kombinationsvariable p21pos/p16pos außer Acht gelassen wurde, sämtliche Parameter mit Ausnahme der Tumorfreiheit, der adäquaten Chemotherapie und der Kombinationsvariablen p21 positiv/Bok positiv. Hierbei verfehlte p21 positiv/Bok positiv knapp das Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  (relatives Risiko (RR) = 2,813,  $p = 0,0579$ , siehe Tabelle 9). Tumorfreiheit besitzt hingegen ein relatives Risiko von 0,140,  $p = 0,0001$  und das relative Risiko früh zu versterben beträgt bei Durchführung einer adäquaten Chemotherapie 2,685 ( $p = 0,0491$ ).

**Tabelle 9:** Multivariate Regressionsanalyse (Cox Proportional Hazard Modell) aller klinisch-pathologischen und Apoptoseparameter (außer p21/p16)

	p-Wert (Signifikanz)	Relatives Risiko (RR)
<b>Tumorfreiheit</b>	<0,0001	0,140
<b>adäquate Chemotherapie</b>	0,0491	2,685
<b>p21 pos/Bok pos</b>	0,0579	2,813

*Die Variablen wurden nach schrittweiser Vorwärts- und Rückwärtseliminierung ausgewählt.*

Bei Einbeziehung des Zellzyklusregulators p16 als Kombinationsvariable p21pos/p16pos ergab jedoch ein anderes Bild (Tabelle 10). Es verblieben sowohl Tumorfreiheit als auch die Kombinationsvariable p21 positiv/p16 positiv nach der schrittweise vor- und rückwärtsgeführten Elimination im multivariaten proportionalen Risiko-Modell nach Cox. Hierdurch wurde der Kombinationsparameter p21/Bok jedoch eliminiert. In diesem Regressionsmodell betrug das relative Risiko für einen frühen Tod  $RR = 2,852$ ,  $p = 0,0252$  für Patientinnen mit p21/p16 negativen Tumoren,  $RR = 0,123$ ,  $p = 0,0001$  im Fall der postoperativen Tumorfreiheit.



**Tabelle 10:** Multivariate Regressionsanalyse (Cox Proportional Hazard Modell) aller Variablen, einschließlich p21pos/p16pos

	<b>p-Wert (Signifikanz)</b>	<b>Relatives Risiko (RR)</b>
<b>p21 pos/p16 pos</b>	0,0252	2,852
<b>Tumorfreiheit</b>	0,0001	0,123

Hinsichtlich der dominanten Rolle des Vorhandenseins einer Resttumormenge für die Krankheitsprognose und das relative Risiko, früh zu versterben, wurden die klinisch-pathologischen und molekularen Risikofaktoren erneut im Cox-Modell analysiert - diesmal unter Auslassung des Parameters Resttumor/Tumorfreiheit. In dieser Analyse zeigte sich, dass sowohl hohes Grading (RR=3,553, p=0,0026), inadäquate Chemotherapie (RR=2,766, p=0,0106) als auch p21 negativ/Bok negativ (RR=3,217, p=0,0085) als Kombinationsvariable hoch signifikant das relative Risiko, früh zu versterben, beeinflussten (Tabelle 11).

**Tabelle 11:** Multivariate Regressionsanalyse (Cox Proportional Hazard Modell) aller Variablen, außer dem Parameter Tumorfreiheit

	<b>p-Wert</b>	<b>RR</b>
<b>Grading</b>	0,0026	3,553
<b>adäquate Chemotherapie</b>	0,0106	2,766
<b>p21 pos/Bok pos</b>	0,0085	3,217

## 5 Diskussion

Tumorentstehung und -progression sind die Folge von Defekten der Zellzyklusregulation und des Apoptoseablaufs. Vermehrt sich eine gesunde Zelle ungehemmt aufgrund einer gestörten Proliferationskontrolle, können zudem Fehler in der DNA-Reparatur auftreten und weitere genetische Schäden akkumulieren. Die Proliferationskontrolle findet an den sogenannten Checkpunkten statt. Hier entscheidet sich, ob die Zelle im Zellzyklus fortschreitet. Eine aus der G0-Phase in die G1-Phase eingetretene Zelle kann über die S-Phase, in der die DNA-Synthese stattfindet, in die G2- und konsekutive Mitose-Phase übergehen. Reguliert wird die G1/S-Transition durch die Expression der Cycline. Die Cycline D1-3 und E aktivieren als Kofaktoren phasenspezifisch an verschiedenen Checkpunkten ihre cyclinabhängigen Kinasen (CDK). Die D-Typ Cycline aktivieren CDK4 und CDK6 während CyclinE CDK2 aktiviert. Die aktivierten Kinasen phosphorylieren mehrfach das Rb-Protein, wodurch die S-Phase-aktivierenden Transkriptionsfaktoren E2F und c-myc enthemmt werden. Dieser Kontrollmechanismus des S-Phaseeintritts wird als Rb-Signalweg bezeichnet. Desweiteren wird der Rb-Signalweg durch den DNA-Schädigungssignalweg kontrolliert. Dort werden nach DNA-Schadenserkenung Checkpunktkinasen aktiviert, die über p53-abhängige und -unabhängige Wege CDK Inhibitoren wie z.B. p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und p16<sup>INK4a</sup> induzieren. Hierdurch wird die G1/S-Transition am G1-Restriktionspunkt gehemmt.

Wenn zusätzliche Defekte von DNA-Reparatursystemen und Checkpunktkontrollinstanzen und ein gestörter Apoptoseablauf auftreten, kann es zur Tumorprogression mit Therapieresistenz und schlechter Prognose der Tumorerkrankung kommen. Denkbare Apoptosedefekte sind: Verlust der proapoptotischen Gene Bax, Bak und Bok, eine Überexpression antiapoptotischer Gene, wie z.B. Bcl-2, oder Defekte im Caspasensystem.

### 5.1 Klinische Ergebnisse - bisherige Wegweiser in der medizinischen Praxis

Ovarialkarzinome werden meist erst in den späten FIGO-Stadien diagnostiziert, da bisher keine signifikant-prädiktiven Screeningmarker existieren. Erst die Symptome des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms führen die Patientinnen zum Arzt. Klinisch-pathologische Stadieneinteilungen ermöglichen dann aber eine nur unzureichende Prognoseabschätzung. Daher konzentriert sich die Forschung, neben der Perfektionierung der operativen Methoden zur Erreichung postoperativer Tumorfreiheit, auf detaillierte Messungen molekularer Prognosefaktoren, um eine individuelle Therapieplanung zu ermöglichen.

Die in vorliegender Arbeit betrachteten klinisch-pathologischen Parameter des repräsentativen Patientenkollektivs spiegeln in prognostischer Hinsicht den aktuellen Stand des Wissens wieder. Postoperative Tumorfreiheit erhöht die Überlebensprognose deutlich und ist insgesamt der aussagekräftigste Prognosefaktor. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Arbeiten [46] überein. In dieser Studie wurde zusätzlich das Patientenalter in die Untersuchungen einbezogen und als weiterer Indikator bezüglich des Gesamtüberlebens und Prädiktor für eine Komplettremission (CR) nach Chemotherapie beschrieben. Weitere prädiktive Faktoren sind in dieser Arbeit das Grading, das FIGO-Stadium und die Durchführung einer adäquaten adjuvanten Chemotherapie. Klinische Entscheidungen haben sich bisher auf diese Faktoren und Einteilungen gestützt, um die Therapien festzulegen und die Prognose abzuschätzen. Standardtherapie ist nach wie vor, neben chirurgischer Intervention mit dem Ziel des Erreichens der Tumorfreiheit, die postoperative adjuvante Chemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel bzw. Docetaxel. Zwei Drittel der so behandelten Patientinnen erleiden jedoch ein Tumorrezidiv. In der Annahme, dass eine bessere Kenntnis der Tumorbiologie zuvor erwähnte Prognosefaktoren komplettieren oder per se richtungsweisend sein kann für neue Therapiemodalitäten, wurden Komponenten zellulärer Signalwege untersucht, die einerseits an der Tumorentstehung und -progression beteiligt sind, andererseits aufgrund funktioneller Daten aus präklinischen Modellen an der Resistenzentwicklung für die zytostatische Therapie von Tumoren beteiligt sein könnten.

## 5.2 Molekulare Ergebnisse - Einordnung in den Stand des Wissens

Die Rollen von Bax, Bak und Bok wurde in früheren Studien zum Ovarialkarzinom noch nicht vergleichend untersucht. Hauptsächlich wurde die individuelle Funktion bzw. prognostische Bedeutung von Bax, Bak und Bok betrachtet, nicht aber deren Zusammenspiel. Die Funktion von Bax, Bak und Bok besteht darin, über die Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs die Apoptose einzuleiten, was letztlich zur Auslöschung der Zelle führt. Die Apoptose ist neben der Hemmung der Zellproliferation der wichtigste Kontrollmechanismus eines Organismus gegen das Tumorwachstum. Folglich müßten Patientinnen mit Tumoren hoher Expression der pro-apoptotischen Genprodukte Bax, Bak und Bok, bzw. hoher Expression der Zellzyklusregulatoren CDKI p16<sup>INK4a</sup> und CDKI p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und einem unmutierten p53 Gen eine gute Prognose haben. Beide Zellzyklusregulatoren sorgen als Inhibitoren der Zellproliferation für einen Arrest des Zellzyklus, ermöglichen auf diese Weise DNA-Reparaturen oder vermitteln Apoptose. Einige Arbeiten beschreiben beim Ovarialkarzinom und Ösophaguskarzinom eine unabhängige prognostische Signifikanz von Bax [99,89,96]. KUPRYJANCZYK et al. wiesen beim Ovarialkarzinom einen Einfluß von Bax auf die

Komplettremission (CR) nach Chemotherapie nach, fanden diese Korrelation zwischen erhöhter Bax-Expression und verlängertem krankheitsfreiem Überleben jedoch lediglich im FIGO-Stadium IIIc [46]. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen der Autorengruppe um BAEKELANDT, die Bax beim Ovarialkarzinom nicht als unabhängigen Faktor nachweisen konnten [2]. RAU et al. sehen die Ursache für eine fehlende Prognoseverbesserung durch erhöhte Bax- Spiegel beim Rektumkarzinom darin, dass die Radiochemotherapie Defekte der p53/Bax-Achse überwinden kann [76]. Zur prognostischen Relevanz von Bak und Bok in Relation zu Bax liegen für das Ovarialkarzinom keine Daten vor.

In den vorliegenden Analysen zeigten sich in den Einzelgenuntersuchungen keine signifikanten Ergebnisse. Patientinnen mit einer niedrigen bzw. negativen Bak-Expression wiesen ein verlängertes Überleben auf. Möglicherweise liegt hier, bei nur knapper Signifikanz, ein Artefakt vor. Für die grenzwertig signifikant bessere Prognose der Bak niedrigexprimierenden Turoren ist wahrscheinlich die höhere Zahl der nicht R0-operierten Patientinnen in der Bak hochexprimierenden Gruppe verantwortlich.

Obleich nicht signifikant, zeigte  $p21^{Cip/WAF-1}$  in der Einzelgenanalyse eine Diskriminierbarkeit zwischen gutem und schlechtem Überleben. Dieses Ergebnis stimmt sowohl mit denen von SCHUYER et al. überein, die Analysen am Ovarialkarzinom durchführten [89], als auch GÜNER und RAU, die Ösophagus- und Rektumkarzinome untersuchten [31,76]. In der vorliegenden Arbeit wird die zelltodregulierende Funktion von  $p21^{Cip/WAF-1}$  weiter demaskiert, indem durch die Einbeziehung der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bok in die Analysen der prognostische Wert von Bax und Bok sichtbar wird.

Diese Multigenanalyse liefert das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit. Sie macht deutlich, dass  $p21^{Cip/WAF-1}$  als Schalter wirkt, welcher die Relevanz von Bax und Bok erst sichtbar macht. Während nämlich Bax und Bok in der Einzelgenanalyse nicht diskriminierbar sind, führt hohes Bax und Bok in Kombination mit hohem  $p21^{Cip/WAF-1}$  zu signifikant besserer Überlebensprognose. Beim Ösophaguskarzinom konnte ebenfalls der Wert einer Multigenanalyse gezeigt werden. Die Kombination aus Rb-Signalwegskomponenten Rb hoch\*  $p16^{INK4a}$  hoch\* Cyclin D1 niedrigexprimierend kennzeichnete eine Subgruppe von Patientinnen mit sehr guter Krankheitsprognose und gutem Therapieansprechen [31].

### 5.3 $p21^{Cip/WAF-1}$ - zwischen Zellzyklusarrest und Zelltod

Der CDKI  $p21^{Cip/WAF-1}$  gehört zur CIP/KIP Familie der CDKI-Inhibitoren und verursacht, im Gegensatz zu den Mitgliedern der INK4 Familie, nicht nur die G1- und S-Phase, sondern auch

den G2-Zyklusarrest [103]. Die Hauptaufgabe dieses Proteins besteht in der Kontrolle DNA-geschädigter Zellen, welche durch die Verlangsamung des Zellzyklus bzw. durch Zellzyklusarrest einer Reparatur zugeführt werden können. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass p21-Induktion nicht nur mit Zellzyklusarrest sondern auch mit Chemotherapieresistenz verbunden sein kann [93]. Sowohl die Applikation von Chemotherapeutika als auch Bestrahlung führt zur Apoptoseinduktion und Caspasenaktivierung. Obwohl die verschiedenen Zytostatika unterschiedliche Angriffspunkte besitzen, führt jedes Zytostatikum zur Zellpermeabilisation und zur Aktivierung der Schlüssel-Caspase-3 [45]. Platinhaltige Chemotherapeutika, die beim Ovarialkarzinom Anwendung finden, führen zur Quervernetzung von DNA-Strängen durch kovalente Bindungen mit den Basen Guanin, Adenin und Cytosin. Bei Radiatio kann die Zelle über p21<sup>Cip/WAF-1</sup>-Vermittlung im prolongierten Zellzyklusarrest verharren, was zum Aussetzen der Apoptose führen kann. Bei Einsatz von Chemotherapeutika tritt dagegen kein prolongierter Zellzyklusarrest auf. Zellzyklusarrest ist zwar wichtig zur Durchführung von Reparaturen an der DNA, jedoch löscht erst die Apoptose die Tumorzelle aus und verhindert eine Weitergabe des malignen Erbguts. Somit ist verständlich, dass eine Dysfunktion der Apoptose zu Therapieresistenz führt, die durch Aktivierung von DNA-Reparatur und Zellzykluscheckpunktprogrammen verstärkt werden kann.

Am Beispiel der akuten lymphoblastischen Leukämie zeigt sich, dass ein Zusammenbruch der Caspase-3-Funktion zu einem Rückfall aufgrund von Therapieresistenz führt [73]. Darüber hinaus ist bekannt, dass sich durch Re-Expression von Bax [110] oder Procaspase-3 [26] die Apoptosesensibilität als Voraussetzung für eine effektive Chemotherapie in Krebszellen wiederherstellen lässt, wenn zuvor eine Resistenz gegenüber der Chemotherapie entstanden war. Des Weiteren korrelieren p21<sup>Cip/WAF-1</sup>-Induktion und Verlangsamung der Tumorzellproliferation mit einer Therapieresistenz, was zu kürzerem progressionsfreiem Überleben führt [76]. In früheren Studien zeigte sich, dass ein Bax-Expressionsverlust [94,60], die Überexpression von Bcl-2 als anti-apoptotisches Protein [74,110] und eine Störung der Caspaseaktivierung [73] an den Mechanismen der Chemotherapieresistenz beteiligt sind. Dies zeigen neben klinischen auch in vitro-Studien. Einige Arbeiten demonstrierten, dass Agentien, wie z.B. Koffein, die AMT/ATR-Kinase vermittelten, p53-abhängige Zellzyklus-Checkpunkte außer Funktion setzen können und die Tumorzellen gegenüber einer Chemotherapie resensibilisieren können [121,59]. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass Bestrahlung von MCF-7 Zellen, unabhängig von deren Fähigkeit Caspase-3 zu exprimieren, zur Induktion von p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und somit zum Zellzyklusarrest auf G2-Niveau führt. Dies ruft eine Hemmung der Caspase-3-vermittelten

Apoptose und konsekutiver Therapieresistenz hervor [114]. Caspase-3 defiziente Zellen verharren nach Gabe von Zytostatika (Epirubicin, Etoposid, Taxol) im Arrest bei bestehender Apoptoseresistenz. Die Apoptoseresistenz konnte überwunden werden, sobald Caspase-3 Expression ermöglicht wurde. Es ließ sich der prolongierte G2-Arrest in den bestrahlten Zellen überwinden, wenn die durch DNA-Schädigung induzierten Stress-Kinasen und die p21<sup>Cip/WAF-1</sup> Expression durch Koffein gehemmt waren. Den gleichen Effekt zeigten Zellen, die bi-allelisch p21 deletiert waren (HCT 116 p21<sup>-/-</sup>). Dadurch wurde die Caspase-3-abhängige Apoptose in bestrahlten, Caspase-3 suffizienten, MCF-7 Zellen ausgelöst. Bei ektopter p21 Expression mittels adenoviralem Gentransfer wurde die Apoptose in MCF-7 Zellen gestoppt, selbst wenn mit Koffein behandelt wurde.

Insgesamt ist festzustellen, dass Apoptosedefekte durch Radiatio, gestörte Bax-, oder Caspase-Expression und erhöhte Expression von anti-apoptischen Proteinen zustandekommen. P21 hemmt nach Radio-Chemotherapie den Zelltod, weil DNA-Schäden initial einen permanenten G2-Arrest als ersten Schutzmechanismus triggern. Der exekutive Mechanismus der Apoptose hingegen bleibt solange verborgen, bis der Zellzyklusarrest überwunden wird. Apoptosedefekte werden bezüglich ihrer klinischen Relevanz möglicherweise erst sichtbar, wenn Zellzyklusarrestprogramme inaktiviert sind.

Eine Detektion vorbestehender Defekte in Tumoren mit Hilfe von Multigenanalysen ist nicht nur im Hinblick auf eine Prognoseabschätzung sondern besonders mit Sicht auf neue mögliche Therapiemodalitäten sinnvoll. Solche könnten z.B. zielgerichtet Zellzyklusarrest auflösen oder Signalproteine der Apoptose wie Bax oder Caspase-3 aktivieren.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass bei Tumoren mit der Konstellation p21<sup>Cip/WAF-1</sup> hoch- und Bax hoch- bzw. Bok hochexprimierend ein möglicher Apoptosedefekt überwunden ist, denn diese Konstellation zeigt eine signifikant bessere Prognose als bei niedrig exprimiertem Bax bzw. Bok. Für die konstitutive Expression von p21<sup>Cip/WAF-1</sup> konnte in früheren Studien eine positive prognostische Bedeutung gezeigt werden, z.B. beim metastasierten Kolonkarzinom [94] und beim Ösophaguskarzinom [96]. Koexpression von p21<sup>Cip/WAF-1</sup>/Bax bzw. p21<sup>Cip/WAF-1</sup>/Bok ist hier mit einer guten Prognose verbunden und bestätigt somit die positive prognostische Bedeutung von p21<sup>Cip/WAF-1</sup>. Das signifikante Ergebnis der Multigenanalyse mit verlängertem Überleben im Fall der Konstellation p21<sup>Cip/WAF-1</sup> positiv/p16<sup>INK4a</sup> positiv zeigt Potential zur Erstellung von Risikoprofilen zur Prognoseabschätzung auf.

Bei der Untersuchung Apoptose-relevanter Gene in Relation zu klinisch-pathologischen Risikofaktoren fanden sich in multivariaten Analysen Hinweise, dass Tumorfreiheit,

adäquate Chemotherapie und die Kombinationsvariable p21/Bok als unabhängige prognostische Faktoren identifiziert werden. Hierbei verfehlte p21/Bok allerdings knapp das Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Wurde jedoch das tumorfreie Überleben als Parameter aus der multivariaten Analyse herausgenommen, wurde eine hohe Signifikanz für die unabhängigen Parameter p21 positiv/Bok positiv, Grading und adäquate Chemotherapie offensichtlich. Dies stimmt gut mit der Bedeutung dieser Parameter für das Ansprechen auf zytotoxische Tumortherapie überein. Die Einbeziehung des Zellzyklusregulators p16 als Kombinationsvariable ergab jedoch eine Unabhängigkeit von p21 positiv/p16 positiv, was auf die hohe Relevanz einer intakten Zykluscheckpunktkontrolle für tumorfreies Überleben rückschließen lässt.

#### **5.4 Rolle von Bak im Vergleich zu seinen Homologen Bax und Bok**

Sowohl Bax als auch Bak zeigen eine hohe Expression in den Ovarialtumoren. Allerdings korreliert die Expressionshöhe von Bax nicht mit Bak. Die Kaplan-Meier Überlebenskurven weisen ein besseres Überleben für die Konstellation Bax positiv/Bak negativ auf, jedoch nicht signifikant (siehe Abbildung 17). Bisher wurde angenommen, Bax und Bak hätten völlig redundante Funktionen [50]. Neuere Studien aber zeigen, dass neben bereits genannten regulativen Mechanismen weitere Unterschiede bestehen. So unterscheiden sich Bax und Bak in ihrer Lokalisation: Unaktiviertes Bax ist im Zytosol lokalisiert, während sich Bak konstitutiv an der äußeren Mitochondrienmembran sowie am endoplasmatischen Retikulum gesunder Zellen befindet [122]. Zytosolische Signale führen zur Translokation von Bax an die Organellenmembran. Dort kommt es im Falle einer Aktivierung zur Homooligomerisierung, wobei an der Organellenmembran auch die interindividuelle Assoziation möglich ist [35]. Dies erfordert eine stärkere Kontrolle von Bak im Vergleich zu Bax, welche durch endogene Bak-Inhibitoren wie Mcl-1 und VDAC-2 erfolgt.

Zellüberleben wird durch Bcl-2 und seine Verwandten Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1 und A1 ermöglicht. Jeder dieser Gruppenzugehörigen besitzt drei oder vier BH-Domänen (Bcl-2-homologe Regionen). Apoptose hingegen wird durch zwei andere Bcl-2-Unterfamilien bestimmt. Das initiale Signal für den Apoptoseablauf wird durch Mitglieder der BH3-only-Gruppe erbracht (Bad, Bid, Bim, Puma, Noxa), denen nur die BH3-Domäne gemein ist [37]. Die Multidomänen-Proteine Bax und Bak (mit ihren BH1-BH3-Domänen) sind für die apoptotische Aktivierung der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums verantwortlich [12]. Im aktivierten Zustand können sie die äußere Mitochondrienmembran penetrieren, um pro-apoptotische Faktoren freizusetzen, die das Caspasensystem aktivieren. Dies tötet die Zelle [1,17]. Die Interaktionen zwischen den drei Sub-Familien bestimmen also das Überleben der Zelle.

Die Kontrolle von Bax und Bak durch die anti-apoptotischen Bcl-2-Homologa und die BH3-only Unterfamilie wird erst seit Kurzem und nur ansatzweise verstanden. Zuvor richtete sich der Blick der Forschung fast ausschließlich auf die Interaktion von Bax, da eine homologe Funktion und Regulation von Bak angenommen wurde. Für Bax wird eine direkte Bindung und Aktivierung durch BH3-only Proteine diskutiert (ausführlich untersucht für Bid [112]). Des Weiteren wird aktiviertes Bax durch Bcl-2 direkt gebunden, inhibiert und somit Apoptose verhindert [111]. Es wurde kürzlich gezeigt, dass Bak einen von Bax getrennten Kontrollmechanismus benötigt, da es sich mit seiner prominenten Bindungsstelle direkt an der äußeren Mitochondrienmembran befindet. Es ist anzunehmen, dass nur Bak von Mcl-1 und Bcl-x<sub>L</sub>, den sogenannten „Beschützern der Mitochondrienmembran“, negativ reguliert wird. Bcl-2 hemmt jedoch nicht Bak und hat keinen Einfluß auf die Bok-vermittelte Apoptose [115]. BH3-only Proteine wie z.B. Noxa, Puma und Bim können jedoch Mcl-1 und Bcl-x<sub>L</sub> aus der Bindung an Bak verdrängen, es hierdurch aktivieren und Apoptose einleiten. Denn ist Bak einmal von Mcl-1 und Bcl-x<sub>L</sub> befreit, kann es an der Organellenmembran oligomerisieren und den Zelltod einleiten.

Eine weitere Ebene der Bak-Regulation wird durch das VDAC-2 Protein erreicht. VDAC-2 ist die Isoform von VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel). Diese Anionentunnel sind physiologischer Bestandteil der Mitochondrienmembran und wurden bisher als Mitverursacher des apoptotischen und nekrotischen Zelltod gesehen [9]. VDAC ist an der Bildung von Poren im Rahmen der Zellpermeabilisierung beteiligt. Die Abwesenheit von VDAC führt zur Bak-Oligomerisierung und erleichtert Apoptose. In lebensfähigen Zellen wurden Bak-Komplexe mit VDAC-2 gefunden. Während VDAC-2 Überexpression Zelltod über mitochondriale Apoptose verhindert, verdrängen BH-only-Proteine VDAC-2 von Bak und initiieren Apoptose [11]. VDAC-2 hemmt Bax nicht und ist somit ein spezifischer Inhibitor von Bak.

In der vorliegenden Arbeit erscheint Bak im Gegensatz zu Bax und Bok in den Multigenanalysen nicht relevant. Bak weist in der Einzelgenanalyse sogar gegensätzliches Verhalten zu seinen pro-apoptotischen Verwandten auf. Dafür kommen mehrere Erklärungen in Frage: Einerseits gibt es spezifische Bak-Hemmer (s.u.), die Bak selektiv inhibieren, andererseits ist das Ovarialkarzinom bekannt für genetische Defekte des Mismatch Repair Proteins MSH2, sodass ein gehäuftes Auftreten von Frameshiftmutationen von Bak denkbar ist [68]. Zudem ist bewiesen, dass sich Bax und Bok epigenetisch durch DNA-Methylierung und Histondeacetylierung regulieren lassen, indem die Transkription heruntergefahren wird. Dies führt zu einem Bax/Bok-Verlust.

Für Bak wurde eine Regulation durch p53 beschrieben, wobei sich, im Unterschied zu Bax, keine p53-Konsensusmotive im Bak-Promotor finden. Eine direkte transkriptionelle Regulation



ist daher unwahrscheinlich. Bak scheint zudem nicht dem gleichen Druck zur Negativselektion zu unterliegen wie Bax, da Bak-Aktivierung durch zusätzliche Regulatoren wie Mcl-1 und VDAC-2 gehemmt wird. Für Mcl-1 wurde eine deregulierte Expression in Tumoren gezeigt. Hierdurch können selbst apoptoseresistente Tumoren bei hoher Mcl-1-Expression hochpositiv für Bak bleiben, da die Bak-Aktivierung in diesen Tumoren gestört ist.

Mitglieder des DNA-Mismatch-Reparatursystems, wie hMSH2, detektieren DNA-Schäden und aktivieren Apoptose und Zellzyklusarrest [47]. RAU et al. zeigen, dass prätherapeutisch erhöhte hMSH2-Spiegel zu einem besseren 5-Jahres-krankheitsfreien Überleben bei kolorektalen Karzinomen führen [76]. SAMIMI et al. beschreiben hingegen eine Herunterregulation von hMSH2 in Ovarialkarzinomen bei platinhaltiger Chemotherapie [85]. Als eine der Ursachen für inaktivierende Bax Mutationen mit Expressionsverlust beschreiben die Autoren Rau et al. eine defekte Mismatch-DNA-Reparatur [94]. Durch fehlende Reparatur nach Bax-Frameshift-Mutation besteht ein Ungleichgewicht zwischen Bax und Bak. Es ist denkbar, dass dies zu regulatorischen Maßnahmen führt, welche für eine suffiziente Apoptose Bax präferieren (s.o.). Somit würde sich die Konstellation p21<sup>Cip/WAF-1</sup> positiv/Bak positiv erklären, die nicht zu einem verlängerten Überleben führt. Dabei wirkt p21<sup>Cip/WAF-1</sup> nicht als Schalter und bestimmt daher auch nicht die Relevanz der Bak-Expression für das Langzeitüberleben. Vermutlich ist die Bak-vermittelte Apoptose für das Ovarialkarzinom nicht von Bedeutung. In die gleiche Richtung geht die Überlegung, dass Bax und Bok durch DNA-Methylierung und Histondeacetylierung einer epigenetischen Regulation unterzogen werden. Dies unterstreicht die differente Regulation zu Bak.

### **5.5 Einfluß von p53-Inaktivierung auf die Effektoren des p53-Signalwegs**

P53 ist der Schlüsselregulator von Apoptose und Zellzyklus nach DNA-Schädigung und kann nach endogener oder exogener DNA Schädigung aktiviert werden. Es ist beteiligt an DNA-Reparatur, Zellzyklusregulation und Induktion von Apoptose [53]. Hinzu kommt, dass p53 die Checkpunktkontrolle über einen p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und 14-3-3 $\sigma$ -abhängigen Signalweg reguliert [10]. Während p21<sup>Cip/WAF-1</sup> als CDKI direkt die Zellzyklusprogression hemmt, vermittelt 14-3-3 $\sigma$  den Abbau Serin/Threonin-phosphorylierter Proteine wie der CDK 25c Phosphatase. Letztere hemmt wiederum die inhibitorische CDKI-Phosphorylierung.

Da p53 zahlreiche Regulationsgene von Zellzyklus und Apoptose kontrolliert [42], erscheint die Einbeziehung der p53-Analysen gerade in Zusammenhang mit seinen Effektormolekülen p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und Bax sinnvoll. Einige Studien ordnen dem p53-Mutationsstatus beim

Ösophaguskarzinom [39,71] und beim kolorektalen Karzinom [88] prognostische Signifikanz zu, andere Studien dagegen nicht [48,33]. Bezüglich anderer Karzinome ist die Rolle des p53-Mutationsstatus ebenfalls fraglich. SCHUYER et al. zeigen, dass beim Ovarialkarzinom weder der p53-Mutationsstatus noch der p21-Expressionspiegel einen Einfluß auf das Gesamtüberleben haben [89]. Gleiche Erkenntnisse liegen für das Rektumkarzinom vor [76], welches wie das Ovarialkarzinom ein Adenokarzinom ist. Außerdem zeigten frühere Studien, dass die p53-Expression das Gesamtüberleben beeinflusst, wobei ein Zusammenhang zwischen p53-Mutation und p53-Überexpression angenommen wurde [92,89]. Dieser läßt sich aber nicht bestätigen, da auch Wildtyp p53-Protein in Tumoren überexprimiert sein kann. Mutiertes p53 ist zudem funktionell darin gestört, die Expression von Effektormolekülen wie p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und Bax zu verstärken [25]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen ebenfalls darauf hin, dass dem p53-Mutationsstatus beim Ovarialkarzinom keine isolierte prognostische Relevanz zukommt. Zudem wurde kein Zusammenhang zwischen der Bax- und p21-Expression einerseits und dem p53-Mutationsstatus andererseits festgestellt. P21<sup>Cip/WAF-1</sup> wird also, wie aus der Literatur hervorgeht, über p53-unabhängige Mechanismen reguliert. Bax stellt jedoch einen Schlüsselfaktor in der Vermittlung der p53-abhängigen und p53-unabhängigen Apoptose nach chemotherapieinduzierter DNA-Schädigung dar [31]. Es ist davon auszugehen, dass eine platinhaltige Chemotherapie Bax aktiviert. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom c, das zusammen mit ATP, APAF-1 und der Procaspase-9 das mitochondriale Apoptosom bildet. Die vorliegenden Analyseergebnisse zeigen für das Ovarialkarzinom, dass die Inaktivierung von p53 durch p53-Mutation nicht zu einer Änderung des Expressionsniveaus von p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und Bax führten. Das gleiche Ergebnis zeigen auch Untersuchungen von Bax-Expression und p53-Mutationen beim Mammakarzinom [95]. Die Untersuchungen legen nahe, dass andere Faktoren als p53 ausschlaggebend für die p21- und Bax-Regulation sind.

Für Bak und Bok sind solche Daten bisher noch nicht erfasst. Die vorliegende Arbeit zeigt interessanterweise für den p53 Wildtyp ein längeres Überleben als bei p53-Mutation, wenn Bok negativ ist. Möglicherweise ist neben der Apoptoseaktivierung durch Bak die durch Bok ebenfalls bedeutsam, sodass bei Bok-Verlust die Bax-Aktivierung durch p53 stärker zum Tragen kommt. Die Zusammenhänge zwischen Bax, Bak und Bok, sowie deren Funktionen und Regulationen sind beim Ovarialkarzinom offenbar sehr komplex. Ein präziseres Verständnis dessen ist für neue Therapieansätze bedeutend. Als wesentliches Ergebnis zeigt diese Arbeit, dass Verlust von Bax und Bok, nicht jedoch Bak-Verlust ein bedeutender Risikofaktor beim Ovarialkarzinom ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Multigenanalyse als Kombination von Vertretern aus Zellzyklus und Apoptose, der Einzelgenanalyse zur Prognoseabschätzung beim Ovarialkarzinom deutlich überlegen ist. Diese Aussage steht im Einklang mit Untersuchungsergebnissen anderer Karzinome [94,31]. Die kombinierte Messung von p21<sup>Cip/WAF-1</sup> und Bax bzw. Bok gibt dabei einen Hinweis auf eventuell vorbestehende p21-regulierte Apoptosedefekte, die zu einer Störung von Zellzykluscheckpunkten und konsekutiv zur Chemotherapieresistenz führen könnten. Hinsichtlich erworbener Apoptosedefekte durch Selektionsdruck unter Tumorthherapie ist eine dynamische Analyse der Regulatorgene innerhalb diesen Zeitraums sinnvoll.

Multigenanalysen komplettieren das Verständnis der Tumorbiologie. Sie ersetzen jedoch in der medizinischen Praxis nicht den Stellenwert der postoperativen Tumorfreiheit und erhöhen bis heute nicht den prädiktiven Wert. Erst ein noch besseres Verständnis der molekularbiologischen Zusammenhänge wird die Voraussetzung für den Einsatz von Multigenanalysen als Prognose- und Therapieinstrument schaffen. Aktueller Schwerpunkt von Analysen sind daher die BH3-only Proteine in Relation zur Funktion von Bax und Bok. Es ist sinnvoll, dass zukünftige Arbeiten beim Verständnis der Rb-Signalwegkomponenten in Relation zur Funktion von Apoptosekontrollgenen ansetzen. Im Zuge dessen ist auch mit einem besseren Verständnis von Chemotherapieresistenzen und Auftreten von Rezidiven beim Ovarialkarzinom zu rechnen. Während die Therapigestaltung durch Multigenanalysen individueller wird, werden sich der medizinischen Praxis hierdurch neue Perspektiven zur Behandlung, Prognose-Abschätzung und Prädiktion eines Therapiererfolgs von Ovarialkarzinomen eröffnen.

## 6 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist aufgrund seiner meist späten Diagnosestellung und einer hohen Rezidivquote einer der gefährlichsten Tumorerkrankungen bei Frauen. Bis heute gelingt es nicht, zuverlässige Aussagen über den individuellen Krankheitsverlauf zu treffen und den Patientinnen ein darauf abgestimmtes Therapieangebot zu machen.

Die Methoden der Molekulardiagnostik versprechen verbesserte Prognoseabschätzung und Hilfe bei Therapieentscheidungen. Die vorliegende Arbeit soll dazu einen Beitrag leisten. Mit Hilfe immunhistochemischer Analysen und Genanalysen wurden Tumorproben hinsichtlich ihrer Genexpression bzw. Mutation zentraler Apoptose- und Zellzyklusregulatoren untersucht. Die Ergebnisse wurden in einer retrospektiven Analyse klinischen Daten gegenübergestellt und mit statistischen Methoden auf signifikante Korrelationen hin untersucht.

Es zeigte sich im Wesentlichen, dass ein Verlust der pro-apoptotischen Multidomänproteine Bax und Bok, nicht jedoch des homologen Bak, prognostisch relevant wird, sobald der Zellzyklusregulator p21<sup>Cip/WAF-1</sup> aktiviert ist. Apoptosedefekte werden hier offensichtlich erst ausschlaggebend, wenn zentrale Zellzykluscheckpunkte aktiviert sind. Die gemeinsame Analyse von p21<sup>Cip/WAF-1</sup> mit Bax und Bok ermöglicht daher eine bessere Prognoseabschätzung. Desweiteren fand sich eine bessere Prognose, wenn eine intakte Koexpression der CDK Inhibitoren p16<sup>INK4a</sup> und p21<sup>Cip/WAF-1</sup> vorlag. Die Analyse des p53-Mutationsstatus ergab jedoch in der monogenetischen Analyse kein signifikantes Ergebnis hinsichtlich der Prognose.

Diese Resultate der Untersuchungen von Zellzyklusregulatoren des Rb-Signalwegs und Apoptoseregulatoren des p53-Signalwegs legen nahe, dass molekulardiagnostische Methoden nur dann einen Beitrag zur Prognose des Ovarialkarzinoms leisten, wenn das Zusammenwirken mehrerer molekularer Marker betrachtet wird. Die zugrundeliegenden Multigenanalysen ermöglichen, bei Vorliegen bestimmter Genexpressionsprofile, hochsignifikante Schätzungen zur erwarteten Überlebensdauer zu treffen. Mit Einzelgenanalysen, die den Schwerpunkt früherer molekulardiagnostischer Arbeiten bildeten, ließen sich dagegen keine derart signifikanten Prognosen zur Überlebensdauer stellen.

Diese Arbeit unterstreicht damit die Komplexität der Wechselwirkungen in der Tumorbiologie. Zugleich werden die Potentiale der Molekulardiagnostik für die Prognose des Ovarialkarzinoms deutlich.

## 7 Literatur

- [1] Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes & Development* 2003 Oktober 15; 17(20): 2481-95.
- [2] Baekelandt M, Holm R, Nesland JM, et al. Expression of apoptosis-related proteins is an independent determinant of patient prognosis in advanced ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2000 November 15; 18(22): 3775-81.
- [3] Baker TR, Piver MS. Etiology, biology, and epidemiology of ovarian cancer. *Seminars in Surgical Oncology* 1994 Juli-August; 10(4): 242-8.
- [4] Balan KV, Sitaras NM, Dimas K, et al. Differential susceptibility to etoposide in clones derived from a human ovarian cancer cell line. *Chemotherapy* 2006; 52(3): 137-46 (elektronische Veröffentlichung 2006 April 26).
- [5] Bertz J, Giersiepen K, Haberland J, et al. Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends. Hrsg: Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 5. Ausgabe, Saarbrücken, 2006.
- [6] Boulaire J, Fotedar A, Fotedar R. The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21<sup>WAF1</sup>. *Pathologie-Biologie (Paris)* 2000 April; 48(3): 190-202.
- [7] Brinton LA, Moghissi KS, Scoccia B, et al. Ovulation induction and cancer risk. *Fertility and Sterility* 2005 Februar; 83(2): 261-74; 525-6.
- [8] Brinton LA, Gridley G, Persson I, et al. Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1997 März; 176(3): 572-9.
- [9] Cao M, Wang T, Ye R, Helmann JD. Antibiotics that inhibit cell wall biosynthesis induce expression of the *Bacillus subtilis* sigma(W) and sigma(M) regulons. *Molecular Microbiology* 2002 September; 45(5): 1267-76.
- [10] Chan TA, Hwang PM, Hermeking H, et al. Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint. *Genes & Development* 2000 Juli 1; 14(13): 1584-8.
- [11] Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, et al. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* 2003 Juli 25; 301(5632): 513-7.
- [12] Cheng EH, Wei MC, Weiler S, et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell* 2001 September; 8(3): 705-11.
- [13] Concin N, Hofstetter G, Berger A, et al. Clinical relevance of dominant-negative p73 isoforms for responsiveness to chemotherapy and survival in ovarian cancer: evidence for a crucial p53-p73 cross-talk in vivo. *Clinical Cancer Research* 2005 Dezember 1; 11(23): 8372-83.

- [14] Concin N, Stimpfl M, Zeillinger C, et al. Role of p53 in G2/M cell cycle arrest and apoptosis in response to gamma-irradiation in ovarian carcinoma cell lines. *International Journal of Oncology* 2003 Januar; 22(1): 51-7.
- [15] Concin N, Zeillinger C, Stimpfel M, et al. P53-dependent radioresistance in ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Letters* 2000 März 31; 150(2): 191-9.
- [16] Daly M, Orams GI. Epidemiology and risk assessment for ovarian cancer. *Seminars in Oncology* 1998 Juni; 25(3): 255-64.
- [17] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004 Januar 23; 116(2): 205-19.
- [18] Daniel PT. Zellzyklus und Apoptose. In: Ganten, Ruckpaul (Hrsg.): *Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien*. Berlin: Springer Verlag, 2003, 130-184.
- [19] Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Belka C, et al. Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays in Biochemistry*, 2003; 39: 73-88.
- [20] De Feudis P, Vignati S, Rossi C, et al. Driving p53 response to Bax activation greatly enhances sensitivity to taxol by inducing massive apoptosis. *Neoplasia* 2000 Mai-Juni; 2(3): 202-7.
- [21] de Graeff P, Hall J, Crijns AP, et al. Factors influencing p53 expression in ovarian cancer as a biomarker of clinical outcome in multicentre studies. *British Journal of Cancer*, 2006 August 1 (elektronische Veröffentlichung vor der Print-Ausgabe).
- [22] Dose J, Jänicke F. Adnexe. In: Kaufmann M, Costa S, Scharl A (Hrsg.) *Die Gynäkologie*. Berlin: Springer Verlag, 2002, 439-478.
- [23] Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000 Juli 7; 102(1): 33-42.
- [24] Ekholm SV, Reed SI. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology* 2000 Dezember; 12(6): 676-84.
- [25] Friedlander P, Haupt Y, Prives C, et al. A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 1996 September; 16(9): 4961-71.
- [26] Friedrich K, Wieder T, Von Haefen C, et al. Overexpression of caspase-3 restores sensitivity for drug-induced apoptosis in breast cancer cell lines with acquired drug resistance. *Oncogene*. 2001 Mai 17; 20(22): 2749-60.
- [27] Gadducci A, Di Cristofano C, Zavaglia M, et al. P53 gene status in patients with advanced serous epithelial ovarian cancer in relation to response to paclitaxel- plus platinum-based chemotherapy and long-term clinical outcome. *Anticancer Research* 2006 Januar-Februar; 26(1B): 687-93.

- [28] Gillett CE, Barnes DM. Demystified cell cycle. *Molecular Pathology* 1998 Dezember; 51(6): 310-6.
- [29] Goodman MT, Howe HL. Descriptive epidemiology of ovarian cancer in the United States, 1992-1997. *Cancer* 2003 Mai 15; 97(10 Suppl): 2615-30.
- [30] Grana X, Garriga J, Mayol X. Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene* 1998 Dezember 24; 17(25): 3365-83.
- [31] Güner D. Deregulation von Zellzyklus und Apoptose beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. Dissertation. Humboldt-Universität Berlin 2003.
- [32] Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001 Mai 17; 411(6835): 366-74.
- [33] Hardwick RH, Barham CP, Ozua P, et al. Immunohistochemical detection of p53 and c-erbB-2 in oesophageal carcinoma; no correlation with prognosis. *European Journal of Surgical Oncology* 1997 Februar; 23(1): 30-5.
- [34] Hsu SY, Hsueh AJ. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. *Physiological Reviews* 2000 April; 80(2): 593-614.
- [35] Hsu SY, Kaipia A, McGee E, et al. Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997 November 11; 94(23): 12401-6.
- [36] Hsu YT, Youle RJ. Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *The Journal of Biological Chemistry* 1997 Mai 23; 272(21): 13829-34.
- [37] Huang DC, Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 2000 Dezember 8; 103(6): 839-42.
- [38] Huang X, Lin T, Gu J, et al. Combined TRAIL and Bax gene therapy prolonged survival in mice with ovarian cancer xenograft. *Gene Therapy* 2002 Oktober; 9(20): 1379-86.
- [39] Ikeda G, Isaji S, Chandra B, et al. Prognostic significance of biologic factors in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1999 Oktober 15; 86(8): 1396-405.
- [40] Johnson DG, Schneider-Broussard R. Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Frontiers in Bioscience. A Journal and virtual library* 1998 April 27; 3: d447-8.
- [41] Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1999; 39: 295-312.
- [42] Kannan K, Kaminski N, Rechavi G, et al. DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene* 2001 Juni 7; 20(26): 3449-55.

- [43] Kaufmann N, Costa S, Schmid H, et al. Empfehlung für eine standardisierte Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum Heidelberg/ Mannheim. <http://www.dkfz-heidelberg.de> , gelesen im August 2006.
- [44] Keyomarsi K, Herliczek TW: The role of cyclin E in cell proliferation, development and cancer. *Progress in Cell Cycle Research* 1997; 3: 171-91.
- [45] Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine* 2000 Mai; 6(5): 513-9.
- [46] Kupryjanczyk J, Szymanska T, Madry R, et al. Evaluation of clinical significance of TP53, BCL-2, BAX and MEK1 expression in 229 ovarian carcinomas treated with platinum-based regimen. *British Journal of Cancer* 2003 März 24; 88(6): 848-54.
- [47] Lage H, Dietel M. Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 1999; 125(3-4): 156-65.
- [48] Lam KY, Tsao SW, Zhang D, et al. Prevalence and predictive value of p53 mutation in patients with oesophageal squamous cell carcinomas: a prospective clinico-pathological study and survival analysis of 70 patients. *International Journal of Cancer* 1997 April 22; 74(2): 212-9.
- [49] Li A, Blow JJ. The origin of CDK regulation. *Nature Cell Biology* 2001 August; 3(8): E182-4.
- [50] Lindsten T, Ross AJ, King A, et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Molecular Cell* 2000 Dezember; 6(6): 1389-99.
- [51] Malumbres M, Pellicer A. RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Frontiers in Bioscience. A Journal and virtual library* 1998 August 6;3: d887-912
- [52] Matsumoto Y, Ishiko O, Deguchi M, et al. Cyclooxygenase-2 expression in normal ovaries and epithelial ovarian neoplasms. *International Journal of Molecular Medicine*. 2001 Juli; 8(1): 31-6.
- [53] May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999 Dezember 13; 18(53): 7621-36.
- [54] McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 1991 Januar 17; 349(6306): 254-6.
- [55] Meden H Ovarialkarzinom: Aktuelle Aspekte zur Diagnostik und Therapie in Klinik und Praxis. Berlin New York: de GruyterVerlag, 1996.
- [56] Milde-Langosch K, Hagen M, Bamberger AM, et al. Expression and prognostic value of the cell-cycle regulatory proteins, Rb, p16<sup>MTS1</sup>, p21<sup>WAF1</sup>, p27<sup>KIP1</sup>, cyclin E, and cyclin D2, in ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Pathology* 2003 April; 22(2): 168-74.



- [57] Modesitt SC, van Nagell JR. The impact of obesity on the incidence and treatment of gynecologic cancers: a review. *Obstetrical & Gynecological Survey* 2005 Oktober; 60(10): 683-92.
- [58] Morari EC, Lima AB, Bufalo NE, et al. Role of glutathione-S-transferase and codon 72 of P53 genotypes in epithelial ovarian cancer patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2006 Mai 19 (elektronische Veröffentlichung vor der Printausgabe).
- [59] Motwani M, Delohery TM, Schwartz GK. Sequential dependent enhancement of caspase activation and apoptosis by flavopiridol on paclitaxel-treated human gastric and breast cancer cells. *Clinical Cancer Research* 1999 Juli; 5(7): 1876-83.
- [60] Mrozek A, Petrowsky H, Sturm I, et al. Combined p53/Bax mutation results in extremely poor prognosis in gastric carcinoma with low microsatellite instability. *Cell Death and Differentiation* 2003 April; 10(4): 461-7.
- [61] Muller H, Bracken AP, Vernell R, et al. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes & Development* 2001 Februar 1; 15(3): 267-85.
- [62] Ness RB, Cottreau C. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 1999 September 1; 91(17): 1459-67.
- [63] N.N.: Epidemiologisches Krebsregister Saarland. <http://www.krebsregister.saarland.de/>, gelesen im Juli 2006.
- [64] N.N.: FIGO Cancer Committee: Staging Announcement. In: *Gynecologic Oncology*, 1986; 25: 383.
- [65] N.N.: Maligne Ovarialtumoren. Deutsche Krebsgesellschaft, 2005, <http://www.awmf-online.de/>, gelesen im Juli 2006.
- [66] N.N.: Ovarialkarzinom: Ergebnisse der Qualitätssicherungserhebung der AGO. In: *Journal Onkologie*, 2004 Januar 8; Zeitschrift online – Ausgabe 05-03, <http://www.journalonko.de/aktuellview>, gelesen im Juli 2006.
- [67] Ott HW, Illmensee K, Zeimet A, et al. The evaluation of the second-look operation of patients with ovarian carcinoma and tubal carcinoma by means of a retrospective comparison study. *Gynäkologisch-Geburtshilfliche Rundschau* 2002; 42(4): 217-24.
- [68] Packham G. Mutation of BCL-2 Family Proteins in Cancer. *Apoptosis* 1998 März; 3(2): 75-82.
- [69] Pavletich NP. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, 1999 April 16; 287(5): 821-8.
- [70] Peters JM. Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex. *Experimental Cell Research* 1999 Mai 1; 248(2): 339-49.

- [71] Pomp J, Davelaar J, Blom J, et al. Radiotherapy for oesophagus carcinoma: the impact of p53 on treatment outcome. *Radiotherapy and Oncology* 1998 Februar; 46(2): 179-84.
- [72] Post PN, Casparie MK, Blaauwgeers JL, et al. Reduced risk of ovarian cancer after hysterectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005 Oktober; 84(10): 1024; author reply 1024-5.
- [73] Prokop A, Wieder T, Sturm I, et al. Relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with a decrease of the Bax/Bcl-2 ratio and loss of spontaneous caspase-3 processing in vivo. *Leukemia* 2000 September; 14(9): 1606-13.
- [74] Radetzki S, Kohne CH, von Haefen C, et al. The apoptosis promoting Bcl-2 homologues Bak and Nbk/Bik overcome drug resistance in Mdr-1-negative and Mdr-1-overexpressing breast cancer cell lines. *Oncogene*. 2002 Januar 10; 21(2): 227-38.
- [75] Ramirez PT, Gershenson DM, Tortolero-Luna G, et al. Expression of cell-cycle mediators in ovarian cancer cells after transfection with p16<sup>(INK4a)</sup>, p21<sup>(WAF1/Cip-1)</sup>, and p53. *Gynecologic Oncology* 2001 Dezember; 83(3): 543-8.
- [76] Rau B, Sturm I, Lage H, et al. Dynamic expression profile of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and Ki-67 predicts survival in rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 2003 September 15; 21(18): 3391-401 (elektronische Veröffentlichung 2003 Juli 28).
- [77] Rhind N, Russell P. Roles of the mitotic inhibitors Wee1 and Mik1 in the G(2) DNA damage and replication checkpoints. *Molecular and Cellular Biology* 2001 März; 21(5): 1499-508.
- [78] Risch HA, Howe GR. Pelvic inflammatory disease and the risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1995 Juli-August; 4(5): 447-51.
- [79] Robert F, Blumenschein G, Herbst RS, et al. Phase I/IIa study of cetuximab with gemcitabine plus carboplatin in patients with chemotherapy-naive advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2005 Dezember 20; 23(36): 9089-96. (elektronische Veröffentlichung 2005 November 21).
- [80] Rose SL, Goodheart MJ, DeYoung BR, Smith BJ, Buller RE: P21 expression predicts outcome in p53-null ovarian carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 2003 März; 9(3): 1028-32.
- [81] Rosen DG, Wang L, Jain AN, et al. Expression of the tumor suppressor gene ARHI in epithelial ovarian cancer is associated with increased expression of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and prolonged progression-free survival. *Clinical Cancer Research* 2004 Oktober 1; 10(19): 6559-66.
- [82] Roussel MF. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 1999 September 20; 18(38): 5311-7.
- [83] Russell P. Checkpoints on the road to mitosis. *Trends in Biochemical Sciences*, 1998 Oktober; 23(10): 399-402.

- [84] Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *The EMBO Journal* 1999 April 15; 18(8): 2040-8.
- [85] Samimi G, Fink D, Varki NM, et al. Analysis of MLH1 and MSH2 expression in ovarian cancer before and after platinum drug-based chemotherapy. *Clinical Cancer Research* 2000 April; 6(4): 1415-21.
- [86] Santos AM, Sousa H, Pinto D, et al. Linking TP53 codon 72 and P21 nt590 genotypes to the development of cervical and ovarian cancer. *European Journal of Cancer* 2006 Mai; 42(7): 958-63 (elektronische Veröffentlichung 2006 März 20).
- [87] Santos AM, Sousa H, Portela C, et al. TP53 and P21 polymorphisms: response to cisplatin/paclitaxel-based chemotherapy in ovarian cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006 Februar 3; 340(1): 256-62 (elektronische Veröffentlichung 2005 Dezember 9).
- [88] Schelwies K, Sturm I, Grabowski P, et al. Analysis of p53/BAX in primary colorectal carcinoma: low BAX protein expression is a negative prognostic factor in UICC stage III tumors. *International Journal of Cancer* 2002 Juni 1; 99(4): 589-96.
- [89] Schuyer M, van der Burg ME, Henzen-Logmans SC, et al. Reduced expression of BAX is associated with poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer: a multifactorial analysis of TP53, p21, BAX and BCL-2. *British Journal of Cancer* 2001 November 2; 85(9): 1359-67.
- [90] Shigemasa K, Katoh O, Shiroyama Y, et al. Increased MCL-1 expression is associated with poor prognosis in ovarian carcinomas. *Japanese Journal of Cancer Research* 2002 Mai; 93(5): 542-50.
- [91] Shigemasa K, Tian X, Gu L, Shiroyama Y, Nagai N, Ohama K. Expression of cyclooxygenase-2 and its relationship to p53 accumulation in ovarian adenocarcinomas. *International Journal of Oncology* 2003 Januar; 22(1): 99-105.
- [92] Skirnisdottir I, Sorbe B, Seidal T. P53, bcl-2, and bax: their relationship and effect on prognosis in early stage epithelial ovarian carcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2001 März-April; 11(2): 147-58.
- [93] Sturm I, Bosanquet AG, Hermann S, Guner D, Dorken B, Daniel PT. Mutation of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DNA-damaging chemotherapy. *Cell Death and Differentiation* 2003 April; 10(4): 477-84.
- [94] Sturm I, Kohne CH, Wolff G, et al. Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *Journal of Clinical Oncology* 1999 Mai; 17(5): 1364-74.
- [95] Sturm I, Papadopoulos S, Hillebrand T, et al. Impaired BAX protein expression in breast cancer: mutational analysis of the BAX and the p53 gene. *International Journal of Cancer* 2000 August 15; 87(4): 517-21.

- [96] Sturm I, Petrowsky H, Volz R, et al. Analysis of p53/BAX/p16<sup>(ink4a/CDKN2)</sup> in esophageal squamous cell carcinoma: high BAX and p16<sup>(ink4a/CDKN2)</sup> identifies patients with good prognosis. *Journal of Clinical Oncology* 2001 April 15; 19(8): 2272-81.
- [97] Sturm I, Rau B, Schlag PM, et al. Genetic dissection of apoptosis and cell cycle control in response of colorectal cancer treated with preoperative radiochemotherapy. *BMC Cancer* 2006 Mai 10; 6: 124.
- [98] Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999 Februar 4; 397(6718): 441-6.
- [99] Tai YT, Lee S, Niloff E, Weisman C, Strobel T, Cannistra SA. BAX protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1998 August; 16(8): 2583-90.
- [100] Tai YT, Strobel T, Kufe D, Cannistra SA. In vivo cytotoxicity of ovarian cancer cells through tumor-selective expression of the BAX gene. *Cancer Research* 1999 Mai 1; 59(9): 2121-6.
- [101] Tamrakar S, Rubin E, Ludlow JW. Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation. *Frontiers in Bioscience: A Journal and virtual library* 2000 Januar 1;5: D121-37.
- [102] Tang L, Wang M, Ma J. Relationship between cyclooxygenase-2 protein expression, prostaglandins levels and biologic behavior in ovarian carcinoma tissue. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2002 November; 37(11): 687-90.
- [103] Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001 April 5; 20(15): 1803-15.
- [104] Teyssier F, Bay JO, Dionet C, Verrelle P. Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation. *Bulletin du Cancer* 1999 April; 86(4): 345-57.
- [105] Tomov S, Popovska S, Veselinova T, Gorchev G, Velkova A: Immunohistochemical analysis of epidermal growth factor receptors expression in malignant ovarian tumors. *Akusherstvo Ginekologija (Sofia)* 2005; 44 Suppl 2: 42-7.
- [106] Trimbos JB, van der Burg ME. Adjuvant chemotherapy in patients operated on for early ovarian carcinoma. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde* 2004 Mai 1; 148(18): 874-8.
- [107] van der Burg ME. Advanced ovarian cancer. *Current Treatment Options in Oncology*, 2001 April; 2(2): 109-18.
- [108] Vassilopoulos I, Korkolopoulou P, Konstantinidou AE, et al. Evaluation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21<sup>Cip1</sup> in epithelial ovarian tumors of low malignant potential and adenocarcinomas. *Histology and Histopathology* 2003 Juli; 18(3): 761-70.

- [109] Viallard JF, Lacombe F, Belloc F, Pellegrin JL, Reiffers J. Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology. *Cancer Radiotherapie: Journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique* 2001 April; 5(2): 109-29.
- [110] von Haefen C, Wieder T, Gillissen B, et al. Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene* 2002 Juni 6; 21(25): 4009-19.
- [111] Wang K, Gross A, Waksman G, Korsmeyer SJ. Mutagenesis of the BH3 domain of BAX identifies residues critical for dimerization and killing. *Molecular and Cellular Biology* 1998 Oktober; 18(10): 6083-9.
- [112] Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, et al. TBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes & Development* 2000 August 15; 14(16): 2060-71.
- [113] Wen SF, Mahavni V, Quijano E, et al. Assessment of p53 gene transfer and biological activities in a clinical study of adenovirus-p53 gene therapy for recurrent ovarian cancer. *Cancer Gene Therapy* 2003 März; 10(3): 224-38.
- [114] Wendt J, Radetzki S, von Haefen C, et al. Induction of p21<sup>Cip/WAF-1</sup> and G2 arrest by ionizing irradiation impedes caspase-3-mediated apoptosis in human carcinoma cells. *Oncogene* 2006 Februar 16; 25(7): 972-80.
- [115] Willis SN, Chen L, Dewson G, et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes & Development* 2005 Juni 1; 19(11): 1294-305 (elektronische Veröffentlichung 2005 März 18).
- [116] Wu Q, Kirschmeier P, Hockenberry T, et al. Transcriptional regulation during p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-induced apoptosis in human ovarian cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2002 September 27; 277(39): 36329-37 (elektronische Veröffentlichung 2002 Juli 22).
- [117] Wyllie AH, Bellamy CO, Bubb VJ, et al. Apoptosis and carcinogenesis. *British Journal of Cancer* 1999 Juli; 80 Suppl 1: 34-7.
- [118] Xiang J, Gomez-Navarro J, Arafat W, et al. Pro-apoptotic treatment with an adenovirus encoding Bax enhances the effect of chemotherapy in ovarian cancer. *The Journal of Gene Medicine* 2000 März-April; 2(2): 97-106.
- [119] Yan XJ, Liang LZ, Li DC, Li JL, Zhang CQ, Yuan SH. Expression of p21<sup>(WAF1)</sup> and its relationship with p53 and PCNA protein in epithelial ovarian cancer. *Ai Zheng* 2004 Januar; 23(1): 74-80.
- [120] Zhao XD, Zhang Y, He SR, Yang L. Predictive value of p53 expression in selecting first-line chemotherapy regimen for advanced epithelial ovarian carcinoma. *Ai Zheng* 2005 Dezember; 24(12): 1542-5.

- [121] Zhou BB, Chatuvedi P, Spring K, et al. Caffeine abolishes the mammalian G(2)/M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-telangiectasia-mutated kinase activity. *The Journal of Biological Chemistry* 2000 April 7; 275(14): 10342-8.
- [122] Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, Thompson CB. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 2003 Juli 7; 162(1): 59-69.

## Abkürzungen

ACTION	Adjuvant Chemotherapy In Ovarian Neoplasm
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
AIF	Apoptosis Inducing Factor
APAF-1	Apoptotic Protease Activating Factor - 1
ATP	Adenosin Tri-Phosphat
AUC	Area Under Curve (Fläche unter der Konzentration-Zeit-Kurve)
Bax	Bcl-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma gene 2
Bcl-x <sub>L</sub>	lange Spleissvariante des Bcl-x Proteins
BH	Bcl-2 Homologie
Bok	Bcl-2 related Ovarian Killer
BRCA	Breast Cancer Antigene
BSO	Bilaterale Salpingoophoroektomie
CARD	Caspase Rekrutierungs Domäne
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CDKI	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor
CED	C Elegans Death (Gene)
CHT	Chemotherapie
CR	Complete Remission
CT	Computertomogramm
DD	Death-Domain
DED	Death Effector Domain
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
EGF	Epidermal Growth Factor
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ER	Endoplasmatic Reticulum
FADD	FAS-Associated Death Domain
FI	Färbeindex
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et Obstetriques
FLIP <sub>L</sub>	Long Splice Variant of Fas-Linked Inhibitory Protein
FLIP <sub>S</sub>	Short Splice Variant of Fas-Linked Inhibitory Protein

---

GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
G-Phase	Gap-Phase
hMSH	human MutS Homolog
HRT	Hormone Replacement Therapy
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICON	International Collaboration In Ovarian Neoplasm
INK4	Inhibiert CDK4
ISTO	Informationszentrum für Standards in der Onkologie
LMP	Low Malignant Potential
LNE	Lymphknotenexstirpation
MAP	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MDM	Murine Double Minute
M-Phase	Mitose-Phase
MRT	Magnetresonanztomogramm
PCR	Polymerase Chain Reaction
pCR	pathological Complete Remission
PET	Positronen Emissions-Tomographie
PID	Pelvic Inflammatory Disease
PR	Partielle Remission
pRb	Rb-Protein
PS	Peritoneales Sampling
Rb	Retinoblastomprotein
SMAC	Second Mitochondrial Activator of Caspases
SOD	Silencer Of Death Domain
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
SLO	Second Look Operation
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TAH	Transabdominale Hysterektomie
TBS	Tris-Buffered Saline
TF	Transkriptionsfaktor
TNM	Tumor-Nodus-Metastase
TVS	Transvaginaler Ultraschall
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UPR	Unfolded Protein Response
USO	Unilaterale Salpingoophoroektomie



VDAC      Voltage-Dependent Anion Channel

## **Erklärung an Eides Statt**

Ich, Natascha Engel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Deregulation von Zellzyklus und Apoptose beim Ovarialkarzinom“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen aus der elektronischen Version entfernt.