

Aus der Klinik für Gynäkologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle des epithelialen Markers EpCAM beim Ovarialkarzinom  
und  
hyperkalzämische Ovarialkarzinome

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hannah Woopen  
aus Bad Mergentheim

Datum der Promotion: 04.09.2015

## **Inhaltsverzeichnis**

Abstrakt Deutsch.....	2
Abstrakt Englisch.....	3
Einführung.....	4
Methodik.....	6
Immunhistochemie.....	7
Evaluierung der EpCAM-Expression.....	8
Nachsorge.....	8
Statistische Analyse.....	8
Ergebnisse.....	9
Diskussion.....	15
Literaturverzeichnis.....	19
Eidesstattliche Versicherung.....	21
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	22
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen.....	24
Publikation 1.....	24
Publikation 2.....	33
Publikation 3.....	40
Lebenslauf.....	46
Publikationsliste.....	52
Danksagung.....	54

## Abstrakt Deutsch

**Einleitung:** Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM ist auf Karzinomen, wie z.B. Ovarialkarzinomen, überexprimiert. Es wurde als Prognosemarker bei Mammakarzinomen identifiziert, die prognostische Bedeutung bei Ovarialkarzinomen ist jedoch weitgehend unbekannt. Zunächst wurde EpCAM daher als potentieller Prognosemarker untersucht. Darüber hinaus wurde analysiert, ob EpCAM auch im Verlauf der Erkrankung überexprimiert wird, da EpCAM-spezifische Therapien im Rezidiv eingesetzt werden, die Expression in der Rezidivsituation jedoch unzureichend geklärt ist. Weiterhin wurde die Erfahrung unserer Klinik mit dem sehr seltenen hyperkalzämischen Ovarialkarzinom evaluiert. **Methodik:** Klinische Daten und Tumorgewebe wurden innerhalb des Projektes „Tumor Bank Ovarian Cancer“ gesammelt. Die EpCAM-Expression wurde mithilfe der Avidin-Biotin-Komplex-Methode immunhistochemisch untersucht. EpCAM-Überexpression wurde definiert als Anfärbung von 76-100 % der Tumorzellen. Für die Evaluation der hyperkalzämischen Ovarialkarzinome wurden Therapie und Verlauf der Patientinnen analysiert, die am Europäischen Kompetenzzentrum für Eierstockkrebs behandelt wurden. **Ergebnisse:** In der Untersuchung von EpCAM als Prognosemarker zeigten 65 von 74 eingeschlossenen Patientinnen eine EpCAM-Überexpression. Mit dem progressionsfreien Überleben und dem Ansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie korrelierte die Überexpression von EpCAM signifikant ( $p=0,040$  und  $p=0,048$ ). EpCAM wurde zudem als unabhängiger Marker für das Gesamtüberleben identifiziert ( $p=0,022$ ). Für die Analyse der EpCAM-Expression in der Rezidiv- im Vergleich zur Primärsituation wurden 19 Patientinnen identifiziert. EpCAM war in 89 % in der Primär- und in 84 % in der Rezidivsituation überexprimiert. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der EpCAM-Expression im Verlauf der Erkrankung gefunden werden ( $p=1.0$ ). Vier Patientinnen mit hyperkalzämischem Ovarialkarzinom konnten in die Analyse eingeschlossen werden. Alle wurden operiert, drei fertilitätserhaltend, und erhielten eine adjuvante Chemotherapie. Drei der Patientinnen leben rezidivfrei während einer medianen Nachbeobachtungszeit von 22 Monaten (Range: 8-47), während eine Patientin 15 Monate nach Diagnosestellung verstarb. **Schlussfolgerung:** Wir konnten zeigen, dass eine EpCAM-Überexpression mit einem signifikant besseren Überleben beim Ovarialkarzinom assoziiert ist. Dies muss nun in größeren Studien bestätigt werden, um EpCAM als Prognosemarker etablieren zu können. Unsere Ergebnisse hinsichtlich der stabilen Expression von EpCAM auch im Verlauf der Erkrankung unterstützen den Einsatz EpCAM-spezifischer Therapien in der Rezidivsituation. In frühen Stadien des hyperkalzämischen Ovarialkarzinoms kann eine fertilitätserhaltende Operation in Betracht

gezogen werden. Für definitive Therapieempfehlungen sind höhere Fallzahlen und die Einrichtung von Registern nötig.

## **Abstrakt Englisch**

**Introduction:** The epithelial cell adhesion molecule EpCAM is overexpressed by many carcinomas such as ovarian cancer. It was identified as prognostic marker e.g. in breast cancer; its prognostic significance in ovarian cancer is not clear. Initially, EpCAM was investigated as prognostic marker in ovarian cancer. Furthermore, it was analyzed if EpCAM is also overexpressed throughout the disease, because EpCAM-targeted therapies are used in recurrent ovarian cancer although EpCAM expression has not been studied sufficiently in recurrent disease. Moreover, the experience of our hospital with the very rare small cell ovarian cancer of the hypercalcemic type (OSCCHT) was evaluated. **Methods:** Clinical data and tissues were collected within the project “Tumor Bank Ovarian Cancer”. EpCAM expression was assessed by immunohistochemistry using the avidin biotin complex method. EpCAM overexpression was defined as 76-100 % of tumor cells being positively stained for EpCAM. Treatment and clinical course were evaluated in patients with OSCCHT who had been treated in the European Competence Center for Ovarian Cancer. **Results:** In our investigation of EpCAM as prognostic marker EpCAM was overexpressed in 65 out of 74 included patients. EpCAM overexpression was associated with better progression free survival and response to platinum based chemotherapy ( $p=0.040$  and  $p=0.048$ ). Moreover, EpCAM was identified as independent marker for overall survival ( $p=0.022$ ). The analysis of EpCAM expression in the course of the disease involved 19 patients with both primary and corresponding recurrent tumor tissue. EpCAM overexpression was noted in 89 % in the primary and in 84 % in the recurrent situation without any significant change of expression throughout the disease ( $p=1.0$ ). Four patients with OSCCHT were identified. All underwent surgery, in three cases fertility-sparing, and all received adjuvant chemotherapy. One patient died 15 months after initial diagnosis while three patients are alive without relapse in a median follow-up time of 22 months (range: 8-47). **Conclusion:** EpCAM overexpression was associated with significant better survival in ovarian cancer. To establish EpCAM as prognostic marker, larger studies are warranted. Our results, that show a stable expression pattern of EpCAM throughout the course of the disease, support the use of EpCAM targeted therapy in recurrent ovarian cancer. In early stages of OSCCHT fertility-sparing surgery can be considered; more cases should be evaluated for definite therapeutic recommendations.

## Einführung

Das Ovarialkarzinom stellt das fünfthäufigste Malignom der Frauen in Europa dar; in Deutschland werden jährlich etwa 8.000 Neuerkrankungen diagnostiziert. Die meisten Frauen erkranken zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr. Aufgrund seiner schlechten Prognose liegt es in der Mortalitätsstatistik der gynäkologischen Malignome auf dem ersten Platz. Diese schlechte Prognose liegt zum einen an fehlenden Screeningverfahren, zum anderen an den typischerweise erst spät im Krankheitsverlauf auftretenden Symptomen, wie z. B. Bauchumfangszunahme aufgrund von Aszites. Dies sind auch die beiden Gründe, warum sich mehr als zwei Drittel der Patientinnen bereits bei der Erstdiagnose in den fortgeschrittenen Stadien (FIGO III und IV<sup>\*</sup>) befinden.<sup>1</sup> Histologisch unterscheidet man seröse (low grade, high grade), muzinöse, endometrioidale, klarzellige und transitionalzellige Ovarialkarzinome. Die serös-papillären stellen mit 75 % den häufigsten histologischen Subtyp dar, gefolgt von muzinösen und endometrioiden Ovarialkarzinomen in jeweils 10 % der Fälle.<sup>2</sup> Therapeutisch steht eine optimale zytoreduktive Chirurgie im Vordergrund (Tumordebulking).<sup>1,3</sup> Der maximale Durchmesser des postoperativ verbliebenen Tumordurchmessers gilt als der wichtigste Prognoseparameter und bestimmt das Gesamtüberleben maßgeblich.<sup>1,3</sup> Der postoperative Tumorrest wird eingeteilt in makroskopisch tumorfrei, Tumorrest < 1cm und Tumorrest ≥ 1cm. Adjuvant schließt sich eine Chemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel an bzw. in den Stadien ≥IIIB optional zusätzlich mit Bevacizumab.<sup>1,3</sup> Hinsichtlich des Ansprechens auf die platinhaltige Chemotherapie unterscheidet man zwischen Patientinnen, die innerhalb von sechs Monaten nach Ende der Chemotherapie ein Rezidiv entwickeln („platinresistent“), und Patientinnen, die erst nach den ersten sechs Monaten nach Chemotherapie erneut erkranken („platinresistent“). Diese Unterscheidung ist für die weitere Therapieplanung entscheidend und bestimmt maßgeblich den weiteren Krankheitsverlauf.<sup>3</sup> Trotz der verbesserten radikalen Therapie rezidivieren die meisten Ovarialkarzinome.<sup>1</sup>

Zielgerichtete Tumorthérapien haben in den letzten Jahren vielversprechende Ergebnisse gezeigt und werden intensiv beforscht, wie z.B. Bevacizumab, ein Inhibitor des vascular endothelial growth factor (VEGF), welcher 2012 für das Ovarialkarzinom zugelassen wurde. Auch das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) ist ein erfolgsversprechendes Ziel für neue zielgerichtete Therapien. Beispielsweise bindet der

---

\* Seit Januar 2014 existiert eine neue FIGO-Klassifikation. In dieser Arbeit findet die vorherige Klassifikation Verwendung, welche zum Zeitpunkt der Einreichung der ausgewählten Publikationen dem aktuellen Stand entsprach.

trifunktionale Antikörper Catumaxomab an EpCAM und kann das punktionsfreie Überleben bei Ovarialkarzinompatientinnen mit Aszites als vorherrschendem Symptom signifikant verlängern.<sup>4</sup> EpCAM wurde 1979 erstmals als Kolorektalkarzinom-spezifisches Antigen beschrieben und wird von den meisten Epithelien exprimiert. In den meisten Karzinomen hingegen wird EpCAM sogar überexprimiert.<sup>5</sup> Bellone et al. konnten zeigen, dass Ovarialkarzinome EpCAM signifikant höher exprimieren als normales Ovariepithel.<sup>6</sup> EpCAM ist ein Transmembranprotein, welches an der basolateralen Membran von Epithelien lokalisiert ist. Dieses Zelladhäsionsmolekül hat auf der einen Seite die Funktion der Zell-Zell-Adhäsion und der Stabilisierung des Zytoskeletts, auf der anderen Seite spielt EpCAM jedoch auch eine Rolle in der Karzinogenese, der Tumorzellproliferation und der Metastasierung.<sup>5,7</sup> Für EpCAM als Induktor des Tumorstadiums sprechen einige Überlebensdaten von Karzinomen. Zum Beispiel korreliert eine hohe Expression von EpCAM mit einem schlechten Überleben von Mamma- und Gallenblasenkarzinomen.<sup>7</sup> Im Gegensatz dazu ist jedoch eine EpCAM-Überexpression bei klarzelligen Nierenkarzinomen mit einer guten Prognose assoziiert.<sup>7</sup> Inwiefern sich eine hohe Expression von EpCAM bei Ovarialkarzinomen auf die Prognose auswirkt, ist noch nicht ausreichend erforscht. Bisher existieren hierzu nur zwei widersprüchliche Studien: Während Spizzo et al. eine Korrelation der EpCAM-Überexpression bei Ovarialkarzinomen mit einem schlechteren Gesamtüberleben fanden,<sup>8</sup> hatte eine EpCAM-Überexpression in einer Studie von Heinzlmann-Schwarz et al. keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben.<sup>9</sup> Bisher ungeklärt ist der Einfluss von EpCAM auf das operative Outcome und das Ansprechen auf Chemotherapie. In dieser Arbeit möchten wir EpCAM als möglichen Prognosemarker beim Ovarialkarzinom intensiver untersuchen. Der wichtigste prognostische Faktor beim Ovarialkarzinom ist der postoperativ verbleibende Tumorrest. Darüber hinaus sind das Ansprechen auf die platin-basierte Chemotherapie, FIGO-Stadium, der Differenzierungsgrad, das Alter der Patientinnen und der histologische Subtyp wichtige Prognosefaktoren.<sup>3</sup> Wir wollten zunächst evaluieren, ob eine EpCAM-Überexpression als Marker für das progressionsfreie und das Gesamtüberleben fungiert, unabhängig von den genannten Prognosefaktoren. Neben der Rolle von EpCAM als Marker für das Überleben wollten wir EpCAM als möglichen Marker für das Ansprechen auf die platinhaltige Chemotherapie und den postoperativen Tumorrest als wichtigsten Prognosefaktor untersuchen. Die Etablierung eines solchen Markers könnte helfen, den Krankheitsverlauf vorherzusagen und die Therapie individualisierter zu gestalten.

Ein Rezidiv entwickeln etwa 65 % der Patientinnen in den FIGO-Stadien III und IV.<sup>1</sup> In der Rezidivsituation rückt neben der Prognose vor allem die Lebensqualität in den Vordergrund.<sup>3</sup>

Diese wird im späteren Verlauf der Erkrankung oft entscheidend von den Symptomen des malignen Aszites, wie z. B. abdominellen Schmerzen und Übelkeit, beeinflusst. Das bisher einzige Medikament, welches für die Behandlung von punktionspflichtigem malignem Aszites bei Karzinomen zugelassen ist und welches den Aszites symptomatisch und kausal therapieren kann, ist der trifunktionale Antikörper Catumaxomab.<sup>4</sup> Die Wirkung dieses und anderer EpCAM-spezifischer Antikörper ist abhängig von der Expression von EpCAM. Es ist bekannt, dass EpCAM bei primären Ovarialkarzinomen überexprimiert ist, jedoch wird z. B. Catumaxomab eher im späteren Krankheitsverlauf, zum Teil nach vielen Rezidivtherapien, eingesetzt.<sup>5</sup> Inwiefern aber die Expression von EpCAM im Verlauf der Erkrankung stabil bleibt bzw. ob EpCAM in der Rezidivsituation ebenfalls überexprimiert ist, wurde bisher kaum untersucht. Weitere Ziele dieser Promotionsarbeit sind deshalb die Analyse der EpCAM Expression im Verlauf der Erkrankung vom Primärtumor zum Rezidiv und die Klärung der Frage, ob es zwischen diesen beiden Situationen zu einer Veränderung der Expression kommt. Dies könnte eine Veränderung der erwählten Therapierationale nach sich ziehen, da der späte Einsatz EpCAM-spezifischer Medikamente bei Veränderung der EpCAM-Expression im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf überdacht werden müsste.

Neben der Expression von EpCAM bei Ovarialkarzinomen wurden für diese Promotionsarbeit auch hyperkalzämische Ovarialkarzinome untersucht. Diese sehr aggressive Form des Ovarialkarzinoms wurde weltweit etwa 250 Mal beschrieben und betrifft vor allem Frauen im 20. bis 30. Lebensjahr.<sup>10</sup> Von den oben beschriebenen häufigeren Ovarialkarzinomen unterscheidet sich diese Unterform in erster Linie durch eine andere Morphologie und ein anderes immunhistochemisches Profil.<sup>10</sup> In knapp zwei Drittel der Fälle tritt eine Hyperkalzämie auf, was der Erkrankung ihren Namen gab.<sup>10</sup> Obwohl die meisten Patientinnen in sehr frühen Stadien diagnostiziert werden, entwickelt sich oft ein Rezidiv innerhalb von zwölf Monaten nach Erstdiagnose und die meisten von ihnen sterben innerhalb von zwei Jahren.<sup>11</sup> Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung existieren keine Studien bezüglich einer optimalen Therapie. Die therapeutische Erfahrung mit hyperkalzämischen Ovarialkarzinomen der Frauenklinik der Charité – Universitätsmedizin Berlin Campus Virchow-Klinikum, auch in Bezug auf eine Fertilitäts-erhaltende Therapie, wird in dieser Arbeit analysiert.

## **Methodik**

Diese Arbeit wurde im Rahmen des multizentrischen Projektes Tumor Bank Ovarian Cancer (TOC) der Frauenklinik der Charité – Universitätsmedizin Berlin Campus Virchow-Klinikum

durchgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. Jalid Sehouli. Der immunhistochemische Teil dieser Arbeit erfolgte am Karolinska Cancer Center des Karolinska Institutes in Stockholm unter der Leitung von Prof. Dr. Håkan Mellstedt. Die Durchführung dieser Promotionsarbeit wurde in einem Amendment zu dem bestehenden TOC-Projekt von der Ethikkommission der Charité genehmigt (AVD-Nr. 2004-000034, Amendment 8). Für das TOC-Projekt werden nach einer Einwilligungserklärung von Patientinnen mit Ovarialtumoren Daten, Gewebe von Primär- und Rezidivoperation in Paraffinblöcken, Aszites sowie Blut gesammelt und nach standardisierten Protokollen asserviert. Hinsichtlich der Analyse von EpCAM in Bezug auf Prognose, postoperativem Tumorrest und Ansprechen auf Chemotherapie wurden aus der TOC-Datenbank 74 Patientinnen mit Ovarialkarzinomen vom serösen, endometrioiden und muzinösen Subtyp zufällig ausgewählt.

Für die Fragestellung zu den Primär- und Rezidivtumoren wurden 19 Patientinnen mit einem serösen Ovarialkarzinom ausgewählt, von denen sowohl ausreichend Gewebe von der Primär- als auch von der Rezidivoperation vorhanden war.

Es wurden weiterhin vier Patientinnen mit hyperkalzämischen Ovarialkarzinomen durch gezielte Suche in den Datenbanken der Pathologie und des Europäischen Kompetenzzentrum für Eierstockkrebs der Charité – Universitätsmedizin Berlin identifiziert. Die Diagnose hyperkalzämisches Ovarialkarzinom wurde mittels Lichtmikroskopie und immunhistochemischen Markern gestellt und von Referenzpathologien überprüft.

### **Immunhistochemie**

Die Expression von EpCAM wurde mit der immunhistochemischen Methode des Avidin-Biotin-Komplexes bestimmt. Die in Paraffin eingebetteten Tumorgewebe wurden in 4 µm große Scheiben geschnitten, die auf Objektträger gebracht wurden. Die Schnitte wurden zunächst mit Haematoxylin und Eosin gefärbt, um für die EpCAM-Färbung repräsentative Tumorregionen zu identifizieren. Die ausgewählten Gewebeproben wurden dann deparaffinisiert und rehydriert bevor sie in der Mikrowelle in einem Citratpuffer für die Färbung vorbereitet wurden. Um endogene Peroxidasen zu blockieren wurden die Objektträger 30 Minuten in eine Hydrogenperoxid-Lösung getaucht. Die Blockade unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurde erreicht durch Inkubation mit einprozentiger boviner Serum-Albumin-Lösung (BSA) in einer TBS-Puffer-Lösung (2-Amino-2-Hydroxymethylpropan-1-ol in Natrium-Lösung) für 30 Minuten in einer feuchten Kammer. Nach dieser Vorbereitung konnten die Objektträger mit dem primären EpCAM-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert werden und über Nacht bei 8° C in einer feuchten Kammer lagern. Bei dem primären Antikörper handelt sich um den



monoklonalen murinen Antikörper HO-3 (Klon HO-3-19), der gegen EpCAM gerichtet ist. Am folgenden Tag wurde der an Biotin gebundene sekundäre Pferd-gegen-Maus-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 auf das Gewebe in einer feuchten Kammer appliziert für 40 Minuten. Anschließend wurde der Avidin-Biotin-Komplex auf dem Gewebe für 40 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde die Diaminobenzidin-Lösung für sechs Minuten inkubiert, bevor die Schnitte mit Mayer's Haematoxylin gegengefärbt und wieder rehydriert wurden. Für die Waschungen zwischen den einzelnen Inkubationen diente Wasser oder TBS-Puffer. Gewebe von Kolorektalkarzinomen und benignen Ovarien wurde als positive und negative Kontrollen verwendet.

### **Evaluierung der EpCAM-Expression**

Alle Gewebe wurden von zwei Untersuchern unabhängig voneinander mithilfe eines Lichtmikroskops ausgewertet, die klinischen Daten waren den Auswertenden nicht bekannt. Die EpCAM-Expression wurde als positiv gewertet, wenn die Membranen der Tumorzellen angefärbt wurden. Es wurden ein sogenannter „proportion score“ und „intensity score“ definiert. Der proportion score gibt die prozentuale Menge an Tumorzellen an, die positiv gefärbt wurden. Dieser Score ist in vier Gruppen eingeteilt und folgendermaßen definiert: 0-10 % positive Färbung als keine EpCAM Expression; 11-50 % als geringe Expression; 51-75 % als moderate Expression und 76-100 % als Überexpression. Bezüglich des intensity scores wurden drei verschiedene Gruppen definiert, die die Intensität der Färbung widerspiegeln: + als schwache, ++ als moderate und +++ als starke Färbintensität.

### **Nachsorge**

Alle Patientinnen wurden nach Ende der Therapie dreimonatlich bzw. bei Auftreten von Symptomen in der Sprechstunde der Ovarialkarzinom-Nachsorge gesehen. Es wurden jeweils eine ausführliche Anamnese, eine klinische Untersuchung, ein transvaginaler und transabdominaler Ultraschall sowie die Bestimmung des Tumormarkers CA-125 im Blut durchgeführt. Ggfs. wurde ein CT oder MRT durchgeführt. Alle Daten wurden regelmäßig in die Datenbank der Tumorbank Ovarian Cancer aufgenommen. Für diese Arbeit wurden alle Daten der Patientinnen für die drei ausgewählten Publikationen neu erhoben und überprüft.

### **Statistische Analyse**

Für die statistischen Analysen wurde PASW 19 (SPSS Inc., Chicago) verwendet. Alle Ergebnisse werden als Häufigkeiten und Anteile für kategorielle Variablen bzw. als Median und Spannweite (Range) für kontinuierliche Variablen angegeben. Für die Korrelation von der

EpCAM-Expression mit den klinischen Daten dienten der  $\chi^2$ -Test und der Kendall's tau-b-Test. Medianes Überleben und das 95 %-Konfidenzintervall (KI) wurden mit der Kaplan-Meier-Methode geschätzt. Für die univariaten statistischen Vergleiche wurde der Log-rank Test angewandt und für die Hazard Ratios das Cox proportional Hazards-Modell. Mithilfe einer logistischen Regressionanalyse wurden die Odds Ratios für den postoperativen Tumorrest und die Platinsensitivität ausgewertet. Für die Analyse der Unterschiede der EpCAM-Expression zwischen Primär- und Rezidivtumoren wurden der McNemar-Test und der Sign-Test verwendet. Für die Auswertung der hyperkalzämischen Ovarialkarzinome wurden die Daten zusammengefasst und eine deskriptive Statistik durchgeführt. Aufgrund der geringen Fallzahl wurden keine statistischen Tests angewandt, um mögliche Subgruppen und deren Unterschiede zu vergleichen.

## Ergebnisse

Für die Analyse von EpCAM als potentiellen Prognosemarker bei Ovarialkarzinomen wurden 74 Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom ausgewählt. In den meisten Fällen handelte es sich um fortgeschrittene (FIGO III/IV) und schlecht differenzierte Karzinome. Die Patientencharakteristika werden in der Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Patientencharakteristika**

		<b>n=74</b>
<b>Medianes Alter bei Diagnosestellung (Jahre)</b>		56 (Range: 31-86)
<b>FIGO-Stadium (n=73)</b>	<b>I</b>	10 (13,5 %)
	<b>II</b>	3 (4,1 %)
	<b>III</b>	51 (68,9 %)
	<b>IV</b>	9 (12,2 %)
<b>Histologischer Subtyp</b>	<b>Serös</b>	41 (55,4 %)
	<b>Endometrioid</b>	19 (25,7 %)
	<b>Muzinös</b>	14 (18,9 %)
<b>Differenzierungsgrad</b>	<b>I</b>	8 (10,8 %)
	<b>II</b>	25 (33,8 %)
	<b>III</b>	41 (55,4 %)

46 der Malignome (62,2 %) rezidierten und 44 Patientinnen (59,5 %) verstarben während des medianen Beobachtungszeitraumes von 39,7 Monaten (Range: 2,1 bis 173 Monate). Eine vollständige makroskopische Tumorfreiheit konnte in 70,3 % der Fälle erreicht werden, 87,7 % der Patientinnen erhielten eine adjuvante Chemotherapie, die in 70,3 % aus einer Kombination

von Carboplatin und Paclitaxel bestand. Die Patientinnen wurden zunächst entsprechend ihres histologischen Subtyps in drei Gruppen eingeteilt; es konnten folgende klinische Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden: Die serösen und endometrioiden Ovarialkarzinome waren jeweils häufiger schlecht differenziert als die muzinösen (65,9% vs. 16,7%;  $p < 0,001$  und 63,2 % vs. 16,7 %;  $p = 0,001$ ). Die serösen Tumoren hatten zudem häufiger Lymphknotenmetastasen und fortgeschrittenere Tumorstadien als die muzinösen und endometrioiden Karzinome ( $p = 0,009$  und  $p = 0,218$ ; bzw.  $p = 0,001$  und  $p = 0,028$ ). Eine EpCAM-Überexpression lag im gesamten Kollektiv der 74 Patientinnen in 65 Fällen (87,8 %) vor. Bei den serösen Tumoren waren 87,8 % EpCAM-überexprimiert, bei den endometrioiden 94,7 % und bei den muzinösen 78,6 %. Im Vergleich zu den muzinösen Tumoren zeigten die serösen Ovarialkarzinome signifikant häufiger eine EpCAM Überexpression ( $p = 0,045$ ).

Das mediane Gesamtüberleben lag bei 47,6 Monaten (95 %-KI 38,1 – 57,1 Monate) und das mediane progressionsfreie Überleben bei 18,0 Monaten (95 %-KI 14,7 – 21,3 Monate). Die Patientinnen, deren Tumor eine Überexpression von EpCAM aufwies, lebten im Median noch 49,4 Monate (95 %-KI 24,552 – 74,248 Monate), während die Patientinnen, deren Tumor eine EpCAM-Expression  $\leq 50$  % zeigte, im Median 14,2 Monate nach Diagnosestellung (95 %-KI 11,159 – 17,241 Monate) und die Patientinnen mit einem Tumor mit 51-75 % EpCAM-Expression 43,1 Monate (95 %-KI 23,167 – 63, 024) überlebten. Abbildung 1 zeigt die Kurven für das Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier unterteilt nach EpCAM-Expression. Der Unterschied im Gesamtüberleben hinsichtlich der unterschiedlichen EpCAM-Expressionen ist signifikant ( $p = 0,015$ ). Insbesondere zeigte sich ein deutlicher Überlebensvorteil für die Patientinnen mit EpCAM-Überexpression gegenüber denen mit einer EpCAM-Expression  $\leq 50$  % ( $p = 0,008$ ). Eine multivariate Analyse, welche die etablierten Prognosefaktoren Alter, postoperativen Tumorrest, FIGO-Stadium, Differenzierungsgrad, Ansprechen auf die platinhaltige Chemotherapie sowie die histologische Subgruppe miteinschloss, bestätigte die EpCAM-Expression als unabhängigen Marker für das Gesamtüberleben ( $p = 0,022$ ; Tabelle 2).

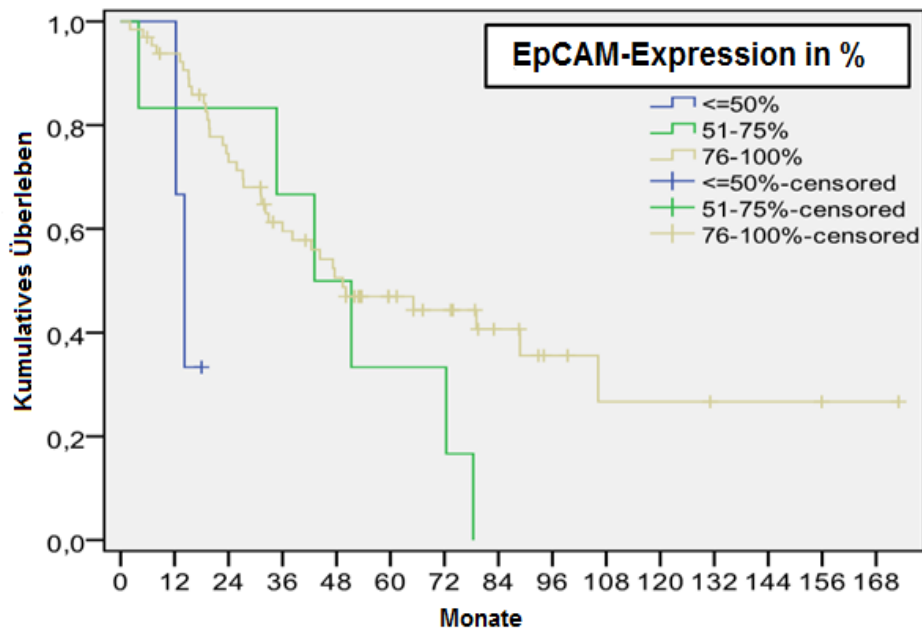


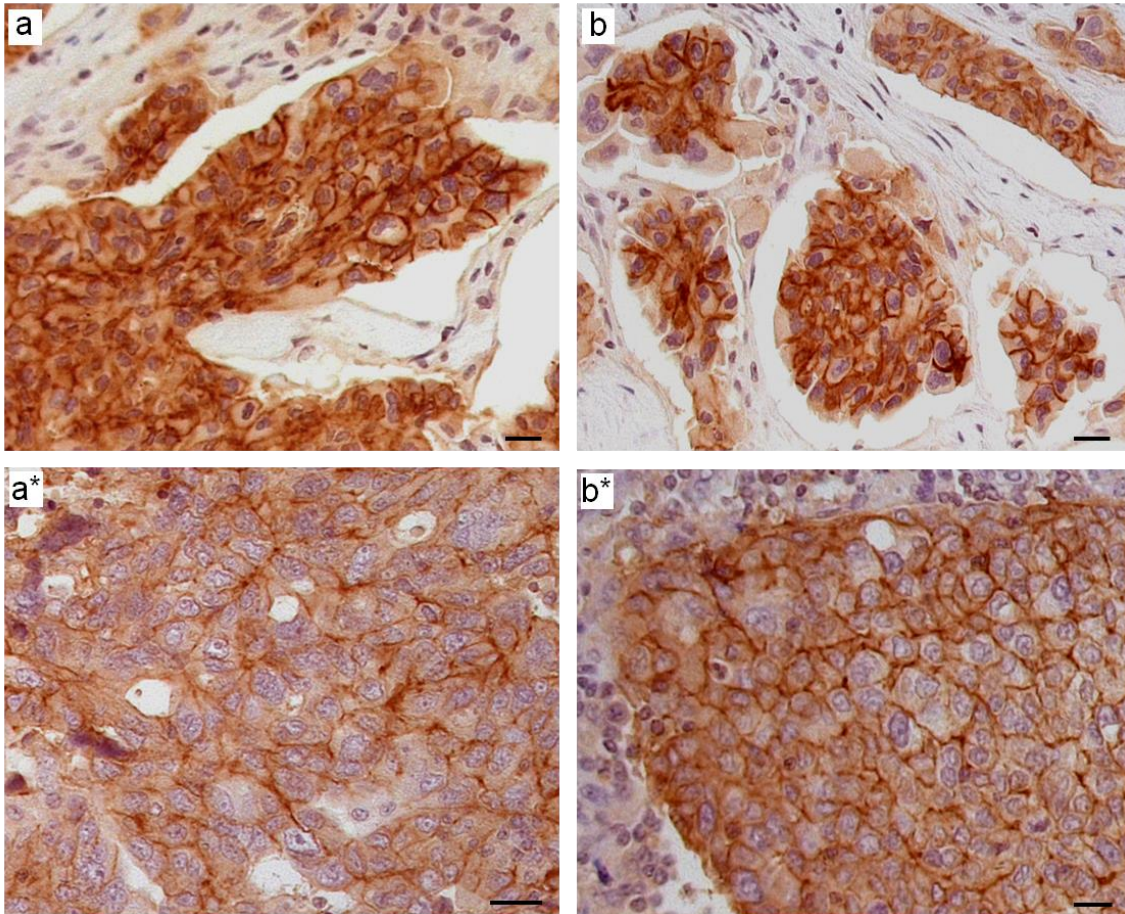
Abbildung 1: Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben in Monaten unterteilt nach Höhe der EpCAM-Expression

Tabelle 2: Multivariate Analyse (Cox Regression) für EpCAM als Marker für das Gesamtüberleben

		Signifikanz	Hazard Ratio	95 %-Konfidenzintervall	
				Unteres	Oberes
EpCAM Expression in %	≤50 %	0,022			
	51-75 %	0,176	0,161	0,011	2,265
	76-100 %	0,025	0,076	0,008	0,719
Alter	pro Jahr	0,439	0,987	0,953	1,021
Histologischer Subtyp	serös	0,018			
	muzinös	0,009	0,067	0,009	0,509
	endometrioid	0,914	0,946	0,341	2,622
FIGO	FIGO III+IV	0,231	2,464	0,564	10,770
Differenzierungsgrad	Grad 3	0,740	1,129	0,551	2,312
Postoperativer Tumorrest	Makroskopisch tumorfrei	0,001			
	≤ 1cm	0,002	4,766	1,776	12,793
	> 1cm	0,001	6,182	2,135	17,902
Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapie	Sensitiv	0,000			
	resistent	0,000	8,429	3,170	22,411
	Nicht bekannt	0,037	6,093	1,118	33,221

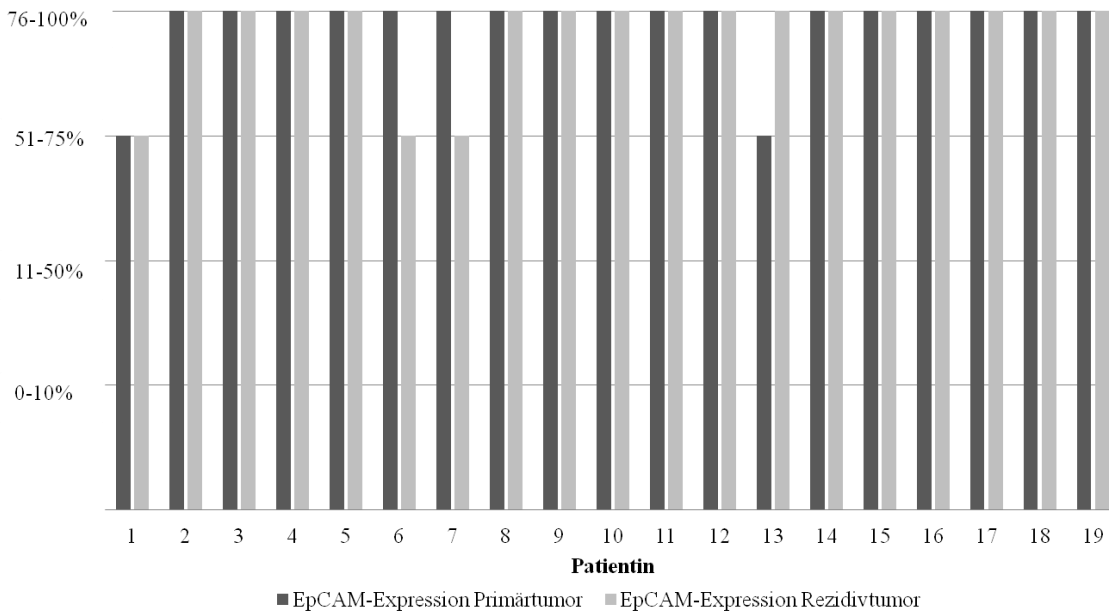
Für das progressionsfreie Überleben wurden die gleichen Analysen durchgeführt: Nach Kaplan-Meier ergab sich keine Korrelation zwischen EpCAM-Expression und dem progressionsfreien Überleben, in der multivariaten Analyse mit den oben genannten Prognosefaktoren lebten die Patientinnen jedoch mit einer EpCAM-Überexpression signifikant länger progressionsfrei als die Patientinnen mit einer EpCAM-Expression  $\leq 50\%$  ( $p=0,040$ ; Hazard Ratio 0,168; 95 %-KI 0,031 – 0,924). In einer anschließenden multivariaten Analyse, die Alter, die FIGO-Stadien III/IV, Differenzierungsgrad III, den histologischen Subtyp und den postoperativen Tumorrest miteinschloss, konnte zudem gezeigt werden, dass Patientinnen mit einer EpCAM-Überexpression auch signifikant häufiger auf eine platinhaltige Chemotherapie ansprachen als Patientinnen mit einer EpCAM-Expression  $\leq 75\%$  ( $p=0,048$ ; Odds Ratio 7,004; 95 %-KI 1,017 – 48,248). Für EpCAM als prädiktiven Marker für den postoperativen Tumorrest ergab sich weder in einer univariaten ( $p=0,713$ ) noch in einer multivariaten Analyse ( $p=0,578$ ) ein Anhalt.

Es konnten 19 Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom in den zweiten Teil dieser Arbeit eingeschlossen werden, bei denen sowohl von der Primär- als auch von der Rezidivoperation ausreichend Gewebe verfügbar war. Das mediane Alter der Patientinnen bei Erstdiagnose lag bei 50 Jahren (Range: 40 – 74 Jahre) und auch in diesem Kollektiv waren die Ovarialkarzinome fast ausschließlich im fortgeschrittenen Stadium (FIGO III/IV) bei Diagnosestellung (94,7 %). 68,4 % der Karzinome waren schlecht differenziert. Alle Patientinnen erhielten nach der Debulking-Operation eine platinhaltige Chemotherapie. Im Median rezidierte das Malignom nach 18 Monaten (Range: 7 bis 59 Monate). Ihr erstes Rezidiv nach Ende der platinhaltigen Chemotherapie nach mehr als sechs Monaten entwickelten 13 Patientinnen und waren damit platinsensitiv. Die Patientinnen erhielten im Median eine Chemotherapie-Linie vor der ersten Rezidivoperation (Range: 1 – 4 Linien). Die Rezidive waren meistens auf dem Dünndarm, dem Dickdarm, der Leberkapsel und auf dem Peritoneum lokalisiert. Eine EpCAM-Überexpression wurde in 17 Tumoren (89,5 %) der Primäroperation und in 16 Tumoren (84,2 %) der Rezidivoperation gefunden. Abbildung 2 zeigt Beispiele unserer immunhistochemischen anti-EpCAM-Färbung von zwei verschiedenen Primärtumoren (a und b) und den jeweils korrespondierenden Rezidivtumoren (a\* und b\*).



**Abbildung 2: Beispiele immunhistochemischer Färbung mit anti-EpCAM-Antikörper von zwei Primärtumoren (a und b) und jeweils korrespondierenden Rezidivtumoren (a\* und b\*). 20fache Vergrößerung. Balken 20 Mikrometer.**

Bei zwei Patientinnen lag zwar in der Primärsituation eine Überexpression von EpCAM vor, diese konnte jedoch in der Rezidivsituation nicht bestätigt werden, EpCAM war nur noch moderat exprimiert. Bei einem Karzinom wurde in der Primärsituation eine moderate EpCAM-Expression gefunden, in der Rezidivsituation hingegen eine Überexpression. Die Abbildung 3 zeigt einen Vergleich der EpCAM-Expression zwischen der Primär- und der Rezidivsituation. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der EpCAM-Expression zwischen der Primär- und der Rezidivsituation festgestellt werden ( $p=1,0$  für verbundene Stichproben). Auch hinsichtlich der Intensität der Färbung mit dem EpCAM-Antikörper fand sich kein Unterschied zwischen Primär- und Rezidivtumor ( $p=0,727$ ).



**Abbildung 3: EpCAM-Expression der Primärtumore und korrespondierenden Rezidivtumore für alle Patientinnen**

Hinsichtlich der Analyse der hyperkalzämischen Ovarialkarzinome konnten vier Patientinnen identifiziert werden, die im Zeitraum von 2008 bis 2011 diagnostiziert wurden. Die Patientinnen, die bei Diagnosestellung zwischen 18 und 29 Jahre alt waren (Median 24,5 Jahre), kontaktierten aufgrund von Unterbauchschmerzen einen Gynäkologen, bei zweien war das Gesamtkalzium im Serum erhöht. Jedoch nur eine von diesen entwickelte im Verlauf der Erkrankung mehrere symptomatische hyperkalzämische Episoden. Zwei unserer Patientinnen wurden im FIGO-Stadium Ia, eine im FIGO-Stadium IIB und eine Patientin bereits im fortgeschrittenen FIGO-Stadium IIIC diagnostiziert. Die Tabelle 3 zeigt die klinischen Charakteristika der Patientinnen. Alle Patientinnen wurden zunächst einseitig oophorektomiert bzw. adnektomiert. Im Anschluss an die Diagnosestellung erfolgte eine Stagingoperation, in drei Fällen unter Fertilitätserhalt. Zweimal wurden das Stadium FIGO IA, einmal FIGO IIB und bei der vierten Patientin FIGO IIIC diagnostiziert. Die immunhistochemischen Marker Vimentin und Zytokeratin waren in drei Fällen positiv, Synaptophysin war nur einmal positiv gefärbt, während Chromogranin in keiner Tumorprobe nachgewiesen werden konnte. Alle Patientinnen erhielten adjuvant eine Chemotherapie. Diese bestand zweimal aus Carboplatin in Kombination mit Paclitaxel, im fortgeschrittenen Fall aus Cisplatin und Etoposid und die jüngste Patientin wurde mit Cisplatin, Ifosfamid und Adriamycin therapiert. Nach einer Nachbeobachtungszeit von im Median 22 Monaten (Range: 8 – 47 Monate) lebten drei Patientinnen rezidivfrei, während die Patientin mit dem hyperkalzämischen Ovarialkarzinom im Stadium IIIC vier Monate nach Abschluss der

ersten Chemotherapie ein Rezidiv entwickelte. Trotz zwei weiteren Operationen sowie einer Zweit- und Drittlinien-Chemotherapie verstarb die Patientin 15 Monate nach Diagnosestellung.

**Tabelle 3: Klinische Charakteristika der Patientinnen mit hyperkalzämischem Ovarialkarzinom**

	Alter (Jahre)	Tumorstadium/ initiale Tumorgröße	Kalziumspiegel im Serum* bei Erstdiagnose	Initialer CA-125- Spiegel** (U/ml)	Rezidiv	Gesamt- überleben
<b>Patientin A</b>	25	pT1aN0 (0/46) G3/ 150mm, FIGO Ia	2.15 mmol/l	162 U/ml	nein	Am Leben; 8 Monate seit Erstdiagnose
<b>Patientin B</b>	29	pT1aN0 (0/42) G3/ 80mm, FIGO Ia	4.7 mmol/l	47 U/ml	nein	Am Leben; 29 Monate seit Erstdiagnose
<b>Patientin C</b>	18	pT2bN0 (0/10) G3/ 100mm, FIGO IIb	Nicht bekannt	204.3 U/ml	nein	Am Leben; 47 Monate seit Erstdiagnose
<b>Patientin D</b>	24	pT3aN1 (1/71) G3/ 140mm, FIGO IIIc	4.2 mmol/l	Nicht bekannt	zwei	Verstorben; 15 Monate nach Erstdiagnose

\*Referenzbereich: 2,15 – 2,55 mmol/l

\*\* Referenzbereich: < 35 U/ml

## Diskussion

Als erste Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass eine EpCAM-Überexpression einen unabhängigen Marker für ein längeres Gesamtüberleben und ein besseres Ansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie beim Ovarialkarzinom darstellt. Dies ist außerdem die erste Analyse, die EpCAM als Marker für das Ansprechen auf eine Chemotherapie untersucht.

Analog zu unseren Ergebnissen zeigten Songun et al. bei 300 Patienten mit Magenkarzinom, dass ein Verlust der EpCAM-Expression mit einem schlechteren Gesamtüberleben einherging. Patienten ohne Verlust der EpCAM-Expression wiesen ein signifikant besseres 10-Jahres-Überleben auf als die Patientinnen mit einem Verlust der EpCAM-Expression (42 % vs. 22 %;  $p \leq 0,0001$ ).<sup>12</sup> Auch in einer Studie mit Ösophaguskarzinomen war eine EpCAM-Überexpression im Serum und im Gewebe mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert, die gleiche Korrelation findet man auch bei Nierenzellkarzinomen.<sup>7,13</sup> Durch die Funktion von EpCAM



bietet sich eine Erklärungsmöglichkeit für die Assoziation von EpCAM mit einer besseren Prognose: EpCAM könnte in seiner Funktion als Zell-Zell-Adhäsionsmolekül und durch Stabilisierung des Zytoskeletts eine Metastasierung verhindern.<sup>7</sup> Es ist denkbar, dass durch EpCAM die Abschilferung von Zellen verhindert wird. Dies ist beim Ovarialkarzinom, bei dem sich vom Primärtumor abgeschilferte Zellen innerhalb der Peritonealhöhle verbreiten und so zur Tumorausbreitung beitragen, möglicherweise wichtiger als bei anderen Tumoren, die solide und invasiv-destruktiv wachsen, wie z. B. das Zervixkarzinom. In einer Studie von Basak et al. wurde z. B. die Rolle von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen bei der Zellmigration und der Invasivität von Tumoren in einem Kolorektalkarzinom-Modell durch Transfektion mit Komplementär-DNA von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen untersucht. Im Vergleich zu Kontroll-Zellen ohne komplementäre DNA konnte eine geringere Metastasierungsrate und geringere Invasivität gesehen werden.<sup>14</sup> Kimura et al. wiesen nach, dass EpCAM an der Wachstumsfront des Tumors weniger exprimiert war als an anderen Orten im Tumor.<sup>13</sup> Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die membranöse EpCAM-Immunreaktion am Invasionsrand von Kolorektalkarzinomen abnimmt.<sup>7</sup> Auf der anderen Seite wird die Rolle von EpCAM in der Karzinogenese in der Literatur sehr entgegengesetzt diskutiert. Im Gegensatz zu Daten, die eine protektive Rolle von EpCAM belegen, gibt es gegenläufige Erkenntnisse, die in EpCAM einen Promoter der Karzinogenese sehen. EpCAM kann c-myc hochregulieren und so die Zellproliferation induzieren.<sup>7</sup> Eine stärkere Expression von EpCAM hat eine verminderte Bindung anderer Zelladhäsionsmoleküle an die Zellen zur Folge und führt so zu erhöhter Zellmotilität, Proliferation und Bildung von Metastasen.<sup>7</sup> Diese Hinweise auf EpCAM als Promoter der Karzinogenese spiegeln sich in Daten beim Mammakarzinomen wider, welche eine Assoziation von EpCAM-Überexpression mit einem schlechteren progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben zeigen.<sup>7</sup> Darüber hinaus gibt es Karzinome, für die eine Assoziation von EpCAM sowohl mit einer besseren als auch mit einer schlechteren Prognose gezeigt wurde.<sup>7</sup>

In unserer Analyse war eine EpCAM-Überexpression beim Ovarialkarzinom mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert. In einer Studie von Spizzo et al. mit 199 Ovarialkarzinom-Patientinnen wurde EpCAM hingegen als ein Marker für ein schlechteres Gesamtüberleben identifiziert,<sup>8</sup> in einer weiteren Studie von Heinzelmann-Schwarz et al. konnte kein Zusammenhang von EpCAM-Expression und Prognose detektiert werden.<sup>9</sup> Die konträren Ergebnisse könnten in unterschiedlichen klinischen und histopathologischen Charakteristika begründet sein: So wurden beispielsweise in unser Kollektiv deutlich mehr fortgeschrittene und häufiger schlecht differenzierte Tumoren eingeschlossen als in die Studie von Spizzo et al. (81,1

% vs. 68 % FIGO III/IV; 55,4 % vs. 45,7 % Grad III). Zudem analysierten wir mehr seröse Tumoren (55,4 % vs. 40,7 % seröse Karzinome). Auch bezüglich der Häufigkeit der EpCAM-Überexpression gab es Unterschiede: In unserem Kollektiv überexprimierten 87,8 % der Ovarialkarzinome EpCAM im Vergleich zu 68,8 % der Ovarialkarzinome bei Spizzo et al. Diese Diskrepanz könnte durch die höhere Anzahl an serösen Tumoren in unserem Kollektiv erklärt werden, die häufiger EpCAM überexprimieren als muzinöse Ovarialkarzinome.<sup>8</sup> Trotz dieser Unterschiede war das Gesamtüberleben mit 46 Monaten in beiden Analysen gleich. EpCAM als Marker für das Ansprechen auf die platinhaltige Chemotherapie und den postoperativen Tumorrest wurde in der Studie von Spizzo nicht untersucht. Sowohl in unserer als auch in der Analyse von Spizzo et al. wurde die EpCAM-Expression immunhistochemisch anhand der Avidin-Biotin-Komplex-Methode bestimmt. Bei der Auswertung wurde jeweils ein proportion score mit vier Untergruppen und ein intensity score mit drei Untergruppen verwendet. Spizzo et al. multiplizierten die beiden Scores noch miteinander und erhielten so ein Gesamtergebnis.<sup>8</sup> In unserer Untersuchung werden die Ergebnisse des proportion und des intensity scores getrennt untersucht analog zu Bellone et al.<sup>6</sup>

Aufgrund der inkonsistenten Ergebnisse bleibt die Rolle von EpCAM als Marker für das Gesamtüberleben weiterhin unklar und sollte in größeren Studien untersucht werden.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass in unserem Kollektiv eine EpCAM-Überexpression ein unabhängiger Marker für das Gesamtüberleben und das Ansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie ist.

Ferner konnten wir an unserem Kollektiv von 19 Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom und korrespondierenden Rezidiv zeigen, dass die Expression von EpCAM im Verlauf der Erkrankung stabil bleibt. Eine ähnliche Untersuchung führten Bellone et al. durch: In dieser Studie an acht Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom und korrespondierendem Rezidiv war EpCAM in der Rezidivsituation signifikant höher exprimiert als in der Primärsituation ( $p=0,0499$ ). Außerdem konnte gezeigt werden, dass EpCAM auch in Metastasen höher exprimiert wird als in Primärtumoren. Dieses wurde von den Autoren als Hinweis auf die Rolle von EpCAM als Promoter der Karzinogenese gedeutet und darauf, dass eine hohe Expression von EpCAM mit einer höheren Aggressivität des Tumors einhergeht.<sup>6</sup> Diese Hypothese wird von Spizzo et al unterstützt, die, wie bereits beschrieben, gezeigt haben, dass eine Überexpression von EpCAM mit einer schlechteren Prognose einhergeht.<sup>8</sup> Methodisch gibt es zwischen der Auswertung von Bellone et al. und unserer Auswertung keine Unterschiede. Es wurde in beiden Fällen die EpCAM-Expression immunhistochemisch anhand der Avidin-Biotin-Komplex-

Methode untersucht sowie für die Auswertung ein proportion score und ein intensity score verwendet. Neben der kleinen Fallzahl von acht Patientinnen wird die Studie von Bellone jedoch auch durch die Heterogenität der histologischen Subtypen (seröse und klarzellige Ovarialkarzinome) limitiert.<sup>6</sup> In unserem Kollektiv von 19 Patientinnen wurden ausschließlich seröse Ovarialkarzinome ausgewählt, welche die häufigste histologische Subgruppe beim Ovarialkarzinom darstellt. Unser Ergebnis, dass sich die EpCAM-Expression bei primären Ovarialkarzinomen und Rezidiven nicht unterscheidet, wird unterstützt von Spizzo et al. Diese Arbeitsgruppe untersuchte insgesamt 2291 Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten, darunter 326 Ovarialkarzinome, und verglich die EpCAM-Expression von 108 Primärtumoren mit Metastasen des jeweils gleichen Patienten. Die höchste Konkordanz hinsichtlich der EpCAM-Expression zwischen Primärtumor und Metastase fand sich bei Ovarialkarzinomen, von denen jedoch für diesen Vergleich nur acht Patientinnen zur Verfügung standen.<sup>15</sup> Mit unserer Analyse an 19 Patientinnen mit Primärtumor und korrespondierendem Rezidivtumor konnten wir zeigen, dass die EpCAM-Expression im Verlauf der Erkrankung stabil bleibt. Dies ist die bislang größte Analyse bezüglich dieser Fragestellung. Aufgrund der Schwierigkeit, Gewebe von Patientinnen sowohl vom Primärtumor als auch vom Rezidivtumor zu akquirieren, sind multizentrische Studien von Nöten, um unsere Untersuchung prospektiv zu bestätigen. Das Ergebnis, dass sich die EpCAM-Expression im Verlauf der Erkrankung nicht ändert, bildet eine wichtige Grundlage für zielgerichtete anti-EpCAM-spezifische Therapien, die hauptsächlich im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf eingesetzt werden, und bedeutet, dass die Untersuchung von ausschließlich Primärgewebe hinsichtlich der EpCAM-Expression ausreicht.

Für die Evaluierung der Therapie und des klinischen Verlaufes von hyperkalzämischen Ovarialkarzinomen konnten vier Patientinnen identifiziert werden, die im Europäischen Kompetenzzentrum für Eierstockkrebs behandelt wurden. Hinsichtlich dieses äußerst seltenen Krankheitsbildes existieren kaum Studien, sondern hauptsächlich Fallberichte. Die größte Analyse von Young et al. konnte 150 Patientinnen einschließen, davon 50 % im Stadium I, 5 % im Stadium II und 44 % Stadium III/IV. Das mediane Alter lag bei 23,9 Jahren.<sup>10</sup> Die Patientencharakteristika aus der Analyse von Young et al. decken sich mit unseren Beobachtungen. Auch in seinem Kollektiv wurden alle Patientinnen operiert und die meisten erhielten eine adjuvante Chemotherapie, manche auch eine Radiotherapie. In diesem Kollektiv schienen die Patientinnen, die eine bilaterale Adnektomie erhalten haben, eine bessere Prognose zu haben als die Patientinnen, die fertilitätserhaltend operiert wurden. In unserem Kollektiv wurden drei Patientinnen fertilitätserhaltend operiert; zwei von diesen (FIGO IA und FIGO IIB)

leben rezidivfrei und nur die dritte mit einem bereits fortgeschrittenen Karzinom (FIGO IIIC) entwickelte ein Rezidiv und verstarb trotz zwei weiterer Operationen sowie einer Zweit- und Drittlinien-Chemotherapie 15 Monate nach Diagnosestellung. Eine fertilitätserhaltende Operation wird in der Literatur kontrovers diskutiert, sollte jedoch in frühen Stadien bei Kinderwunsch der meist sehr jungen Patientinnen in Erwägung gezogen werden. Allerdings sollte in der Entscheidungsfindung der häufig sehr aggressive Verlauf der Erkrankung berücksichtigt werden. In der zweiten existierenden größeren multizentrischen Analyse von Harrison et al. mit insgesamt 17 Patientinnen lag das mediane Gesamtüberleben im Stadium III bei sechs Monaten; sieben von zehn Patientinnen im Stadium I lebten nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 40 Monaten rezidivfrei. Die Patientinnen erhielten meist eine adjuvante Chemotherapie mit Cisplatin und Etoposid, wie auch unsere Patientin im FIGO Stadium IIIC.<sup>11</sup> Die Rationale für die Kombination von Cisplatin und Etoposid basiert auf der Behandlung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms. Jedoch werden aufgrund fehlender Studien diverse Chemotherapie-Kombinationen angewendet. Die wenigsten Patientinnen erhalten eine Radiotherapie, da die meisten Rezidive multifokal innerhalb der Peritonealhöhle disseminiert sind und eine perkutane Radiatio des Abdomens z. B. ein hohes Risiko für einen Ileus mit Darmperforation und die Entwicklung von Fisteln birgt. Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass eine Operation mit anschließender Chemotherapie durchgeführt werden sollte. Vor allem in frühen Stadien und bei Patientinnen mit Kinderwunsch sollte ein fertilitätserhaltendes Vorgehen in Erwägung gezogen werden. Größere, multizentrische Studien wären wünschenswert, um für diese sehr seltene und aggressive Erkrankung eine Therapiestrategie zu entwickeln. Auf Grund der Seltenheit der Erkrankung sind multizentrische internationale Netzwerke notwendig.

## **Literaturverzeichnis**

1. Sehoul J. Ovarialkarzinom. Gynakol Geburtsmed Gynakol Endokrinol 2011;7:84–95.
2. Scully RE, Young RH, Clement PB. Endometrioid Tumors. In: Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube, and broad ligament: Atlas of Tumor Pathology. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1998.
3. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. AGO Kommission Ovar, 2013. (Assessed July 10, 2014, at <http://www.ago-online.de/de/fuer-mediziner/leitlinienempfehlungen/ovar/>)
4. Heiss MM, Murawa P, Koralewski P, et al. The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. Int J Cancer 2010;127:2209–21.

5. Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK, Mellstedt H. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer Treat Rev* 2012;38:68–75.
6. Bellone S, Siegel ER, Cocco E, et al. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule in primary, metastatic, and recurrent/chemotherapy-resistant epithelial ovarian cancer: implications for epithelial cell adhesion molecule-specific immunotherapy. *Int J Gynecol Cancer* 2009;19:860–6.
7. Van der Gun BTF, Melchers LJ, Ruiters MHJ, De Leij LFMH, McLaughlin PMJ, Rots MG. EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis* 2010;31:1913–21.
8. Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, et al. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006;103:483–8.
9. Heinzelmann-Schwarz VA, Gardiner-Garden M, Henshall SM, et al. Overexpression of the cell adhesion molecules DDR1, Claudin 3, and Ep-CAM in metaplastic ovarian epithelium and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:4427–36.
10. Young RH, Oliva E, Scully RE. Small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type. A clinicopathological analysis of 150 cases. *Am J Surg Pathol* 1994;18:1102–16.
11. Harrison ML, Hoskins P, Du Bois A, et al. Small cell of the ovary, hypercalcemic type -- analysis of combined experience and recommendation for management. A GCIIG study. *Gynecol Oncol* 2006;100:233–8.
12. Songun I, Litvinov SV, Van de Velde CJH, Pals ST, Hermans J, Van Krieken JHJM. Loss of Ep-CAM (CO17-1A) expression predicts survival in patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 2005;92:1767–72.
13. Kimura H, Kato H, Faried A, et al. Prognostic significance of EpCAM expression in human esophageal cancer. *Int J Oncol* 2007;30:171–9.
14. Basak S, Speicher D, Eck S, et al. Colorectal carcinoma invasion inhibition by CO17-1A/GA733 antigen and its murine homologue. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:691–7.
15. Spizzo G, Fong D, Wurm M, et al. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol* 2011;64:415–20.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Hannah Woopen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle des epithelialen Markers EpCAM beim Ovarialkarzinom; Hyperkalzämische Ovarialkarzinome“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

---

Unterschrift

## **Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen**

Hannah Woopen hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

### **Publikation 1:**

Woopen H, Pietzner K (geteilte Erstautorenschaft), Richter R, Fotopoulou C, Joens T, Braicu EI, Mellstedt H, Mahner S, Lindhofer H, Darb-Esfahani S, Denkert C, Sehouli J. Overexpression of the epithelial cell adhesion molecule is associated with a more favorable prognosis and response to platinum-based chemotherapy in ovarian cancer. *J Gynecol Oncol* 2014; 25: 221-228.

Impact Factor: 1,730

Beitrag im Einzelnen:

Schreiben des des Amendments für den Ethikantrag, Erstellung des Patientenkollektivs, Datenaquirierung, Immunhistochemie, Auswertung der Tumorproben, univariate Statistik, Literatur, Schreiben des Methoden- und Ergebnisteils der Publikation, harmonische Mitintegration der Beiträge der Koautoren in den Textfluss, Einreichen beim Journal, Überarbeitung des Manuskriptes nach der peer-review Begutachtung

### **Publikation 2:**

Pietzner K, Woopen H (geteilte Erstautorenschaft), Richter R, Joens T, Braicu EI, Dimitrova D, Mellstedt H, Darb-Esfahani S, Denkert C, Lindhofer H, Fotopoulou C, Sehouli J. Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in paired tumor samples in patients with primary and recurrent serous ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2013; 23:797-802.

Impact Factor: 1,941

Beitrag im Einzelnen:

Schreiben des des Amendments für den Ethikantrag, Erstellung des Patientenkollektivs, Datenaquirierung, Immunhistochemie, Auswertung der Tumorproben, univariate Statistik, Literatur, Schreiben des Methoden- und Ergebnisteils der Publikation, harmonische

Mitintegration der Beiträge der Koautoren in den Textfluss, Einreichen beim Journal,  
Überarbeitung des Manuskriptes nach der peer-review Begutachtung

**Publikation 3:**

Woopen H, Sehouli J, Pietzner K, Darb-Esfahani S, Braicu I, Fotopoulou C. Clinical Experience about Young Patients with Small Cell Ovarian Carcinoma of the Hypercalcemic Type (OSCCHT). Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2012; 165: 313-317.

Impact Factor: 1,843

Beitrag im Einzelnen:

Erstellung des Patientenkollektivs, Datenaquirierung, Auswertung der Daten, Literatur,  
Schreiben des Manuskriptes, harmonische Mitintegration der Beiträge der Koautoren in den  
Textfluss, Einreichen beim Journal, Überarbeitung des Manuskriptes nach der peer-review  
Begutachtung

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden  
Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---



## **Druckexemplare der ausgewählten Publikationen**

### **Publikation 1**

Woopen H, Pietzner K (geteilte Erstautorenschaft), Richter R, Fotopoulou C, Joens T, Braicu EI, Mellstedt H, Mahner S, Lindhofer H, Darb-Esfahani S, Denkert C, Sehouli J. Overexpression of the epithelial cell adhesion molecule is associated with a more favorable prognosis and response to platinum-based chemotherapy in ovarian cancer. J Gynecol Oncol 2014; 25: 221-228.

<http://dx.doi.org/10.3802/jgo.2014.25.3.221>

Impact Factor: 1,730

## **Publikation 2**

Pietzner K, Woopen H (geteilte Erstautorenschaft), Richter R, Joens T, Braicu EI, Dimitrova D, Mellstedt H, Darb-Esfahani S, Denkert C, Lindhofer H, Fotopoulou C, Sehouli J. Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in paired tumor samples in patients with primary and recurrent serous ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2013; 23:797-802.

<http://dx.doi.org/10.1097/IGC.0b013e3182929056>

Impact Factor: 1,941

### **Publikation 3**

Woopen H, Sehouli J, Pietzner K, Darb-Esfahani S, Braicu I, Fotopoulou C. Clinical Experience about Young Patients with Small Cell Ovarian Carcinoma of the Hypercalcemic Type (OSCCHT). Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2012; 165: 313-317.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2012.07.034>

Impact Factor: 1,843

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Publikationsliste**

### **Originalarbeiten**

1. Woopen H, Sehouli J, Pietzner K et al. Clinical Experience about Young Patients with Small Cell Ovarian Carcinoma of the Hypercalcemic Type (OSCCHT). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012; 165: 313-317.
2. Pietzner K, Woopen H (geteilte Erstautorenschaft), Richter R et al. Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in paired tumor samples in patients with primary and recurrent serous ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2013; 23:797-802.
3. Woopen H, Pietzner K (geteilte Erstautorenschaft), Richter R, et al. Overexpression of the epithelial cell adhesion molecule is associated with a more favorable prognosis and response to platinum-based chemotherapy in ovarian cancer. *J Gynecol Oncol* 2014; 25: 221-228.

### **Übersichtsartikel und Fallberichte**

1. Woopen H, Sehouli J. Current and future options in the treatment of malignant ascites in ovarian cancer. *Anticancer Research* 2009; 29:3353-3359.
2. Woopen H, Sehouli J. Aktuelle Aspekte zur Aszitestherapie beim Ovarialkarzinom. *Journal Onkologie* 2010; 02:94-97.
3. Woopen H, Pietzner K, Darb-Esfahani S et al. Extraperitoneal response to intraperitoneal immunotherapy with catumaxomab in a patient with cutaneous lymphangiosis carcinomatosa from ovarian cancer: A case report and review of the literature. *Med Oncol* 2012; 29:3416-3420.

### **Buchkapitel**

1. Woopen H, Sehouli J. Management des malignen Aszites bei gynäkologischen Malignomen. In: Sehouli J, Lichtenegger W. Update 2009/2010. Innovative Therapien in der Gynäkologischen Onkologie. Hamburg: akademos Wissenschaftsverlag 2009.
2. Pietzner K, Woopen H, Sehouli J. Management des malignen Aszites bei gynäkologischen Malignomen. In: Sehouli J, Lichtenegger W. Update 2011/2012 Neue Therapien in der Gynäkologischen Onkologie. Hamburg: akademos Wissenschaftsverlag 2011.

3. Woopen H, Pietzner K. Maligner Aszites. In Sehouli J, Fotopoulou C. „Multimodales Management des Ovarialkarzinoms“. 2. Auflage. Unimed Verlag 2012.

### **Abstracts und Kongressbeiträge**

1. Präsentation auf der European Student's Conference in Berlin 2011: Woopen H, Pietzner K, Joens T et al.: „Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) as a marker for chemotherapy response?“ ESC-ID 1,142
2. Woopen H, Pietzner K, Richter R et al. Prognostic value of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in patients with primary epithelial ovarian cancer. J Clin Oncol 30, 2012 (suppl; abstr e15531) .
3. Moderierte Poster-Präsentation auf dem 30. Deutschen Krebskongress in Berlin 2012: „Overexpression of Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is associated with a favorable prognosis in epithelial ovarian cancer patients“ ID 451
4. Poster-Präsentation auf der Charité Mayo Konferenz 2013: “Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in paired tumor samples of patients with primary and recurrent serous ovarian cancer.” ID 1
5. Präsentation auf dem Deutschen Perinatalkongress 2013: “Vaginalkarzinom in der Schwangerschaft.” ID A-605-0004-00120

## **Danksagung**

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Jalid Sehouli bedanken für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe mitzuwirken. Prof. Dr. Jalid Sehouli war in den letzten Jahren nicht nur mein Doktorvater sondern auch mein Mentor. Vielen herzlichen Dank für die Möglichkeit, auch außerhalb der Doktorarbeit wissenschaftlich tätig zu sein, Ihre Kontakte nach Stockholm und London sowie die lehrreichen und anregenden Diskussionen. Sie haben mein Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten geweckt und maßgeblich gefördert.

Für die Möglichkeit, die Laborarbeit im Karolinska Cancer Center in Stockholm durchgeführt haben zu können, bin ich Prof. Dr. Jalid Sehouli und Prof. Dr. Håkan Mellstedt zu großem Dank verpflichtet. Prof. Dr. Håkan Mellstedt danke ich außerdem für die große Hilfe bei der Korrektur der Publikationen.

Bei Dr. Klaus Pietzner möchte ich mich für die engmaschige Begleitung und Zusammenarbeit – auch bei wissenschaftlichen Projekten außerhalb der Doktorarbeit - bedanken. Seine Freude am wissenschaftlichen Arbeiten, seine engagierten Vorträge und lehrreichen Treffen haben mich stets inspiriert und motiviert.

Frau PD Dr. Fotopoulou bin ich zu großem Dank verpflichtet für die gute Betreuung und Zusammenarbeit hinsichtlich des Projektes der hyperkalzämischen Ovarialkarzinome sowie den ausführlichen Anregungen und Korrekturen der drei Manuskripte.

Bei Frau Dr. Ioana Braicu möchte ich mich für die initiale Betreuung und die Möglichkeit, in der Tumorbank Ovarian Cancer wissenschaftlich tätig zu sein, recht herzlich bedanken.

Für den statistischen Beistand und seine Geduld danke ich Herrn Dr. Rolf Richter ganz herzlich.

Bei Prof. Dr. Carsten Denkert möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung der Tumorproben und die Expertise seines Teams bedanken.

Frau PD Dr. Darb-Esfahani danke ich vielfach für die gute Zusammenarbeit und für Ihre außerordentliche Kompetenz bei der Beantwortung gynäkopathologischer Fragestellungen.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. Thomas Jöns für die engagierte Unterstützung bei der Auswertung der Tumorproben und seine beständige Motivation.

Für die fachliche Unterstützung bei den immunhistochemischen Färbungen und seine Expertise danke ich Herrn Dr. Jayant Shetye vom Karolinska Cancer Center.

Herrn PD Dr. Sven Mahner aus der Gynäkologie UKE Hamburg danke ich für die Überlassung von Tumorgewebe und Daten von Patientinnen mit muzinösem Ovarialkarzinom sowie der kritischen Korrektur der Manuskripte.

Herrn PD Dr. Horst Lindhofer danke ich für die freundliche Überlassung seines anti-EpCAM-Antikörpers sowie seine Hilfestellungen bei methodischen Fragen.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei den MTAs Monika Mentze aus der Tumorbank Ovarian Cancer, Ines Koch und Britta Beyer aus der Pathologie sowie Inger Bodin, Liss Garberg und Ingrid Eriksson aus dem Karolinska Cancer Center Stockholm.

Nicht zuletzt danke ich dem ganzen Team der Tumorbank Ovarian Cancer für die angenehme und konstruktive Arbeitsatmosphäre.

Vielen Dank an meine Familie und meinen Freund für die emotionale Unterstützung und Motivation.