

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Das Ovarialkarzinom unter besonderer Berücksichtigung der Entwicklung des  
aktuellen Therapiestandards in der Primärtherapie und Entwicklung neuer  
therapeutischer Ansätze**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia Legendi

für das Fach Frauenheilkunde und Geburtshilfe

der Medizinischen Fakultät

an der Ludwig-Maximilians-Universität

vorgelegt von

Dr. med. Markus Alexander Christoph Burges

2021

***Meiner Familie***

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>4</b>
<b>2.</b>	<b>Eigene Untersuchungen</b>	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>Das PET-CT beim rezidierten Ovarialkarzinom</b>	<b>7</b>
<b>2.2</b>	<b>Hormonrezeptoren beim Ovarialkarzinom</b>	<b>10</b>
<b>2.3</b>	<b>Neue zielgerichtete Therapieansätze beim Ovarialkarzinom</b>	<b>15</b>
<b>2.4</b>	<b>Neue intraperitoneale Therapieoptionen</b>	<b>23</b>
<b>3.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>27</b>
<b>4.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>28</b>
<b>5.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>34</b>

## 1. Zusammenfassung

In Deutschland erkranken pro Jahr etwa 7400 Frauen an einem malignen Ovarialtumor und 5500 Frauen sterben an einem Ovarialkarzinom (Kaatsch, 2019). Damit entfallen auf das Ovarialkarzinom 3,5 % aller bösartigen Neubildungen der Frauen und 5,6 % aller Krebssterbefälle. 70 % der Ovarialkarzinome werden erst in den fortgeschrittenen Tumorstadien FIGO III–IV (Ausbreitung des Karzinoms außerhalb des Beckens, Metastasen) diagnostiziert, da die Erkrankung in den frühen Tumorstadien keine spezifische Symptomatik aufweist. Verlässliche Vorsorgeuntersuchungen zur Früherkennung des Ovarialkarzinoms, wie z.B. für das Zervixkarzinom, existieren bisher nicht.

Mittlerweile sind etliche molekularbiologische sowie klinische Prognosefaktoren bekannt. Allerdings bleibt auch noch heute der wichtigste prognostische Parameter die Durchführung einer adäquaten operativen Therapie mit einer kompletten Entfernung der malignen Läsionen.

Postoperativ ist die Durchführung einer Chemotherapie mit einer Kombination aus Carboplatin und Paclitaxel Standard. Die Einhaltung des Zeitintervalls zwischen Operation und Chemotherapie spielt hier eine wichtige Rolle (Mahner et al., 2013). Faktoren wie u.a. Alter der Patientinnen beeinflussen die Verträglichkeit der Systemtherapie unter anderem erheblich (Trillsch et al., 2013). Die Effektivität kann durch die Hinzunahme des VEGF-Antikörpers Bevacizumab zur Chemotherapie und als Erhaltungstherapie (Perren et al., 2011) sowie den PARP-Inhibitor Olaparib darüber hinaus verstärkt werden (Moore and Birrer, 2018). Auch eine neoadjuvante Chemotherapie ist nach wie vor Grundlage intensiver Untersuchungen (Mahner et al., 2016).

Aus einer besseren Abschätzung der individuellen Prognose der Erkrankung könnten sich über die Standardtherapie hinausgehende therapeutische Maßnahmen für Patientinnen mit einem erhöhten Rezidivrisiko ableiten. Hierbei kommt vor allem neuen zielgerichteten Therapien eine besondere Bedeutung zu (Mahner et al., 2015b, Mahner and Pfisterer, 2013).

So sind mittlerweile einige molekularpathologische Parameter als prognostische Faktoren identifiziert worden, wie z.B. BRCA-Status und Steroidrezeptoren. Allerdings wird die Bedeutung des Östrogenrezeptorstatus (ER) beim Ovarialkarzinom kontrovers diskutiert.

Zudem sind die unterschiedlichen Isoformen ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  erst aus neueren Untersuchungen bekannt. Wir konnten in einer immunhistochemischen Untersuchung eine Assoziation der ER- $\alpha$  Expression mit dem Tumorgrading, dem progressionsfreien Überleben und dem krankheitsspezifischen Überleben nachweisen. ER- $\beta$  stellte sich als Prädiktor für eine lymphogene Metastasierung heraus. Die einfach durchzuführende immunhistochemische Analyse des Östrogenrezeptors könnte daher sowohl Patientinnen mit einem erhöhten Rezidivrisiko anzeigen, als auch die mögliche Effektivität einer ER- $\alpha$  vermittelten Therapie vorhersagen. Weitere Arbeiten untermauern die Bedeutung von Hormonrezeptoren beim Ovarialkarzinom (Czogalla et al., 2018, Czogalla et al., 2019).

Ein für die Erkrankung mit Eierstockkrebs relativ typisches Problem für die Patientinnen ist das Auftreten von Aszites. Entweder bereits zum Zeitpunkt der Diagnose, oder die Patientinnen entwickeln diesen im Laufe der Erkrankung. Insbesondere bei chemotherapeutisch multipel vorbehandelten Patientinnen ergibt sich daraus unter Umständen das Dilemma, den Patientinnen in einer meist palliativen Situation, nebenwirkungsreiche Chemotherapeutika nur zur Reduktion des Aszites verabreichen zu müssen, oder die Patientinnen sind sogar in einem solchen Maße vorbehandelt, dass keine sinnvollen chemotherapeutischen Optionen mehr bestehen. Wiederholte Aszitespunktionen oder Aszitesdrainagen ermöglichen in dieser Situation eine Verbesserung der Lebensqualität. Diese sind für die Patientinnen aber meist unangenehm und mit einer nicht unerheblichen Komplikations- und Nebenwirkungsrate vergesellschaftet. Es erscheint logisch, bei einer Erkrankung, die sich intraperitoneal ausbreitet, Wirksubstanzen auch intraperitoneal (i.p.) zu verabreichen. Bisher vorliegende Daten zur i.p. Therapie zeigten aber eine erhebliche Morbidität mit nur fraglichem Vorteil für die Patientinnen. Mit der Entwicklung eines bispezifischen trifunktionellen Antikörpers gegen EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), welches bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom intraperitoneal nur auf Tumorzellen exprimiert wird, steht eine vollkommen neue Methode zur Verfügung diesen Patientinnen eine rein lokale Therapiemaßnahme anzubieten. Wir konnten zeigen, dass die intraperitoneale Applikation von Anti-EpCAM zu einer deutlichen Reduktion der Aszitesproduktion und zu einer signifikanten Abnahme der Punktionsbedürftigkeit führt. Es handelt sich bei dieser Untersuchung um die erste Studie zur i.p. Applikation eines EpCAM Antikörpers zur Aszitestherapie. Der Antikörper hat eine Zulassung erhalten und wird auch bei Aszites anderer Malignomerkrankungen eingesetzt.

Trotz deutlich verbesserter Operationstechniken und hoher Ansprechraten von ca. 75% auf die First-Line-Chemotherapie mit Paclitaxel und Carboplatin, entwickeln die meisten Patientinnen mit FIGO-Stadium III und IV ein Rezidiv oder eine Tumorprogression. Das Verständnis der Wirkmechanismen der Chemotherapeutika auf zellulärer Ebene kann hierbei, insbesondere bei der Entstehung von Resistenzen und deren Überwindung, von Bedeutung sein. Mit diesem Wissen lassen sich gegebenenfalls neue therapeutische Strategien, neue Medikamente oder auch der Einsatz bekannter Medikamente in anderen Indikationen erschließen (Mahner et al., 2015a).

Gerade bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom stellt eine primäre Resistenz gegen die Standardchemotherapie mit Carboplatin/Paclitaxel, oder die Entwicklung eines Rezidivs kurz nach Beendigung der primären Chemotherapie ein relativ häufiges Problem dar (Trillsch et al., 2016, Trillsch et al., 2021). Bei den meisten Chemotherapeutika wird der Zelltod über den intrinsischen Signalweg der Apoptose erreicht. Somit ergibt sich die Frage, ob alternative intrazelluläre Signalwege zur Therapie genutzt werden könnten, oder es Möglichkeiten gibt, über den extrinsischen Signalweg der Apoptose vorbehandelte oder chemoresistente Zellen in ihrem Wachstum zu hemmen oder abzutöten.

Es konnte von uns gezeigt werden, dass Bortezomib, ein in anderer Indikation zugelassener Proteasomenhemmstoff, auch bei Ovarialkarzinomzellen eine apoptotische Aktivität aufweist. Durch Untersuchung des Wirkmechanismus konnten wir zu dessen Verständnis beitragen und die fehlende Effektivität bestimmter Kombinationstherapien mit Bortezomib erklären. Die Untersuchungsbefunde zeigen einen synergistischen Effekt der Kombination von Bortezomib und gleichzeitiger Gabe eines Apoptose induzierenden TRAIL-Rezeptorantikörpers durch Hoch-Regulation des TRAIL-Rezeptors DR5 (TRAIL; (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)).

Auch bestimmte HIV-Medikamente wirken über den extrinsischen Signalweg der Apoptose und es konnte gezeigt werden, dass sie auch anti-tumorale Aktivität aufweisen. Daher untersuchten wir deren Wirkung an Ovarialkarzinomzellen. Wir konnten deren Effektivität nachweisen und mit tumorbiologischen Untersuchungen die Wirkmechanismen genauer erfassen. Hieraus lassen sich neue therapeutische Strategien für die Zukunft entwickeln.

## 2. Eigene Untersuchungen

### 2.1. Das PET-CT beim rezidierten Ovariakarzinom

Lenhard, M.S., **Burges, A.**, Johnson, T. R., Stieber, P., Kumper, C., Ditsch, N., Linke, R., Friese, K.: PET-CT in recurrent ovarian cancer: impact on treatment planning. *Anticancer Res*, 2008. 28(4C): p. 2303-8.

Lenhard, M. S., Nehring, S., Nagel, D., Mayr, D., Kirschenhofer, A., Hertlein, L., Friese, K., Stieber, P., **Burges, A.**: Predictive value of PET-CT imaging versus AGO-scoring in patients planned for cytoreductive surgery in recurrent ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2008.

Insbesondere in der Rezidivsituation ist die präoperative Abschätzung der potentiellen Resektabilität zur Planung der optimalen Therapie hilfreich. Während ältere Arbeiten auch bei Tumordebulking mit geringem verbleibendem Tumorrest einen Überlebensvorteil der Patientinnen zeigten, kann dies nach einer retrospektiven aktuelleren Untersuchung der Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie (AGO) in dieser Form nicht mehr bestätigt werden (Harter and du Bois, 2005, Harter et al., 2006). Ähnlich der Entwicklung in der Primärtherapie, scheint auch beim Rezidiv die Tumorfreiheit am Ende der Primär- bzw. Rezidiv- Operation der entscheidende Faktor für das Überleben der Patientinnen zu sein. In der genannten retrospektiven Untersuchung der AGO (Descriptive Evaluation of preoperative Selection KriTeria for OPerability in recurrent OVARian cancer; DESKTOP OVAR) konnte gezeigt werden, dass ein guter Performance Status zum Zeitpunkt der Rezidivoperation, ein niedriges Tumorstadium oder eine komplette Tumorresektion bei Erstoperation und das Fehlen von Aszites beim Rezidiv (sogenannter positiver AGO-Score), eine komplette Tumorresektion in der Rezidivsituation mit einer Wahrscheinlichkeit von 79% vorhersagen können (Harter et al., 2006). Auch für die Rezidivsituation konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von Peritonalkarzinose per se nicht die Prognose verschlechtert. Entscheidend ist, ob alle tumortragenden Herde bei der Rezidivoperation entfernt werden können (Harter, 2009). Der AGO Score wurde in der DESKTOP II-Studie erfolgreich prospektiv validiert (Harter, 2011), und in der DESKTOP III prospektiv randomisiert eingesetzt. AGO Score positive Patientinnen werden randomisiert in Operation mit anschließender 2nd line Chemotherapie vs. 2nd line Chemotherapie ohne operative Intervention. Damit kann in dieser Studie sowohl der Effekt

der Rezidivoperation auf das Überleben der Patientinnen überprüft werden, gleichzeitig aber auch ein mögliches Selektionskriterium für die Patientinnen evaluiert werden, die von der Operation profitieren. Nach derzeit vorliegenden präliminären Daten konnte bereits gezeigt werden, dass eine makroskopisch komplette Tumorresektion in der Rezidivsituation, gefolgt von platinhaltiger Chemotherapie ein besseres progressionsfreies Überleben (PFS) nach sich zieht, als eine alleinige Chemotherapie. Muss Tumor belassen werden, hat dagegen die Operation keinerlei Einfluss auf das PFS. Der Effekt auf das Gesamtüberleben (OAS) kann aufgrund der noch nicht abgeschlossenen Nachbeobachtung noch nicht beurteilt werden (Du Bois A., 2017).

Der AGO Score ist ein einfaches Werkzeug, um ubiquitär die Frage der Resektabilität in der Rezidivsituation abschätzen zu können. Fernmetastasierungen können damit allerdings übersehen werden. Wir überprüften daher zunächst die Wertigkeit des PET/CT in der Rezidivsituation.

Hierbei wurden 70 Patientinnen, bei denen klinisch oder laborchemisch der Verdacht auf ein Rezidiv bestand, in diese Untersuchung eingebracht und retrospektiv ausgewertet (Lenhard et al., 2008a). Bei 63/70 Patientinnen wurde im PET/CT der Verdacht auf ein Rezidiv gestellt. Davon zeigte das PET/CT bei 33 Patientinnen eine Tumorausdehnung, die eine operative Intervention nicht sinnvoll erschienen ließ. Bei 7 Patientinnen zeigte das PET/CT unauffällige Befunde, die sich auch im weiteren klinischen Verlauf über mindestens ein Jahr bestätigten. Bei zwei Patientinnen wurde die Indikation zu einem palliativen Eingriff gestellt. Von 24 Patientinnen, bei denen der Befund des PET/CT eine komplette Tumorresektion erwarten ließ, konnte dies bei 21 Patientinnen bestätigt werden. 3 Patientinnen wiesen eine im PET/CT nicht erwartete ausgedehnte Peritonealkarzinose auf, die eine komplette Tumorresektion unmöglich machte. Insgesamt zeigte die PET/CT Diagnostik für die Vorhersage der Resektabilität eine Sensitivität von 100% (95% CI: 84-100%) und Spezifität 66% (95 % CI: 30-92%). Das PET/CT war bei Verdacht auf Rezidiv sehr verlässlich hinsichtlich der Rezidivdiagnostik, konnte die intraoperativ gefundenen Befunde sehr gut vorhersagen und hatte einen entscheidenden Einfluss auf die Therapieentscheidung. Eine Peritonealkarzinose wird im PET/CT jedoch nicht mit ausreichender Sicherheit detektiert. Diese Erfahrungen wurden auch von anderen Untersuchungen bestätigt (Bilici et al., 2010, Palomar et al., 2011, Murakami et al., 2006, Garcia-Velloso et al., 2007, Fagotti et al., 2008).

In einer weiteren Analyse wurde die PET/CT Untersuchung mit dem AGO-Score hinsichtlich der möglichen Vorhersage einer makroskopisch kompletten Tumorresektion verglichen (Lenhard et al., 2008b). 33 Patientinnen konnten in diese Untersuchung eingebracht werden. Im PET/CT wurde bei 31/33 Patientinnen der V.a. ein Rezidiv gestellt. Bei zwei Patientinnen bestätigte sich im weiteren Verlauf, dass kein Tumorrezidiv zum Zeitpunkt der Untersuchung vorlag. Auf Grund der Befunde wurde bei 16 Patientinnen eine operative Intervention durchgeführt, hiervon bei drei Patientinnen aus palliativer Indikation. 13 Patientinnen wurden im PT/CT als komplett resektabel eingestuft und dies konnte bei 11 Patientinnen operativ bestätigt werden. Zwei Patientinnen wiesen eine im PET/CT nicht detektierte, operativ nicht resektable ausgedehnte Peritonealkarzinose auf.

14 Patientinnen hatten einen positiven AGO Score. Dieser konnte bei 8 von 16 operierten Patientinnen bestätigt werden und war auch bei 4 Patientinnen richtig negativ. Allerdings wies eine AGO Score positive Patientin eine ausgedehnte Peritonealkarzinose auf und 3 Patientinnen mit Aszites, welcher nach dem AGO Score als inoperabel eingestuft wurden, konnten trotzdem makroskopisch tumorfrei operiert werden.

Insgesamt ergaben sich für die PET/CT eine Sensitivität von 100% (95% C.I. 72-100%) und Spezifität von 60% (95% C.I. 15-94%). Für den AGO Score entsprechend eine Sensitivität von 73% (95% C.I. 39-94%) und eine Spezifität von 80% (95% C.I. 29-97%). Die besten operativen Ergebnisse ergaben sich für die Patientinnen, bei denen sowohl AGO Score, als auch PET/CT eine maximale Resektabilität vermuten ließen (Sensitivität von 100% (95% C.I. 63-100%), Spezifität von 75% (95% C.I., 20-96%).

Unsere Untersuchung konnte die guten Erfahrungen mit der PET/CT in der Rezidivsituation bestätigen. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass der AGO Score fälschlicherweise Patientinnen als inoperabel einstuft, die sich als operabel herausstellten. Bei der Konzeption des DESKTOP-Studien Protokolls wurde eine Cut Off von 75% für die richtige Vorhersage einer makroskopisch kompletten Resektion zu Grunde gelegt. Es wurde bewusst in Kauf genommen, dass ein negativer AGO-Score die makroskopisch komplette Resektion nicht zwingend ausschließt, was in der klinischen Anwendung des Scores außerhalb einer Studie natürlich beachtet werden muss. Die Kombination aus AGO-Score und PET/CT zeigte die besten Resultate hinsichtlich der Vorhersagbarkeit einer kompletten Tumorresektion. Der AGO Score ist einfach und ohne zusätzliche apparative Diagnostik anwendbar, kann aber keine

Fernmetastasierungen erfassen. Die PET/CT dagegen ist relativ kostenintensiv, strahlenbelastend und nicht überall verfügbar. Das Vorhandensein von Peritonealkarzinose stellte sich erneut als diagnostisches Problem heraus.

## 2.2. Hormonrezeptoren beim Ovarialkarzinom

**Burges A.**, Bruning, A., Dannenmann, C., Blankenstein, T., Jeschke, U., Shabani, N., Friese, K., Mylonas, I.: Prognostic significance of estrogen receptor alpha and beta expression in human serous carcinomas of the ovary. Arch Gynecol Obstet. 2010 Mar; 281(3): p. 511-7.

Hormonrezeptoren, insbesondere der Östrogenrezeptor, sind von besonderem Interesse, da das Ovar das Hauptorgan der Hormonproduktion darstellt (Britt and Findlay, 2002). Darüber hinaus zählen Adipositas und das polyzystische Ovar-Syndrom, die mit einer Beeinflussung der Hormonspiegel einhergehen, zu den Risikofaktoren für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms. Ovulationshemmer haben dagegen eine protektive Wirkung. Der Einfluss von Hormonersatztherapie (HRT) auf das Risiko eines Ovarialkarzinoms wurde bisher kontrovers beurteilt (Morch et al., 2009). Insgesamt scheint aber der Einfluss des Östrogenrezeptors auf die Entstehung eines Ovarialkarzinoms geringer zu sein, als beim Mammakarzinom (Colombo et al., 2006, Cunat et al., 2004).

Ovarialkarzinome weisen Östrogenrezeptoren (ER) in etwa 56-62% und Progesteronrezeptoren (PR) in 48-66% auf. Immunhistochemisch finden sich ER in etwa 38 % und PR in 31 % (Arias-Pulido et al., 2009, Kommos et al., 1992).

Die Daten in der Literatur zu ER/PR als Prognosefaktor sind uneinheitlich. Arias-Pulido et al. fanden beispielsweise in multivariater Analyse eine signifikante prognostische Bedeutung von ER/PR (Arias-Pulido et al., 2009), Garcia-Velasco et al. lediglich für ER (Garcia-Velasco et al., 2008). Wohingegen Tangjitgamol et al. nur für PR und nur in der univariaten Analyse, nicht aber in der multivariaten Analyse eine signifikante Bedeutung beschreiben. ER oder Kombinationen von ER/PR Subgruppen zeigten in ihrer Untersuchung keinerlei prognostische Bedeutung (Tangjitgamol et al., 2009).

Es existieren zwei Isoformen des Östrogenrezeptors. Östrogenrezeptor alpha (ER- $\alpha$ ) und der erst später identifizierte Östrogenrezeptor beta (ER- $\beta$ ) (Cunat et al., 2004). Es gibt Hinweise darauf, dass Polymorphismen des ER- $\beta$  durch Regulation von Proliferation und Apoptose das Ovarialkarzinom-Risiko entscheidend beeinflussen könnten (Lurie et al., 2009). Die Gewebeverteilung von ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  ist unterschiedlich und man geht davon aus, dass die unterschiedliche Bindungskapazität der beiden Isoformen eine differenzierte Hormonantwort des Gewebes auf den gleichen Hormon Agonist ermöglicht (Koehler et al., 2005, Zhao et al., 2008). Auf Proteinebene wurde beobachtet, dass eine verringerte Expression von ER- $\beta$  mit einem schlechteren Überleben von Patientinnen einhergeht (Chan et al., 2008). Eine weitere Untersuchung konnte ebenfalls eine verminderte Transkription von ER- $\beta$  durch PCR zeigen. Die Verringerung von ER- $\alpha$  war sogar bei serös-papilären Karzinomen noch ausgeprägter, nicht jedoch bei endometroiden Ovarialkarzinomen (Geisler et al., 2008). Da die Untersuchungen auf transkriptionaler Ebene erfolgten war unser Ziel die ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  Expression immunhistochemisch an 100 Patientinnen mit serös-papilärem Ovarialkarzinom zu bestimmen und die mögliche prognostische Bedeutung der Östrogenrezeptoren zu erfassen. Hierzu wurden 100 Schnitte von Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom retrospektiv untersucht. Die Spezifikationen der Patientinnen ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

	N=100 n	ER- $\alpha$			ER- $\beta$		
		Negative	Positive	p	Negative	Positive	p
Alter							
≤61 Jahre	54	34 (63.0%)	20 (37.0%)	NS	12 (22.2%)	42 (77.8%)	NS
>61 Jahre	46	34 (73.9%)	12 (26.1%)		11 (23.9%)	35 (76.1%)	
PT							
pT 1	17	11 (64.7%)	6 (35.3%)	NS	1 (5.9%)	16 (94.1%)	NS
pT 2	9	4 (44.4%)	5 (55.6%)		3 (33.3%)	6 (66.7%)	
pT 3	73	52 (71.2%)	21 (28.8%)		19 (26.0%)	54 (74.0%)	
Fehlende	1	1 (100%)	0 (0%)		0 (0%)	1 (100%)	
pN							
Negativ	22	14 (63.6%)	8 (46.4%)	NS	0 (0%)	22 (100%)	0.006
Positiv	49	32 (65.3%)	17 (34.7%)		12 (24.5%)	37 (75.5%)	

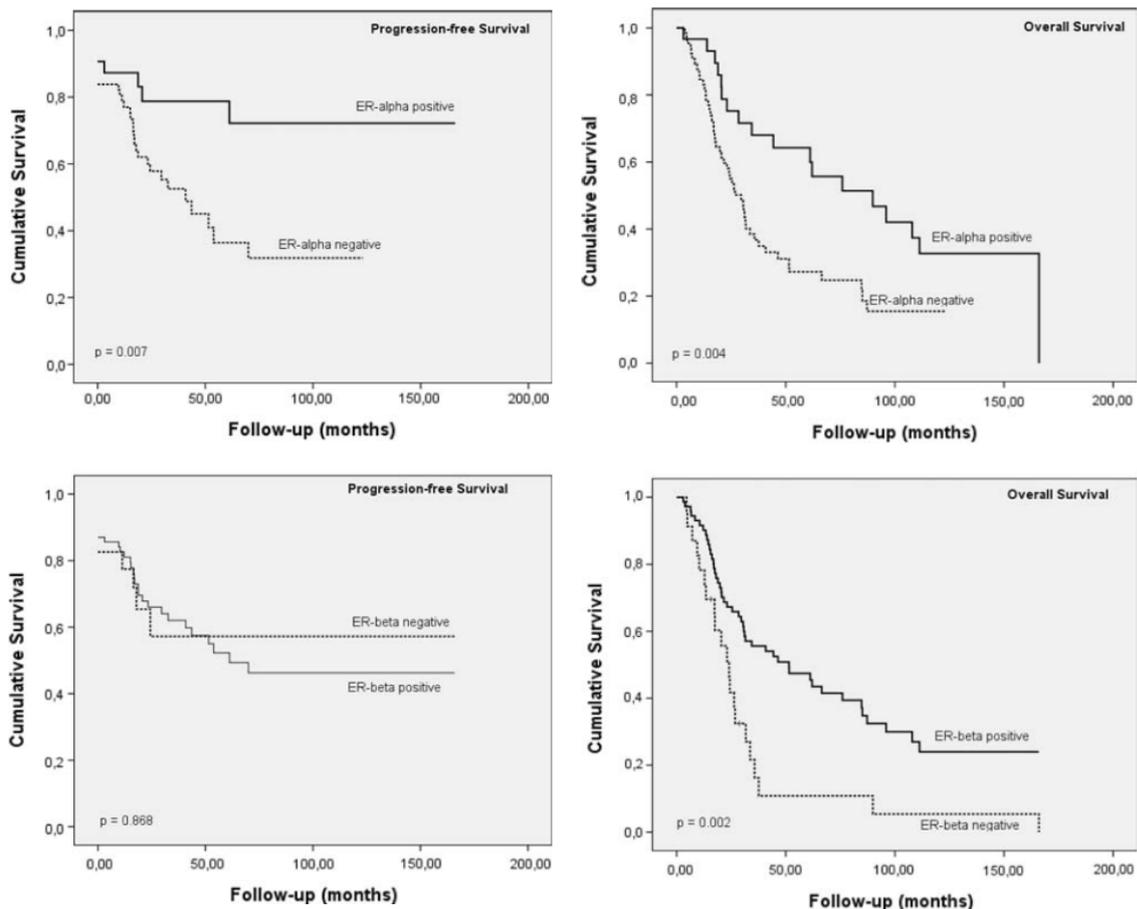
unbekannt	30	22 (75.9%)	7 (24.1%)		11 (37.9%)	18 (62.1%)	
pM							
keine Metastasen	95	65 (68.4%)	30 (31.6%)	NS	22 (23.2%)	73 (76.8%)	NS
Metastasen	5	3 (60%)	2 (40%)		1 (20%)	4 (80%)	
Grading (WHO)							
Grade 1	23	10 (43.5%)	13 (56.5%)	0.004	2 (8.7%)	21 (91.3%)	NS
Grade 2	38	30 (78.9%)	8 (21.1%)		9 (23.7%)	29 (76.3%)	
Grade 3	35	27 (77.1%)	8 (22.9%)		12 (34.2%)	23 (65.7%)	
unbekannt	4	1 (25%)	3 (75%)		0 (0%)	4 (100%)	
FIGO							
FIGO I	10	7 (70%)	3 (30%)	NS	0 (0%)	10 (100%)	NS
FIGO II	5	2 (40%)	3 (60%)		1 (20%)	4 (80%)	
FIGO III	80	56 (70%)	24 (30%)		21 (26.2%)	59 (73.8%)	
FIGO IV	5	3 (60%)	2 (40%)		1 (20%)	4 (80%)	
Chemotherapie							
Keine Chemotherapie	18	10 (55.6%)	8 (44.4%)	NS	7 (38.9%)	11 (61.1%)	0.003
Chemotherapie	81	57 (70.4%)	24 (29.6%)		15 (18.5%)	66 (81.5%)	
abgelehnt	1	1 (100%)	0 (0%)		1 (100%)	0 (0%)	

**Tabelle 1:** Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen (ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  negativ, positiv) für Alter, TNM, Grading, FIGO, Chemotherapie

Positive immunohistochemische Reaktion für ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  konnten bei 32 (32%) bzw. 48 (48%) der serösen Ovarialkarzinome gezeigt werden. Die Expression von ER- $\alpha$  zeigte eine signifikante Assoziation mit dem Grading der Tumorzellen ( $p=0,004$ ), wohingegen ER- $\beta$  mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen ( $p=0,006$ ) und dem Einsatz einer Chemotherapie ( $p=0,033$ ) assoziiert war. Gleichzeitig zeigte die Anfärbung von ER- $\alpha$  in allen Tumorproben eine signifikante Korrelation mit der Färbung von ER- $\beta$  (Spearman Test:  $p<0,05$ ).

Die mediane Überlebenszeit betrug nach Diagnosestellung 41,1 Monate (Range 3,1 – 111,23 Monate). In der univariaten Analyse zeigten Patientinnen mit ER- $\alpha$  Expression einen Vorteil im progressionsfreien Überleben gegenüber Patientinnen ohne ER- $\alpha$  Expression ( $p=0,007$ , log rank Test) (Abbildung: 1). Dagegen hatte die Expression von ER- $\beta$  keinen Einfluss auf das

progressionsfreie Überleben. ( $p=0,868$ ). ER- $\alpha$  negative Patientinnen hatten auch ein signifikant schlechteres erkrankungsspezifisches Überleben ( $p<0,001$ , log-rank Test), wohingegen die Expression von ER- $\beta$  keinen Unterschied im erkrankungsspezifischen Überleben zeigte ( $p=0,152$ , log-rank Test).



**Abbildung 1:** Kaplan–Maier Kurven: Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben nach ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  Expression

Im multivariaten Cox Proportional-Hazard Model wurden mit dem schrittweisen logistischen Regressionsmodell die Variablen: Alter, FIGO Stadium, pathologisches Tumorstadium, Grading, Lymphknotenstatus, Chemotherapie, ER-  $\alpha$  und ER- $\beta$  Status untersucht. Die schrittweise Elimination nach den Ergebnissen des Cox Regressions-Modells zeigten zwei Variablen, die prädiktiv für das progressionsfreie Überleben waren: FIGO Stadium ( $p<0,001$ ) und ER- $\alpha$  Expression ( $p<0,001$ ) (Tabelle x). Unabhängige Prognosefaktoren für das erkrankungsspezifische Überleben waren Alter ( $p<0,05$ ), pathologisches Tumorstadium ( $p<0,001$ ) und ER- $\alpha$  Expression ( $p<0,005$ ). Für das Gesamtüberleben waren in der

multivariaten Analyse die Variablen Alter ( $p < 0,05$ ), pathologisches Tumorstadium ( $p < 0,001$ ), ER- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) und ER- $\beta$  ( $p < 0,05$ ) Expression signifikant (Tabelle 1).

	Progressionsfreies Überleben			Krankheitsspezifisches Überleben			Gesamtberleben		
	RR	CI (5-95%)	p	RR	CI (5-95%)	p	RR	CI (5-95%)	p
Alter				1.908	1,046-3,481	<0.05	1.794	1.089-2.955	<0.05
FIGO Stadium	3.925	1.710-9.009	<0.001					1.168-1.637	
pT				1.413	1.161-1.720	0.001	1.383	0.292-0.971	<0.001
ER- $\alpha$	0.303	0.130-0.704	0.006	0.309	0.137-0.697	0.005	0.533	0.331-0.974	<0.05
ER- $\beta$							0.568		<0.05

**Tabelle 2:** Hazard Ratio nach der multivariaten Cox Regressions Analyse

Die Ergebnisse zeigen, dass bei serös-papillären Ovarialkarzinomen eine signifikante Assoziation der ER- $\alpha$  Expression mit dem Tumor-Grading, dem progressionsfreien Überleben und dem erkrankungsspezifischen Überleben besteht. Die Expression von ER- $\beta$  scheint einen Zusammenhang mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen zu haben. Interessanterweise konnte eine Korrelation der Expression beider Rezeptoren gezeigt werden, was nahelegt, dass der verminderten Expression beider Rezeptoren ähnliche Mechanismen zugrunde liegen, obwohl sie auf verschiedenen Genloci lokalisiert sind.

Trotz aller Ähnlichkeiten in der Regulation der Transkription der Rezeptoren zeigten sich dennoch klinisch signifikante Unterschiede. So konnte eine Korrelation der ER- $\beta$  Expression mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen gezeigt werden. Im Gegensatz zu ER- $\alpha$ , wurde für ER- $\beta$  eine mögliche Funktion als Tumor-Suppressor Protein vermutet (Lazennec, 2006). Eine Überexpression von ER- $\beta$ -cDNA in SKOV-3 Ovarialkarzinomzellen führt zu Veränderungen in der Zellzyklus-Progression und Tumorzell- Migration (Treeck et al., 2007). Eine Überexpression von ER- $\beta$  bei SKOV-3 Zellen resultiert in einer verminderten Zellmigration. Daher könnte die verstärkte Migration durch Verlust der ER- $\beta$  Expression den Zusammenhang der Korrelation mit der Lymphknotenmetastasierung erklären. Unsere

Befunde decken sich mit den Ergebnissen zweier Studien, die die Östrogenrezeptor Expression durch PCR Analyse untersucht haben (Chan et al., 2008, Geisler et al., 2008) und keinen Unterschied der Regulation des Östrogenrezeptors von der Transkription zur Translation gefunden haben. Zwei Untersuchungen, die die Expression von ER- $\alpha$  und des Progesteronrezeptors, nicht aber ER- $\beta$  untersuchten, konnten eine verstärkte Expression von ER- $\alpha$  und Progesteronrezeptor bei hoch differenzierten Tumoren und ein besseres Überleben der Patientinnen zeigen, deren Tumoren immunhistochemisch ER- $\alpha$  und PR positiv waren (Wong et al., 2007, Hogdall et al., 2007). Der Verlust der ER- $\alpha$  Rezeptor Positivität ging mit einem schlechteren Überleben von Patientinnen mit serös-papilärem Ovarialkarzinom einher. Die Expression von ER- $\beta$  hatte keinen Zusammenhang mit dem krankheitsspezifischen Überleben. Wir konnten aber beobachten, dass ER- $\alpha$  Positivität einen statistisch signifikanten und unabhängigen Prognosefaktor für das krankheitsspezifische Überleben darstellte. Die immunhistochemische Bestimmung des ER- $\alpha$  Rezeptors könnte als einfache und effiziente Methode zur Identifizierung von Hochrisiko Patientinnen eingesetzt werden, die möglicherweise von einer Modifikation der Therapie profitieren. Darüber hinaus könnte ER- $\alpha$  positiven Patientinnen eine spezifische Antihormonelle Therapie angeboten werden (Smyth et al., 2007).

### **2.3. Neue zielgerichtete Therapieansätze beim Ovarialkarzinom**

Brüning A, Burger P, Vogel M, Rahmeh M, Friese K, Lenhard M, **Burges A.**: Bortezomib treatment of ovarian cancer cells mediates endoplasmic reticulum stress, cell cycle arrest, and apoptosis. Invest New Drugs. 2009 27:543–551

Brüning A, Burger P, Vogel M, Rahmeh M, Gingelmaiers A, Friese K, Lenhard M, **Burges A.**: Nelfinavir induces the unfolded protein response in ovarian cancer cells, resulting in ER vacuolization, cell cycle retardation and apoptosis. Cancer Biol Ther. 2009 Mar 3;8(3).

Brüning A, Vogel M, Burger P, Rahmeh M, Gingelmaier A, Friese K, Lenhard M, **Burges A.**: Nelfinavir induces TRAIL receptor upregulation in ovarian cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 2008 Dec 26;377(4):1309-14.

Brüning A, Burger P, Vogel M, Gingelmaier A, Friese K, **Burges A.**: Nelfinavir induces mitochondria protection by ERK1/2-mediated mcl-1 stabilization that can be overcome by sorafenib. *Invest New Drugs*, 2010 28:535–542.

Bortezomib (PS 341, Velcade®), ein Proteasomenhemmstoff, hat eine Zulassung in der Therapie des multiplen Myeloms und ist der erste Vertreter einer Substanzklasse, die über eine Stabilisierung von Zellzyklus-Proteinen und Blockade der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB (nuklear factor-kappa B) vor allem einen proapoptotischen Effekt ausüben. NF-κB ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, der durch eine Gruppe von zytosolischen NF-κB Inhibitoren (IκB) im Zytosol retiniert werden kann. Der Ubiquitin-Proteasome Signalweg reguliert die Expression von IκB (Fribley and Wang, 2006). Die Hemmung dieses Signalweges durch Bortezomib stellt daher eine interessante therapeutische Option dar.

Es liegen einige Studiendaten zur Applikation von Bortezomid bei soliden Tumoren, sowohl als Monotherapie, als auch als Kombinationstherapie, mit zum Teil vielversprechenden, aber auch widersprüchlichen Ergebnissen vor (Aghajanian et al., 2009, Ramirez et al., 2008, Ryan et al., 2006, Dy et al., 2005, Milano et al., 2007).

Wir untersuchten daher den Effekt von Bortezomib an platin-sensiblen und -resistenten Ovarialkarzinomzelllinien (SKOV3; OVCAR3), sowie an frischen Gewebeproben als Monotherapie und in Kombination mit Carboplatin, Paclitaxel oder TRAIL (Tumor Nekrose Faktor assoziierter Apoptose induzierender Ligand, tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand). Bortezomib bewirkte eine deutliche Zunahme der Apoptose in Ovarialkarzinomzellen. Dieser ging eine Zunahme des endoplasmatischen Reticulum Stress Sensors ATF3 und eine Zunahme von endoplasmatischen heat shock Proteinen (hsp32, hsp70) voraus. Bortezomib verstärkte die Sensitivität sowohl von Ovarialkarzinomzelllinien, als auch frischem Tumorgewebe gegenüber dem Apoptose induzierendem TRAIL Rezeptor Antikörper durch vermehrte Expression des TRAIL Rezeptors DR5. Die Gabe des anti-TRAIL Rezeptor Antikörpers alleine, ohne Bortezomib hatte keinen Einfluß auf die OVCAR3 und SKOV3 Zellen.

Im Gegensatz zu den synergistischen Effekten, die wir bei TRAIL feststellen konnten, wurde die Effektivität von Paclitaxel durch Bortezomib reduziert. Bortezomib verhinderte die Akkumulation der taxan- behandelten Zellen in der G2/M Phase. Stattdessen bewirkte

Bortezomib alleine, oder in Kombination mit Paclitaxel einen Zellzyklusarrest in der S Phase und eine verminderte Aktivität von CDK 1, einer Zyklin-abhängigen Kinase, die für den Eintritt in die M Phase notwendig ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die durch endoplasmatisches Retikulum Stress induzierte Apoptose, die durch missgefaltete Proteine entsteht, eine anderen unabhängigen Apoptoseweg neben dem klassischen, durch DNA Schaden oder extrazelluläre Liganden bedingten, darstellt (Benz et al., 2007, Fribley and Wang, 2006). Die auffälligste Veränderung bei den Apoptose-assoziierten Proteinen, die wir nach Bortezomib-Therapie feststellen konnten, war die vermehrte Aktivität einiger Zell-Stress assoziierter Proteine (ATF3, hsp32, hsd70). Die Anhäufung poly-ubiquitinerter Proteine im Zytosol oder dem Endoplasmatischen Retikulum ist eventuell Folge des verminderten Abbaus durch die Bortezomib-inhibierten Proteasomen. Die Akkumulation der Proteine führt zu einem unfolded-Protein Response (UPR), der zu Zellzyklusarrest und Apoptose führen kann (Fribley and Wang, 2006, Benz et al., 2007).

Daraus lässt sich auch erklären, warum Bortezomib auch bei platinresistenten Zellen einen positiven Effekt entwickeln kann. Zu ähnlichen Ergebnissen hinsichtlich eines Zusammenhangs von Proteasomeninhibitoren und TRAIL kam auch die Gruppe um Saule. Sie gingen bei ihren in vitro Versuchen allerdings von einer TRAIL Resistenz aus, die durch Bortezomib durchbrochen werden könne (Saulle et al., 2007). Wir haben die Befunde allerdings eher dahingehend interpretiert, dass erst die Behandlung mit Bortezomib eine TRAIL Therapie sinnvoll erscheinen lässt, da Bortezomib die Sensitivität gegenüber TRAIL herbeiführt. Unsere Ergebnisse werden durch die Arbeit von Pasquini gestützt. Er konnte mit seinen Mitarbeitern ebenfalls eine pro-apoptotische Wirkung von Bortezomib, sowohl an platin-sensiblen, wie – resistenten Ovarialkarzinomzellen nachweisen (Pasquini et al., 2010). Dieser Effekt wurde durch die Gabe von TRAIL, TRAILR1 (Mapatumumab, ein humaner monoklonaler AK gegen den zu TNF zugehörigen Apoptose-induzierenden Ligand-Rezeptor-1; Mapatumumab wirkt als TRAIL Rezeptor Agonist und induziert Apoptose) oder TRAILR2 agonisierendem mAK (Lexatumumab) noch verstärkt.

Diese Ergebnisse sind insbesondere auch deshalb interessant, da in einer Phase I Studie Mapatumumab eine relativ gute Verträglichkeit zeigte. In dem gemischten Patientinnenkollektiv dieser Studie konnten zwar keine objektiven Ansprechraten, aber

immerhin bei 12/41 Patientinnen ein stable Disease bis zu 29 Monaten gezeigt werden (Hotte et al., 2008). Auch für Lexatumumab liegen entsprechende Phase I Daten vor (Wakelee et al., 2010). Die Effektivität und der potentielle Nutzen einer TRAIL Therapie konnte auch von anderen Untersuchern gezeigt werden (Kendrick et al., 2007, Estes et al., 2007, Kendrick et al., 2008, Frederick et al., 2009).

Das darüber hinaus entscheidende Ergebnis unserer Untersuchung ist der nachgewiesene antagonistische Effekt von Bortezomib und Paclitaxel. Mit unseren Ergebnissen sind der ausgebliebene Effekt auf die Ansprechrate in einer Phase II Studie in der Kombination von Bortezomib und Docetaxel bei Patientinnen mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und einer Phase I Studie in der Kombination Bortezomib und Paclitaxel bei verschiedenen soliden Tumoren erklärbar (Fanucchi et al., 2006, Cresta et al., 2008). Der mögliche Mechanismus wurde zwar bereits diskutiert (Milano et al., 2007), konnte bisher aber nicht erklärt werden. Wir konnten allerdings zeigen, dass Bortezomib die Akkumulation der Zellen in der G2/M Phase verhindert, welche aber für die Wirksamkeit von Taxanen Voraussetzung ist. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass Bortezomib die Aktivität von CDK 1 verringert, welches für den Eintritt der Zellen in die M Phase notwendig ist. Damit wird der apoptotische Effekt von Paclitaxel, der mitotische Spindelarrest, verhindert.

Es liegen die Ergebnisse von zwei Phase I Dosisfindungsstudien, zur Kombinationstherapie aus Bortezomib und Carboplatin (AUC 5) vor (Aghajanian et al., 2005, Ramirez et al., 2008). Beide definierten eine Bortezomib Dosis von 1,3 mg/m<sup>2</sup> Tag 1, 4, 8 und 11 für künftige Studien, wie sie auch in der Therapie des multiplen Myeloms verabreicht wird (Aghajanian et al., 2005). In einer Phase II Studie wurde daraufhin Bortezomib als Monotherapie in zwei unterschiedlichen Dosierungen (1,3mg/m<sup>2</sup> vs. 1,5 mg/m<sup>2</sup>) getestet und die Dosierung von 1,3 mg/m<sup>2</sup> auch für die Monotherapie bestätigt (Aghajanian et al., 2009). Die berichteten Ansprechraten waren allerdings sowohl in der Monotherapie, wie auch in der Kombinationstherapie mit Carboplatin sehr gering.

In vitro konnte der synergistische Effekt von Bortezomib und Carboplatin sowohl bei den platin-sensiblen, wie auch bei –resistenten Tumorzelllinien erst nach der Gabe des anti-TRAIL-R AK gezeigt werden.

HIV Protease Inhibitoren werden als möglicher Ansatzpunkt anti-tumoraler Therapien diskutiert (Cohen, 2007). Ihre Wirkung beruht auf der Verhinderung der Spaltung viraler Vorläuferproteine durch Bindung an die HIV-Protease (Mitsuya et al., 2008, Mastrolorenzo et al., 2007). Der exakte Wirkmechanismus der Protease-Inhibitoren auf Tumorzellen ist bisher nicht vollkommen aufgeklärt. Die Kombination aus Proteasom-Inhibierung, Induktion von Zellstress, Einfluss auf Zell-Signalkaskaden und Autophagie scheint wahrscheinlich (Gills et al., 2008, Bernstein and Dennis, 2008). Medikamente, die endoplasmatischen Retikulum Stress, zelluläre Vakuolisierung und Autophagie induzieren, wirken auf Tumorzellen über andere Mechanismen letal, als den klassischen intrinsischen Apoptoseweg (Gills et al., 2008, Gills et al., 2007). Die Wirkung von Carboplatin und Paclitaxel, der Standard-Chemotherapie bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom, erfolgt dagegen über Destabilisierung der Mitochondrien-Membran und Aktivierung von Caspasen, den intrinsischen Weg der Apoptose (Jin and El-Deiry, 2005). Gleichzeitig ist die Aktivierung von Caspasen aber auch ein entscheidender Schritt beim extrinsischen Weg der Apoptose. Diese wird durch extrazelluläre Liganden, wie FasL, TNF (Tumornekrose Faktor) oder TRIAL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) stimuliert (Jin and El-Deiry, 2005). Dieser mögliche alternative Angriffspunkt von HIV Protease Inhibitoren könnte einen therapeutischen Ansatz für Patientinnen mit Ovarialkarzinom bedeuten. Insbesondere, da Patientinnen mit Ovarialkarzinom häufig eine Resistenz gegen die Chemotherapeutika Carboplatin/Paclitaxel entwickeln.

Wir untersuchten daher zunächst den Effekt dreier unterschiedlicher HIV Protease Inhibitoren (Nelfinavir, Lopinavir und Saquinavir) auf die Ovarialkarzinomzelllinien SKOV3 (platinsensibel; p53 Wildtyp), OVCAR3 (platinresistent; p53 mutiert) und A2780 (platinsensibel; p53 Wildtyp), die sich hinsichtlich ihrer Chemoresistenz und des p53 Mutationsstatus unterscheiden. Darüber hinaus wurden die Untersuchungen auch an eigenen Zelllinien (OVGH-1, Carboplatin-resistente Zelllinie; OV-GH-5, Carboplatin-sensitive Zelllinie) und frischem Tumorgewebe von Platin-naiven Patientinnen und Patientinnengewebe aus Rezidiv-Operationen durchgeführt.

Nelfinavir war von den untersuchten Protease Inhibitoren am effektivsten. Dieses Ergebnis wird auch durch eine Arbeit von Gills unterstützt, in welcher bei einem Vergleich unterschiedlicher Protease Inhibitoren ebenfalls Nelfinavir als die aktivste Substanz von 6 untersuchten HIV Protease Inhibitoren charakterisiert wurde (Gills et al., 2007). Die Effektivität von Nelfinavir zeigte sich sowohl bei den platinsensiblen, als auch

platinresistenten Tumorzellen, unabhängig vom p53 Mutationsstatus der Tumorzellen, was uns in der Annahme eines durch Nelfinavir induzierten dritten Signalweges der Apoptose bestärkte. Gleichzeitig konnten wir beobachten, dass Nelfinavir keinen Einfluss auf die Vitalität von Fibroblasten oder peripheren Blutmonozyten hatte, was für die klinische Anwendung von Relevanz sein könnte.

Die Wirkungsweise von Nelfinavir ist nicht abschließend geklärt. Apoptose, Nekrose und Autophagie scheinen eine Rolle zu spielen (Gills et al., 2008). FACS analytisch konnten wir durch Annexin-Bindung und Propidium-Jodid sehen, dass Apoptose und Nekrose beteiligt zu sein scheinen. Im Westernblot konnte die Aktivierung von PARP und eine Aktivierung der Caspase 3 nachgewiesen werden. Die bei Nelfinavir behandelten Tumorzellen beobachtete starke Vakuolisierung, insbesondere der OVCAR3 Zellen kann als Zeichen von Autophagie gewertet werden (Pyrko et al., 2007). Der Nachweis von BiP (GRP78), einem Mitglied der hsp70 heat shock Familie, in den Vakuolen nach Nelfinavir-Behandlung weist das endoplasmatischen Retikulum als ihren Ursprung aus. Liposomen oder geschwollene Lysosomen konnten als möglicher Ursprung mit Nil-Rot und Lyso-Tracker ausgeschlossen werden.

Stress des endoplasmatischen Retikulums kann über Aktivierung des eIF2 zu Zell-Zyklus Arrest und Apoptose führen (Pyrko et al., 2007). Die Behandlung der Zellen mit Nelfinavir resultierte insbesondere bei OVCAR3 Zellen in einer Zunahme der Phosphorylierung von eIF2, die durch den unspezifischen Protease Inhibitor Pefabloc weitgehend verhindert werden konnte.

Die Hochregulation von BiP und Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  weisen auf eine Induktion des „unfolded protein response“ hin (Kouroku et al., 2007), der Zellzyklusarrest und Apoptose bewirken kann. Der Zellzyklusarrest und unfolded protein response mit konsekutiver Erhöhung der BiP Aktivität stellen per se Schutzmechanismen der Zelle gegen ER Stress da (Ogata et al., 2006). Ist die Zelle diesem Stress aber länger ausgesetzt schlägt der protektive Effekt in Apoptose um. Tatsächlich zeigte sich, dass bei längerer Expositionszeit der Zellen mit Nelfinavir die Zahl apoptotischer und nekrotischer Zellen zunahm. Wie aus den Erfahrungen von der Therapie bei HIV-Patientinnen bekannt ist, kann Nelfinavir auch über längere Zeiträume ohne wesentliche Nebenwirkungen eingenommen werden (Perry et al., 2005).

Um den Wirkmechanismus von Nelfinavir besser zu verstehen, untersuchten wir zusätzlich den Einfluss von Nelfinavir auf die Expression Apoptose-relevanter Proteine an A2780-Zellextrakten. Hierbei zeigte sich, dass die meisten Apoptose-relevanten Proteine, einschließlich der bcl-Familie unbeeinflusst blieben. Die Aktivität der Caspase3 jedoch nach Nelfinavir deutlich zugenommen hat. Dies zeigt, dass Nelfinavir die Apoptose auf einem bisher nicht bekannten, nicht-klassischen Weg aktiviert.

Bei der Behandlung der Tumorzellen mit Nelfinavir wurde ein verminderter Effekt der Taxan-Wirkung, ähnlich dem Effekt der Behandlung mit Bortezomib, festgestellt. Auch hier könnte das Problem in einem Interferieren der Wirkung von Taxol und dem durch Nelfinavir-Behandlung induzierten Zell-Zyklus Arrest liegen. Daher wurden die Expression der für den Zellzyklus relevanten Proteine untersucht. Im Westernblot zeigte sich eine frühe und starke Suppression von Cyclin D3, Cyclin A, Cyclin-abhängiger Kinase1 (CDK 1) und PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). Analog unseren Ergebnissen mit Bortezomib lässt sich damit die Interferenz einer Therapie mit Nelfinavir und Taxan erklären. Ein Nelfinavir induzierter Zellzyklus-Arrest konnte auch an Melanom-Zellen nachgewiesen werden (Jiang et al., 2007).

Zusätzlich wurde eine vermehrte Expression des TRAIL-Rezeptors2 (DR5), als Hinweis auf eine Sensibilisierung durch Nelfinavir, festgestellt. Dieser Effekt wurde an den Zelllinien A2780 und OVGH5 anhand eines ATP-Assays bestätigt. Sowohl Bortezomib, wie auch Nelfinavir können Tumorzellen gegenüber einer TRAIL-Therapie sensibilisieren.

Ein zytotoxischer Effekt von Nelfinavir auf Tumorzellen konnte auch in den Kombinationen Nelfinavir/Zyclooxygenase-2 Hemmer (Celecoxib; Celebrex ©) bzw. Nelfinavir und Tamoxifen bei Mammakarzinom-Zelllinien nachgewiesen werden (Cho et al., 2009, Bruning et al., 2010).

Nelfinavir wurde auch als Radiosensitizer bei Patienten mit Pankreaskarzinom eingesetzt. Die Ergebnissen sind vielversprechend hinsichtlich Aktivität und Toxizität (Brunner et al., 2008).

Zur Klärung der Frage des Ursprunges der beschriebenen Vakuolen nach einer Therapie mit Nelfinavir, wurde auch die mögliche Beteiligung der Mitochondrien untersucht. Hierbei stellten sich die Mitochondrien-Membranen intakt dar und das für die Integrität des äußeren Mitochondrien-Membran Potentials wichtige protektive Protein mcl-1 war deutlich erhöht.

Das bedeutet, dass neben den pro-apoptischen Effekten der Nelfinavir-Therapie auch anti-apoptische Effekte nachgewiesen werden konnten.

Die Nelfinavir induzierte Apoptose scheint damit von den Mitochondrien unabhängig zu sein und in gewisser Weise einen protektiven Effekt auf Mitochondrien zu haben. In unseren Untersuchungen war die Hochregulation von mcl-1 aber auch mit einer vermehrten Phosphorylierung von mcl-1 assoziiert. Diese wird über den ERK Signalweg gesteuert, dessen Aktivität ebenfalls erhöht war.

Sorafenib (BAY 43-9006; Nexavar®) ist ein oraler Multikinaseinhibitor, der die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) des Raf/MEK/ERK Signalweges betrifft (Wilhelm et al., 2008). Die Substanz hat eine FDA Zulassung beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom und hepatozellulären Karzinom.

Wir untersuchten den Effekt von Sorafenib bei SKOV3 Zellen und OVCAR3 Zellen auf die mcl-1 Protein-Expression, die mcl-1 Phosphorylierung, und auf die Aktivität der ERK im Westernblot. Während Nelfinavir zu einer Hochregulation von mcl-1 Protein-Expression und vermehrten Phosphorylierung von ERK1/2 (p-p44/42) bei SKOV3 und OVCAR3 Tumorzellen führte, zeigte Sorafenib als Monotherapie eine reduzierte mcl-1 Protein Expression, wie es auch an anderen Zelllinien gezeigt werden konnte (Yu et al., 2005). Die Kombination aus Nelfinavir und Sorafenib bewirkte eine abgeschwächte Nelfinavir-induzierte Hochregulation von mcl-1 Protein-Expression und ERK1/2 Phosphorylierung. Die Kombination führte auch zu einer vermehrten Aufspaltung von PARP, als Indikator einer verbesserten Apoptose, was durch eine vermehrte Annexin-Bindung durchflußzytometrisch bestätigt werden konnte. Des Weiteren zeigt sich in der FACS Analyse, dass das Membranpotential der Mitochondrien nach Kombinationstherapie deutlich gestört war.

Im ATP-Assay konnte ein synergistischer Effekt der Kombinationstherapie aus Nelfinavir und Sorafenib auf OVCAR3 und SKOV3 Zellen nachgewiesen werden.

Die Kombination von Sorafenib mit anderen potentiell zytotoxischen Substanzen scheint vielversprechend (Dal Lago et al., 2008).

In der TRIAS Studie der AGO/NOGGO (Phase I/II) wurde die Kombination von Topotecan und Sorafenib bei platinresistenten Ovarialkarzinompatienten, gefolgt von einer

Erhaltungstherapie mit Sorafenib, mit einer Monotherapie Topotecan verglichen. In diesem prognostisch sehr schwierigem Kollektiv konnte eine statistische, aber auch klinische Verbesserung des progressionsfreien Überlebens nachgewiesen werden PFS 6,7 vs. 4,4 Monate (HR 0.6, 95%CI; 0.43-0.83, p=0.002), OAS 17,1 vs. 10,1 Monate (HR 0.65, 95%CI; 0.45-0.93, p=0.017)(Chekerov et al., 2018). Weitere translationale Projekte in diesem Kollektiv sind geplant.

Das bessere Verständnis der Signaltransduktionswege, die Entwicklung von Substanzen, die es ermöglichen gezielt einzelne Signaltransduktionswege zu beeinflussen und der Einsatz von Microarray Genchips, um die dem onkogenen Phänotyp zugrunde liegenden spezifischen Signaltransduktionswege zu indentifizieren, wird in Zukunft eine noch individualisiertere Therapie des Ovarialkarzinoms hoffentlich unterstützen.

#### **2.4. Neue intraperitoneale Therapieoptionen**

**Burges A.**, Wimberger P, Kümper C, Gorbounova V, Sommer H, Schmalfeldt B, Pfisterer J, Lichinitser M, Makhson A, Moiseyenko V, Lahr A, Schulze E, Jäger M, Ströhlein MA, Heiss MM, Gottwald T, Lindhofer H, Kimmig R.: Effective relief of malignant ascites in patients with advanced ovarian cancer by a trifunctional anti-EpCAM x anti-CD3 antibody: a phase I/II study. Clin Cancer Res. 2007 Jul 1;13(13):3899-905.

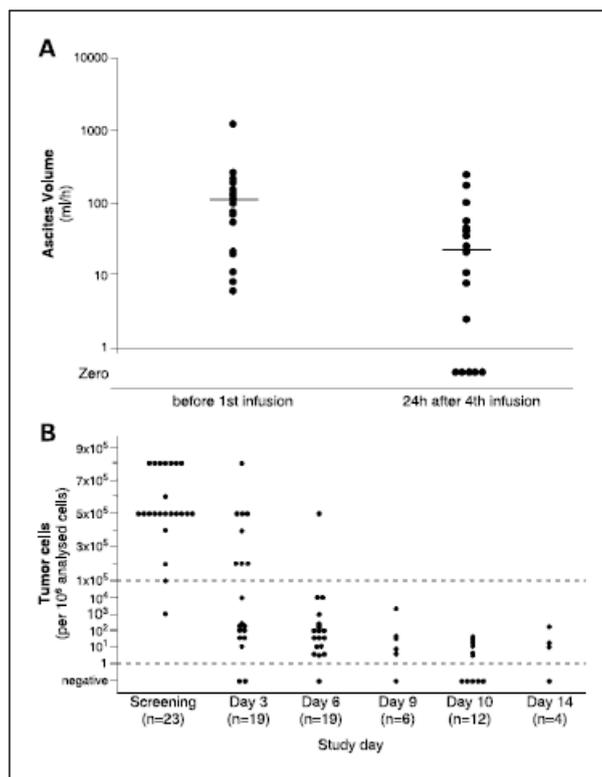
Catumaxumab (anti-EpCAM x anti-CD3) ist ein trifunktioneller monoklonaler Antikörper (MAb), der eine Bindungsstelle für das epithelzelladhäsions-Molekül (epithelial cell adhesion molecule; EpCAM) der Tumorzelle und das CD-3 Antigen der T-Zellen besitzt. Darüberhinaus besitzt er eine funktionstüchtige Fc Region, die die Besonderheit dieses Antikörpers darstellt. Sie besteht aus zwei unterschiedlichen Immunglobulin (Ig) Isotypen der Maus (IgG2a) und der Ratte (IgG2b). Mit dieser kann der Antikörper selektiv an humanen FcγI und III Rezeptoren auf akzessorischen Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen, natürliche Killer Zellen) haften, nicht jedoch am inhibitorischen FcγII Rezeptor, der auf B-Zellen exprimiert wird (Zeidler et al., 2000). Diese Besonderheiten von Catumaxomab ermöglichen es, unterschiedliche Immunzellen in der Umgebung des Tumors zu aktivieren, welche eine effektive Abtötung der Tumorzellen bewirkt, auch derjenigen, die resistent gegen Apoptose sind.

Bei über 90 % der Patientinnen mit Ovarialkarzinom lassen sich im Aszites EpCAM positive Tumorzellen nachweisen (Balzar et al., 1999). Intraperitoneal ergibt sich zudem der Vorteil, dass EpCAM dort tumorspezifisch ist, da benigne peritoneale Zellen mesothelialen Ursprungs sind und keine EpCAM Expression aufweisen.

Wir führten daher eine internationale multitentrische Phase I/II Studie mit 23 multipel vorbehandelten Patientinnen zur Untersuchung der intraperitonealen Applikation von Catumaxumab bei Patientinnen mit wiederholt punktionsbedürftigem Aszites zur Ermittlung der maximal tolerierbaren Dosis (MTD) durch. Die Patientinnen wurden mit 4 bis 5 i.p. Gaben von anti-EpCAM x anti-CD3 über 6 Stunden in steigender Dosierung gemäß Protokoll behandelt. Es ergab sich eine maximale tolerierbare Dosis von 10, 20, 50, 200 und 200 µg (erste bis fünfte Gabe an den Tagen 0, Tag 3, Tag 6, Tag 9 und Tag 13). Die Aszitesbildung konnte durch die i.p. Gabe von anti-EpCAM x anti-CD3 so effektiv beeinflusst werden, dass bei 22/23 Patientinnen bis zum Ende der Studie (Tag 37) keine weitere Punktion mehr vorgenommen werden musste.

Als Nebenwirkungen zeigte sich vor allem Fieber (83%), Übelkeit (61%) und Erbrechen (57%). CTC Grad 3 und 4 Nebenwirkungen zeigten sich meist bei der 200 µg Dosisstufe. Die beobachteten Nebenwirkungen waren immer spontan reversibel. Möglicherweise sind diese Nebenwirkungen Zeichen einer assoziierten Zytokinfreisetzung, als Folge einer durch anti-EpCAM x anti-CD3 hervorgerufenen komplexen Immunreaktion oder der im Serum nachweisbaren Zytokinerhöhung von i.p. mit anti-EpCAM x anti-CD3 behandelten Patientinnen (Heiss et al., 2005).

Die Anzahl der EpCAM positiven Tumorzellen nahm deutlich von 539.000 per  $10^6$  untersuchten Zellen am Beginn der Therapie auf  $39 \times 10^6$  zum Zeitpunkt der letzten Messung am Ende der i.p. Therapie ab (Abbildung 2) (Jaeger M, 2004).



**Abbildung 2:** Abnahme des Ascites und der Tumorzellen im Ascites unter der i.p. Therapie mit Catumaxomab. A: Individuelle Aszitesmengen von 17 Patientinnen der Dosisgruppen IIb, III, IV und V vor Behandlung und 24 h nach der 4. AK-Infusion, Linien: Median Werte von 105 bzw. 23 mL/h. B: EpCAM positive Tumorzellen m Ascites  $\times 10^6$  immunhistochemisch untersuchter Zellen im Ascites. Tage 3, 6 und 9 vor zweiter, dritter und vierter Infusion. Tage 10 und 14, 1 Tag nach vierter und fünfter Infusion.

Als Ergebnis der Studie wurde eine Dosierung von 10, 20, 50, und 150  $\mu\text{g}$  anti-EpCAM-CD3 für weitere Studien definiert, welche deutlich unter der MTD ist.

Unsere Ergebnisse wurden in einer Phase II/III Studie bei Patientinnen mit Aszites unterschiedlicher Tumorgenese bestätigt. In dieser Studie wurden neben Patientinnen mit Ovarialkarzinom (n=129) auch 129 Patientinnen mit anderen Tumorerkrankungen - Magenkarzinom (n=66; 51%), Brustkrebs (n=13; 10%), Pankreaskarzinom (n=9; 7%), Colonkarzinom (n=8; 6%) und Endometriumkarzinom (n=6; 5%) - intraperitoneal mit dem Antikörper behandelt (Heiss et al., 2010).

Neben dem direkten zytotoxischem Effekt kann durch trifunktionelle Antikörper eine anti-Tumor Immunität generiert werden, wie es bei Patientinnen mit Peritonealkarzinose gezeigt werden konnte. So konnten nach einer initialen Behandlung mit anti-EpCAM x anti-CD3 und einer Restimulation nach 4 Wochen tumorreaktive CD4+/CD8+ T-Zellen bei den behandelten Patientinnen nachgewiesen werden (Strohlein et al., 2009). Darüber hinaus liegen entsprechende Daten zur Pharmakokinetik und Bioaktivität vor (Ruf et al., 2010).

In der Phase IIa Dosisfindungsstudie OVAR 2.10 wurde Catumaxomab beim platinrefraktären Ovarialkarzinomrezidiv bei Patientinnen mit zum Teil ausgeprägter Tumorlast geprüft. In diesem Patientinnenkollektiv konnte keine klinisch relevante Effektivität dieses Antikörpers gezeigt werden. Zudem traten Probleme in Zusammenhang mit der Katheter-Plazierung auf, wie sie auch von den Studien mit intraperitonealer Zytostatikagabe bekannt sind (Belau A, 2007). Anti-EpCAM x anti-CD3 hatte zwischenzeitlich durch die European Medicines Agency (EMA) eine Zulassung für die intraperitoneale Therapie des Aszites erhalten, wenn keine Standardtherapie zur Verfügung steht oder nicht mehr anwendbar ist. Diese Zulassung wurde auf Wunsch des Herstellers 2017 jedoch zurückgezogen.

### 3. Abkürzungsverzeichnis

EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
ER	Estrogen Receptor
HE4	humane Epidymidis Protein 4
HER-2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
HIPEC	hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie
HRT	Hormonersatztherapie
NACT	neoadjuvante Chemotherapie
NF- $\kappa$ B	nuklear factor-kappa B
NuMA	Nuclear mitotic apparatus protein
OAS	Gesamtüberleben
PAI-1	Plasminogenaktivator-1
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerasen
PFS	progressionsfreies Überleben
PR	Progesteronrezeptor
RMI	Risk of Malignancy Index
ROCA	Risk of ovarian cancer Algorithm
ROMA	Risk of Ovarian Malignancy Algorithm
TNF	Tumornekrose Faktor
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
uPA	Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

#### 4. Literaturverzeichnis

- AGHAJANIAN, C., BLESSING, J. A., DARCY, K. M., REID, G., DEGEEST, K., RUBIN, S. C., MANNEL, R. S., ROTMENSCH, J., SCHILDER, R. J. & RIORDAN, W. 2009. A phase II evaluation of bortezomib in the treatment of recurrent platinum-sensitive ovarian or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*, 115, 215-20.
- AGHAJANIAN, C., DIZON, D. S., SABBATINI, P., RAIZER, J. J., DUPONT, J. & SPRIGGS, D. R. 2005. Phase I trial of bortezomib and carboplatin in recurrent ovarian or primary peritoneal cancer. *J Clin Oncol*, 23, 5943-9.
- ARIAS-PULIDO, H., SMITH, H. O., JOSTE, N. E., BOCKLAGE, T., QUALLS, C. R., CHAVEZ, A., PROSSNITZ, E. R. & VERSCHRAEGEN, C. F. 2009. Estrogen and progesterone receptor status and outcome in epithelial ovarian cancers and low malignant potential tumors. *Gynecol Oncol*, 114, 480-5.
- BALZAR, M., WINTER, M. J., DE BOER, C. J. & LITVINOV, S. V. 1999. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med*, 77, 699-712.
- BELAU A, J. P., P. WIMBERGER, C. KURZEDER, A. DU BOIS, J. SEHOULI, S. LOIBL, N. BURCHARDI, I. VERGOTE AND U. WAGNER 2007. Randomized, multicenter, two-dose level, open-label, phase IIa study with the intraperitoneally infused trifunctional bispecific antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) to select the better dose level in platinum refractory epithelial ovarian cancer patients. *J Clin Oncol*, 25 (Suppl), Abstract 5556.
- BENZ, E. J., JR., NATHAN, D. G., AMARAVADI, R. K. & DANIAL, N. N. 2007. Targeting the cell death-survival equation. *Clin Cancer Res*, 13, 7250-3.
- BERNSTEIN, W. B. & DENNIS, P. A. 2008. Repositioning HIV protease inhibitors as cancer therapeutics. *Curr Opin HIV AIDS*, 3, 666-75.
- BILICI, A., USTAALIOGLU, B. B., SEKER, M., CANPOLAT, N., TEKINSOY, B., SALEPCI, T. & GUMUS, M. 2010. Clinical value of FDG PET/CT in the diagnosis of suspected recurrent ovarian cancer: is there an impact of FDG PET/CT on patient management? *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 37, 1259-69.
- BRITT, K. L. & FINDLAY, J. K. 2002. Estrogen actions in the ovary revisited. *J Endocrinol*, 175, 269-76.
- BRUNING, A., FRIESE, K., BURGESS, A. & MYLONAS, I. 2010. Tamoxifen enhances the cytotoxic effects of nelfinavir in breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 12, R45.
- BRUNNER, T. B., GEIGER, M., GRABENBAUER, G. G., LANG-WELZENBACH, M., MANTONI, T. S., CAVALLARO, A., SAUER, R., HOHENBERGER, W. & MCKENNA, W. G. 2008. Phase I trial of the human immunodeficiency virus protease inhibitor nelfinavir and chemoradiation for locally advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol*, 26, 2699-706.
- CHAN, K. K., WEI, N., LIU, S. S., XIAO-YUN, L., CHEUNG, A. N. & NGAN, H. Y. 2008. Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation. *Obstet Gynecol*, 111, 144-51.
- CHEKEROV, R., HILPERT, F., MAHNER, S., EL-BALAT, A., HARTER, P., DE GREGORIO, N., FRIDRICH, C., MARKMANN, S., POTENBERG, J., LORENZ, R., OSKAY-OEZCELIK, G., SCHMIDT, M., KRABISCH, P., LUECK, H. J., RICHTER, R., BRAICU, E. I., DU BOIS, A., SEHOULI, J., NOGGO & INVESTIGATORS, A. T. 2018. Sorafenib plus topotecan versus placebo plus topotecan for platinum-resistant ovarian cancer (TRIAS): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 19, 1247-1258.
- CHO, H. Y., THOMAS, S., GOLDEN, E. B., GAFFNEY, K. J., HOFMAN, F. M., CHEN, T. C., LOUIE, S. G., PETASIS, N. A. & SCHONTHAL, A. H. 2009. Enhanced killing of chemo-resistant breast cancer cells via controlled aggravation of ER stress. *Cancer Lett*, 282, 87-97.
- COHEN, J. 2007. Biomedicine. HIV drug shows promise as potential cancer treatment. *Science*, 317, 1305.
- COLOMBO, N., VAN GORP, T., PARMA, G., AMANT, F., GATTA, G., SESSA, C. & VERGOTE, I. 2006. Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 60, 159-79.
- CRESTA, S., SESSA, C., CATAPANO, C. V., GALLERANI, E., PASSALACQUA, D., RINALDI, A., BERTONI, F., VIGANO, L., MAUR, M., CAPRI, G., MACCIONI, E., TOSI, D. & GIANNI, L. 2008. Phase I study of bortezomib with weekly paclitaxel in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer*.
- CUNAT, S., HOFFMANN, P. & PUJOL, P. 2004. Estrogens and epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 94, 25-32.

- CZOGALLA, B., KAHALY, M., MAYR, D., SCHMOECKEL, E., NIESLER, B., HESTER, A., ZEDER-GOSS, C., KOLBEN, T., BURGESS, A., MAHNER, S., JESCHKE, U. & TRILLSCH, F. 2019. Correlation of NRF2 and progesterone receptor and its effects on ovarian cancer biology. *Cancer Manag Res*, 11, 7673-7684.
- CZOGALLA, B., KAHALY, M., MAYR, D., SCHMOECKEL, E., NIESLER, B., KOLBEN, T., BURGESS, A., MAHNER, S., JESCHKE, U. & TRILLSCH, F. 2018. Interaction of ERalpha and NRF2 Impacts Survival in Ovarian Cancer Patients. *Int J Mol Sci*, 20.
- DAL LAGO, L., D'HONDT, V. & AWADA, A. 2008. Selected combination therapy with sorafenib: a review of clinical data and perspectives in advanced solid tumors. *Oncologist*, 13, 845-58.
- DU BOIS A., V. I., FERRON G., REUSS A., MEIER W., GREGGI S., JENSEN P.T., SELLE F., GUYON F., POMEL C., LECURU F., ZANG R., AVALL-LUNDQVIST E., WEON KIM J., PONCE J., RASPAGLIESI F., GHAEM-MAGHAMI S., REINTHALLER A., HARTEP, SEHOULI J. 2017. Randomized controlled phase III study evaluating the impact of secondary cytoreductive surgery in recurrent ovarian cancer: AGO DESKTOP III/ENGOT ov20. *J Clin Oncol*, 35, suppl; abstr 5501.
- DY, G. K., THOMAS, J. P., WILDING, G., BRUZEK, L., MANDREKAR, S., ERLICHMAN, C., ALBERTI, D., BINGER, K., PITOT, H. C., ALBERTS, S. R., HANSON, L. J., MARNOCHA, R., TUTSCH, K., KAUFMANN, S. H. & ADJEI, A. A. 2005. A phase I and pharmacologic trial of two schedules of the proteasome inhibitor, PS-341 (bortezomib, velcade), in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*, 11, 3410-6.
- ESTES, J. M., OLIVER, P. G., STRAUGHN, J. M., JR., ZHOU, T., WANG, W., GRIZZLE, W. E., ALVAREZ, R. D., STOCKARD, C. R., LOBUGLIO, A. F. & BUCHSBAUM, D. J. 2007. Efficacy of anti-death receptor 5 (DR5) antibody (TRA-8) against primary human ovarian carcinoma using a novel ex vivo tissue slice model. *Gynecol Oncol*, 105, 291-8.
- FAGOTTI, A., FANFANI, F., ROSSITTO, C., LORUSSO, D., DE GAETANO, A. M., GIORDANO, A., VIZZIELLI, G. & SCAMBIA, G. 2008. A treatment selection protocol for recurrent ovarian cancer patients: the role of FDG-PET/CT and staging laparoscopy. *Oncology*, 75, 152-8.
- FANUCCHI, M. P., FOSSELLA, F. V., BELT, R., NATALE, R., FIDIAS, P., CARBONE, D. P., GOVINDAN, R., RAEZ, L. E., ROBERT, F., RIBEIRO, M., AKERLEY, W., KELLY, K., LIMENTANI, S. A., CRAWFORD, J., REIMERS, H. J., AXELROD, R., KASHALA, O., SHENG, S. & SCHILLER, J. H. 2006. Randomized phase II study of bortezomib alone and bortezomib in combination with docetaxel in previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 24, 5025-33.
- FREDERICK, P. J., KENDRICK, J. E., STRAUGHN, J. M., JR., DELLA MANNA, D. L., OLIVER, P. G., LIN, H. Y., GRIZZLE, W. E., STOCKARD, C. R., ALVAREZ, R. D., ZHOU, T., LOBUGLIO, A. F. & BUCHSBAUM, D. J. 2009. Effect of TRA-8 anti-death receptor 5 antibody in combination with chemotherapy in an ex vivo human ovarian cancer model. *Int J Gynecol Cancer*, 19, 814-9.
- FRIBLEY, A. & WANG, C. Y. 2006. Proteasome inhibitor induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress. *Cancer Biol Ther*, 5, 745-8.
- GARCIA-VELASCO, A., MENDIOLA, C., SANCHEZ-MUNOZ, A., BALLESTIN, C., COLOMER, R. & CORTES-FUNES, H. 2008. Prognostic value of hormonal receptors, p53, ki67 and HER2/neu expression in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Transl Oncol*, 10, 367-71.
- GARCIA-VELLOSO, M. J., JURADO, M., CEAMANOS, C., ARAMENDIA, J. M., GARRASTACHU, M. P., LOPEZ-GARCIA, G. & RICHTER, J. A. 2007. Diagnostic accuracy of FDG PET in the follow-up of platinum-sensitive epithelial ovarian carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*.
- GEISLER, J. P., BULLER, E. & MANAHAN, K. J. 2008. Estrogen receptor alpha and beta expression in a case matched series of serous and endometrioid adenocarcinomas of the ovary. *Eur J Gynaecol Oncol*, 29, 126-8.
- GILLS, J. J., LOPICCOLO, J. & DENNIS, P. A. 2008. Nelfinavir, a new anti-cancer drug with pleiotropic effects and many paths to autophagy. *Autophagy*, 4, 107-9.
- GILLS, J. J., LOPICCOLO, J., TSURUTANI, J., SHOEMAKER, R. H., BEST, C. J., ABU-ASAB, M. S., BOROJERDI, J., WARFEL, N. A., GARDNER, E. R., DANISH, M., HOLLANDER, M. C., KAWABATA, S., TSOKOS, M., FIGG, W. D., STEEG, P. S. & DENNIS, P. A. 2007. Nelfinavir, A lead HIV protease inhibitor, is

- a broad-spectrum, anticancer agent that induces endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*, 13, 5183-94.
- HARTER, P. & DU BOIS, A. 2005. The role of surgery in ovarian cancer with special emphasis on cytoreductive surgery for recurrence. *Curr Opin Oncol*, 17, 505-14.
- HARTER, P., DU BOIS, A., HAHMANN, M., HASENBURG, A., BURGES, A., LOIBL, S., GROPP, M., HUOBER, J., FINK, D., SCHRODER, W., MUENSTEDT, K., SCHMALFELDT, B., EMONS, G., PFISTERER, J., WOLLSCHLAEGER, K., MEERPOHL, H. G., BREITBACH, G. P., TANNER, B. & SEHOULI, J. 2006. Surgery in recurrent ovarian cancer: the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) DESKTOP OVAR trial. *Ann Surg Oncol*, 13, 1702-10.
- HARTER, P., HAHMANN, M., LUECK, H. J., POELCHER, M., WIMBERGER, P., ORTMANN, O., CANZLER, U., RICHTER, B., WAGNER, U., HASENBURG, A., BURGES, A., LOIBL, S., MEIER, W., HUOBER, J., FINK, D., SCHROEDER, W., MUENSTEDT, K., SCHMALFELDT, B., EMONS, G., DU BOIS, A. 2009. Surgery for recurrent ovarian cancer: role of peritoneal carcinomatosis: exploratory analysis of the DESKTOP I Trial about risk factors, surgical implications, and prognostic value of peritoneal carcinomatosis. *Ann Surg Oncol*, 16, 1324-30.
- HARTER, P., SEHOULI, J., REUSS, A., HASENBURG, A., SCAMBIA, G., CIBULA, D., MAHNER, S., VERGOTE, I., REINTHALLER, A., BURGES, A., HANKER, L., POLCHER, M., KURZEDER, C., CANZLER, U., PETRY, K. U., OBERMAIR, A., PETRU, E., SCHMALFELDT, B., LORUSSO, D., DU BOIS, A. 2011. Prospective validation study of a predictive score for operability of recurrent ovarian cancer: the Multicenter Intergroup Study DESKTOP II. A project of the AGO Kommission OVAR, AGO Study Group, NOGGO, AGO-Austria, and MITO. *Int J Gynecol Cancer*, 21, 289-95.
- HEISS, M. M., MURAWA, P., KORALEWSKI, P., KUTARSKA, E., KOLESNIK, O. O., IVANCHENKO, V. V., DUDNICHENKO, A. S., ALEKNAVICIENE, B., RAZBADAUSKAS, A., GORE, M., GANEA-MOTAN, E., CIULEANU, T., WIMBERGER, P., SCHMITTEL, A., SCHMALFELDT, B., BURGES, A., BOKEMEYER, C., LINDHOFER, H., LAHR, A. & PARSONS, S. L. 2010. 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*, 127, 2209-21.
- HEISS, M. M., STROHLEIN, M. A., JAGER, M., KIMMIG, R., BURGES, A., SCHOBERTH, A., JAUCH, K. W., SCHILDBERG, F. W. & LINDHOFER, H. 2005. Immunotherapy of malignant ascites with trifunctional antibodies. *Int J Cancer*, 117, 435-43.
- HOGDALL, E. V., CHRISTENSEN, L., HOGDALL, C. K., BLAAKAER, J., GAYTHER, S., JACOBS, I. J., CHRISTENSEN, I. J. & KJAER, S. K. 2007. Prognostic value of estrogen receptor and progesterone receptor tumor expression in Danish ovarian cancer patients: from the 'MALOVA' ovarian cancer study. *Oncol Rep*, 18, 1051-9.
- HOTTE, S. J., HIRTE, H. W., CHEN, E. X., SIU, L. L., LE, L. H., COREY, A., IACOBUCCI, A., MACLEAN, M., LO, L., FOX, N. L. & OZA, A. M. 2008. A phase 1 study of mapatumumab (fully human monoclonal antibody to TRAIL-R1) in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res*, 14, 3450-5.
- JAEGER M, S. M., SCHOBERTH A, BURGES A, HEISS MM, LINDHOFER H 2004. Immunotherapy with the trifunctional antibody Removab leads to significant elimination of tumor cells from malignant ascites in ovarian cancer: results of a phase I/II study. *J Clin Oncol*, 22 (Suppl), Abstract 2504.
- JIANG, W., MIKOCHIK, P. J., RA, J. H., LEI, H., FLAHERTY, K. T., WINKLER, J. D. & SPITZ, F. R. 2007. HIV protease inhibitor nelfinavir inhibits growth of human melanoma cells by induction of cell cycle arrest. *Cancer Res*, 67, 1221-7.
- JIN, Z. & EL-DEIRY, W. S. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, 4, 139-63.
- KAATSCH, P. S., C. 2019. Krebs in Deutschland für 2015 / 2016. 12. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2019.
- KENDRICK, J. E., ESTES, J. M., STRAUGHN, J. M., JR., ALVAREZ, R. D. & BUCHSBAUM, D. J. 2007. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and its therapeutic potential in breast and gynecologic cancers. *Gynecol Oncol*, 106, 614-21.

- KENDRICK, J. E., STRAUGHN, J. M., JR., OLIVER, P. G., WANG, W., NAN, L., GRIZZLE, W. E., STOCKARD, C. R., ALVAREZ, R. D. & BUCHSBAUM, D. J. 2008. Anti-tumor activity of the TRA-8 anti-DR5 antibody in combination with cisplatin in an ex vivo human cervical cancer model. *Gynecol Oncol*, 108, 591-7.
- KOEHLER, K. F., HELGUERO, L. A., HALDOSEN, L. A., WARNER, M. & GUSTAFSSON, J. A. 2005. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr Rev*, 26, 465-78.
- KOMMOSS, F., PFISTERER, J., THOME, M., SCHAFFER, W., SAUERBREI, W. & PFLEIDERER, A. 1992. Steroid receptors in ovarian carcinoma: immunohistochemical determination may lead to new aspects. *Gynecol Oncol*, 47, 317-22.
- KOUROKU, Y., FUJITA, E., TANIDA, I., UENO, T., ISOAI, A., KUMAGAI, H., OGAWA, S., KAUFMAN, R. J., KOMINAMI, E. & MOMOI, T. 2007. ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ*, 14, 230-9.
- LAZENNEC, G. 2006. Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Lett*, 231, 151-7.
- LENHARD, M. S., BURGESS, A., JOHNSON, T. R., STIEBER, P., KUMPER, C., DITSCH, N., LINKE, R. & FRIESE, K. 2008a. PET-CT in recurrent ovarian cancer: impact on treatment planning. *Anticancer Res*, 28, 2303-8.
- LENHARD, S. M., BURGESS, A., JOHNSON, T. R., KIRSCHENHOFER, A., BRUNS, C., LINKE, R. & FRIESE, K. 2008b. Predictive value of PET-CT imaging versus AGO-scoring in patients planned for cytoreductive surgery in recurrent ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*.
- LURIE, G., WILKENS, L. R., THOMPSON, P. J., MCDUFFIE, K. E., CARNEY, M. E., TERADA, K. Y. & GOODMAN, M. T. 2009. Genetic polymorphisms in the estrogen receptor beta (ESR2) gene and the risk of epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Causes Control*, 20, 47-55.
- MAHNER, S., EULENBURG, C., STAEHLE, A., WEGSCHEIDER, K., REUSS, A., PUJADE-LAURINE, E., HARTEP, P., RAY-COQUARD, I., PFISTERER, J. & DU BOIS, A. 2013. Prognostic impact of the time interval between surgery and chemotherapy in advanced ovarian cancer: analysis of prospective randomised phase III trials. *Eur J Cancer*, 49, 142-9.
- MAHNER, S., MEIER, W., DU BOIS, A., BROWN, C., LORUSSO, D., DELL'ANNA, T., CRETIN, J., HAVSTEEN, H., BESSETTE, P., ZEIMET, A. G., VERGOTE, I., VASEY, P., PUJADE-LAURINE, E., GLADIEFF, L. & FERRERO, A. 2015a. Carboplatin and pegylated liposomal doxorubicin versus carboplatin and paclitaxel in very platinum-sensitive ovarian cancer patients: results from a subset analysis of the CALYPSO phase III trial. *Eur J Cancer*, 51, 352-8.
- MAHNER, S. & PFISTERER, J. 2013. Towards individualised treatment in ovarian cancer. *Lancet Oncol*, 14, 101-2.
- MAHNER, S., TRILLSCH, F., CHI, D., HARTEP, P., PFISTERER, J., HILPERT, F., BURGESS, A., WEISSENBACHER, T. & DU BOIS, A. 2016. Neoadjuvant chemotherapy in ovarian cancer revisited. *Ann Oncol*, 27 Suppl 1, i30-i32.
- MAHNER, S., WOELBER, L., MUELLER, V., WITZEL, I., PRIESKE, K., GRIMM, D., KELLER, V. A. G. & TRILLSCH, F. 2015b. Beyond Bevacizumab: An Outlook to New Anti-Angiogenics for the Treatment of Ovarian Cancer. *Front Oncol*, 5, 211.
- MASTROLORENZO, A., RUSCONI, S., SCOZZAFAVA, A., BARBARO, G. & SUPURAN, C. T. 2007. Inhibitors of HIV-1 protease: current state of the art 10 years after their introduction. From antiretroviral drugs to antifungal, antibacterial and antitumor agents based on aspartic protease inhibitors. *Curr Med Chem*, 14, 2734-48.
- MILANO, A., IAFFAIOLI, R. V. & CAPONIGRO, F. 2007. The proteasome: a worthwhile target for the treatment of solid tumours? *Eur J Cancer*, 43, 1125-33.
- MITSUYA, H., MAEDA, K., DAS, D. & GHOSH, A. K. 2008. Development of protease inhibitors and the fight with drug-resistant HIV-1 variants. *Adv Pharmacol*, 56, 169-97.
- MOORE, K. N. & BIRNER, M. J. 2018. Administration of the Tablet Formulation of Olaparib in Patients with Ovarian Cancer: Practical Guidance and Expectations. *Oncologist*, 23, 697-703.

- MORCH, L. S., LOKKEGAARD, E., ANDREASEN, A. H., KRUGER-KJAER, S. & LIDEGAARD, O. 2009. Hormone therapy and ovarian cancer. *Jama*, 302, 298-305.
- MURAKAMI, M., MIYAMOTO, T., IIDA, T., TSUKADA, H., WATANABE, M., SHIDA, M., MAEDA, H., NASU, S., YASUDA, S., YASUDA, M. & IDE, M. 2006. Whole-body positron emission tomography and tumor marker CA125 for detection of recurrence in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 16 Suppl 1, 99-107.
- OGATA, M., HINO, S., SAITO, A., MORIKAWA, K., KONDO, S., KANEMOTO, S., MURAKAMI, T., TANIGUCHI, M., TANII, I., YOSHINAGA, K., SHIOSAKA, S., HAMMARBACK, J. A., URANO, F. & IMAIZUMI, K. 2006. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*, 26, 9220-31.
- PALOMAR, A., NANNI, C., CASTELLUCCI, P., AMBROSINI, V., MONTINI, G. C., ALLEGRI, V., PETTINATO, C., AL-NAHHAS, A., SORIANO, A., GRASSETTO, G., RUBELLO, D. & FANTI, S. 2011. Value of FDG PET/CT in Patients with Treated Ovarian Cancer and Raised CA125 Serum Levels. *Mol Imaging Biol*.
- PASQUINI, L., PETRONELLI, A., PETRUCCI, E., SAULLE, E., MARIANI, G., SCAMBIA, G., BENEDETTI-PANICI, P., GREGGI, S., COGNETTI, F. & TESTA, U. 2010. Primary ovarian cancer cells are sensitive to the proapoptotic effects of proteasome inhibitors. *Int J Oncol*, 36, 707-13.
- PERREN, T. J., SWART, A. M., PFISTERER, J., LEDERMANN, J. A., PUJADE-LAURINE, E., KRISTENSEN, G., CAREY, M. S., BEALE, P., CERVANTES, A., KURZEDER, C., DU BOIS, A., SEHOULI, J., KIMMIG, R., STAHL, A., COLLINSON, F., ESSAPEN, S., GOURLEY, C., LORTHOLARY, A., SELLE, F., MIRZA, M. R., LEMINEN, A., PLANTE, M., STARK, D., QIAN, W., PARMAR, M. K. & OZA, A. M. 2011. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med*, 365, 2484-96.
- PERRY, C. M., FRAMPTON, J. E., MCCORMACK, P. L., SIDDIQUI, M. A. & CVETKOVIC, R. S. 2005. Nelfinavir: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs*, 65, 2209-44.
- PYRKO, P., SCHONTHAL, A. H., HOFMAN, F. M., CHEN, T. C. & LEE, A. S. 2007. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res*, 67, 9809-16.
- RAMIREZ, P. T., LANDEN, C. N., JR., COLEMAN, R. L., MILAM, M. R., LEVENBACK, C., JOHNSTON, T. A. & GERSHENSON, D. M. 2008. Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in combination with carboplatin in patients with platinum- and taxane-resistant ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 108, 68-71.
- RUF, P., KLUGE, M., JAGER, M., BURGESS, A., VOLOVAT, C., HEISS, M. M., HESS, J., WIMBERGER, P., BRANDT, B. & LINDHOFER, H. 2010. Pharmacokinetics, immunogenicity and bioactivity of the therapeutic antibody catumaxomab intraperitoneally administered to cancer patients. *Br J Clin Pharmacol*, 69, 617-25.
- RYAN, D. P., O'NEIL, B. H., SUPKO, J. G., ROCHA LIMA, C. M., DEES, E. C., APPLEMAN, L. J., CLARK, J., FIDIAS, P., ORLOWSKI, R. Z., KASHALA, O., EDER, J. P. & CUSACK, J. C., JR. 2006. A Phase I study of bortezomib plus irinotecan in patients with advanced solid tumors. *Cancer*, 107, 2688-97.
- SAULLE, E., PETRONELLI, A., PASQUINI, L., PETRUCCI, E., MARIANI, G., BIFFONI, M., FERRETTI, G., SCAMBIA, G., BENEDETTI-PANICI, P., COGNETTI, F., HUMPHREYS, R., PESCHLE, C. & TESTA, U. 2007. Proteasome inhibitors sensitize ovarian cancer cells to TRAIL induced apoptosis. *Apoptosis*, 12, 635-55.
- SMYTH, J. F., GOURLEY, C., WALKER, G., MACKEAN, M. J., STEVENSON, A., WILLIAMS, A. R., NAFUSSI, A. A., RYE, T., RYE, R., STEWART, M., MCCURDY, J., MANO, M., REED, N., MCMAHON, T., VASEY, P., GABRA, H. & LANGDON, S. P. 2007. Antiestrogen therapy is active in selected ovarian cancer cases: the use of letrozole in estrogen receptor-positive patients. *Clin Cancer Res*, 13, 3617-22.
- STROHLEIN, M. A., SIEGEL, R., JAGER, M., LINDHOFER, H., JAUCH, K. W. & HEISS, M. M. 2009. Induction of anti-tumor immunity by trifunctional antibodies in patients with peritoneal carcinomatosis. *J Exp Clin Cancer Res*, 28, 18.
- TANGJITGAMOL, S., MANUSIRIVITHAYA, S., KHUNNARONG, J., JESADAPATARAKUL, S. & TANWANICH, S. 2009. Expressions of estrogen and progesterone receptors in epithelial ovarian cancer: a clinicopathologic study. *Int J Gynecol Cancer*, 19, 620-7.

- TREECK, O., PFEILER, G., MITTER, D., LATTRICH, C., PIENDL, G. & ORTMANN, O. 2007. Estrogen receptor {beta}1 exerts antitumoral effects on SK-OV-3 ovarian cancer cells. *J Endocrinol*, 193, 421-33.
- TRILLSCH, F., MAHNER, S., CZOGALLA, B., ROTTMANN, M., CHEKEROV, R., BRAICU, E. I., OSKAY-OCZELIK, G., WIMBERGER, P., RICHTER, R. & SEHOULI, J. 2021. Primary platinum resistance and its prognostic impact in patients with recurrent ovarian cancer: an analysis of three prospective trials from the NOGGO study group. *J Gynecol Oncol*, 32, e37.
- TRILLSCH, F., MAHNER, S., HILPERT, F., DAVIES, L., GARCIA-MARTINEZ, E., KRISTENSEN, G., SAVARESE, A., VUYLSTEKE, P., LOS, M., ZAGOURI, F., GLADIEFF, L., SEHOULI, J., KHOON LEE, C., GEBSKI, V. & PUJADE-LAURINE, E. 2016. Prognostic and predictive effects of primary versus secondary platinum resistance for bevacizumab treatment for platinum-resistant ovarian cancer in the AURELIA trial. *Ann Oncol*, 27, 1733-9.
- TRILLSCH, F., WOELBER, L., EULENBURG, C., BRAICU, I., LAMBRECHTS, S., CHEKEROV, R., VAN NIEUWENHUYSEN, E., SPEISER, P., ZEIMET, A., CASTILLO-TONG, D. C., CONCIN, N., ZEILLINGER, R., VERGOTE, I., MAHNER, S. & SEHOULI, J. 2013. Treatment reality in elderly patients with advanced ovarian cancer: a prospective analysis of the OVCAD consortium. *J Ovarian Res*, 6, 42.
- WAKELEE, H. A., PATNAIK, A., SIKIC, B. I., MITA, M., FOX, N. L., MICELI, R., ULLRICH, S. J., FISHER, G. A. & TOLCHER, A. W. 2010. Phase I and pharmacokinetic study of lexatumumab (HGS-ETR2) given every 2 weeks in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol*, 21, 376-81.
- WILHELM, S. M., ADNANE, L., NEWELL, P., VILLANUEVA, A., LLOVET, J. M. & LYNCH, M. 2008. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther*, 7, 3129-40.
- WONG, K. K., LU, K. H., MALPICA, A., BODURKA, D. C., SHVARTSMAN, H. S., SCHMANDT, R. E., THORNTON, A. D., DEAVERS, M. T., SILVA, E. G. & GERSHENSON, D. M. 2007. Significantly greater expression of ER, PR, and ECAD in advanced-stage low-grade ovarian serous carcinoma as revealed by immunohistochemical analysis. *Int J Gynecol Pathol*, 26, 404-9.
- YU, C., BRUZEK, L. M., MENG, X. W., GORES, G. J., CARTER, C. A., KAUFMANN, S. H. & ADJEI, A. A. 2005. The role of Mcl-1 downregulation in the proapoptotic activity of the multikinase inhibitor BAY 43-9006. *Oncogene*, 24, 6861-9.
- ZEIDLER, R., MYSLIWIECZ, J., CSANADY, M., WALZ, A., ZIEGLER, I., SCHMITT, B., WOLLENBERG, B. & LINDHOFER, H. 2000. The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells. *Br J Cancer*, 83, 261-6.
- ZHAO, C., DAHLMAN-WRIGHT, K. & GUSTAFSSON, J. A. 2008. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal*, 6, e003.

## 5. Danksagung

Herr Prof. Hermann Hepp ermöglichte mir den Einstieg in die Gynäkologie und Geburtshilfe und neben der fundierten klinischen Ausbildung konnten wir viele ethische Aspekte unseres Berufes mit Ihm vertiefen. Prof. Klaus Friese ermunterte mich wiederholt auch die wissenschaftlichen Aspekte unseres Faches weiter zu verfolgen und unterstützte mich dabei sehr intensiv. Schließlich schaffte es Prof. Sven Mahner mich zu motivieren, diese Arbeit auch zu einem akademischen Zwischenziel zu vervollständigen und hat zum Gelingen der Arbeit durch seinen unermüdlichen Einsatz wesentliches beigetragen.

Besonderer Dank gilt hier insbesondere den Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU Frauenklinik. Namentlich möchte ich hier besonders „unseren“ Biologen Dr. Ansgar Brüning und Prof. Ioannis Mylonas erwähnen.

Ich danke allen Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des LMU Klinikums für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit. Insbesondere in der letzten Phase des Habilitationsprojektes habe ich hierbei besondere Unterstützung von den Kollegen PD Dr. Fabian Trillsch und Dr. Bastian Czogalla erfahren.

Allen Kooperationspartnern danke ich für die hervorragende und vertrauensvolle Zusammenarbeit im Rahmen meiner Forschungsprojekte.

Was wäre ich ohne meine Familie? Daher gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, die mich auf dem Weg zu meinem Traumberuf immer unterstützt haben und natürlich meiner Frau und meinen Kindern, die mich auf meinem Weg mit engelsgeduld begleitet und immer an mich geglaubt haben.