

Aus dem Institut für Pathologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. A. Rosenwald

Bedeutung der immunhistochemischen Expression von  
MAGE A3, NY-ESO 1 und STEAP-1 beim  
Harnblasenkarzinom

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Klara Braun  
aus Pirmasens

Würzburg, Januar 2018

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Hans-Ullrich Völker

Korreferent: Professor Dr. med. Hubert Kübler

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13. September 2018

Die Promovendin ist Ärztin.

## **Inhaltsverzeichnis**

I.	Abbildungsverzeichnis .....	V
II.	Tabellenverzeichnis.....	VI
III.	Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1	Einleitung .....	1
1.1	Das Urothelkarzinom der Harnblase .....	1
1.1.1	Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese .....	1
1.1.2	Klassifikation und TNM-Stadium.....	3
1.1.3	Klinisches Erscheinungsbild, Diagnostik und Therapie .....	6
1.2	Cancer/Testis-Antigene .....	9
1.2.1	Cancer/Testis-Antigene in dieser Arbeit .....	12
1.3	Fragestellung .....	14
2	Material und Methoden .....	14
2.1	Herkunft der untersuchten Tumorproben .....	14
2.2	Prinzipien Immunhistochemie .....	15
2.3	Vorbereitung des auszuwertenden Materials.....	16
2.4	Färbeprotokolle.....	17
2.4.1	Färbeprotokoll MAGE A3 .....	17
2.4.2	Färbeprotokoll NY-ESO 1 .....	19
2.4.3	Färbeprotokoll STEAP-1.....	19
2.5	Auswertung der immunhistochemischen Färbung .....	20
2.6	Statistische Auswertung .....	24
3	Ergebnisse .....	24
3.1	Deskriptive Analyse klinisch-pathologische Parameter .....	24
3.2	Ergebnisse der Färbungen in Bezug auf T-Stadium und Grading.....	26

3.2.1	Expression MAGE A3 .....	27
3.2.2	Expression NY-ESO 1 .....	30
3.2.3	Expression STEAP-1.....	34
3.2.4	Expression allgemein .....	37
3.3	Überlebenswahrscheinlichkeiten nach Kaplan-Meier .....	37
3.3.1	Überlebenskurven in Abhängigkeit der immunhistochemischen Färbereaktion mit MAGE A3 .....	38
3.3.2	Überlebenskurven in Abhängigkeit der immunhistochemischen Färbereaktion mit NY-ESO 1 .....	40
3.3.3	Überlebenskurven in Abhängigkeit der immunhistochemischen Färbereaktion mit STEAP-1 .....	42
4	Diskussion .....	44
5	Zusammenfassung .....	50
6	Literaturverzeichnis.....	52

## I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: schematische T-Stadien Urothelkarzinom der Harnblase .....	4
Abbildung 2: Positivkontrolle immunhistochemische Färbung MAGE A3 Hodengewebe ....	18
Abbildung 3: Positivkontrolle immunhistochemische Färbung NY-ESO 1 Hodengewebe ....	19
Abbildung 4: Positivkontrolle immunhistochemische Färbung STEAP-1 Nierengewebe .....	20
Abbildung 5: Immunhistochemische Färbung MAGE A3 Urothelkarzinom .....	21
Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung MAGE A3 Urothelkarzinom .....	<b>Fehler!</b>
<b>Textmarke nicht definiert.</b>	
Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung MAGE A3 Urothelkarzinom .....	22
Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung NY-ESO 1 Urothelkarzinom .....	22
Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung NY-ESO 1 Urothelkarzinom .....	23
Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung STEAP-1 Urothelkarzinom .....	23
Abbildung 11: Verteilung der Tumorstadien nach Häufigkeit.....	25
Abbildung 12: Verteilung des Gradings nach Häufigkeit .....	25
Abbildung 13: Verteilung der Expression von MAGE A3 in Prozent der untersuchten Fälle .....	28
Abbildung 14: Verteilung der Expression von NY-ESO 1 in Prozent der untersuchten Fälle .....	31
Abbildung 15: Verteilung der Expression von STEAP-1 in Prozent der untersuchten Fälle .....	34
Abbildung 16: Expression MAGE A3, STEAP-1 und NY-ESO 1 allgemein im untersuchten Urothelkarzinom der Harnblase .....	37
Abbildung 17: progressionsfreies Überleben nach Färbereaktion MAGE A3.....	39
Abbildung 18: rezidivfreies Überleben nach Färbereaktion MAGE A3.....	40
Abbildung 19: progressionsfreies Überleben nach Färbereaktion NY-ESO 1 (hier unter CTAG1B geführt).....	41
Abbildung 20: rezidivfreies Überleben nach Färbereaktion NY-ESO 1 (hier unter CTAG1B geführt).....	42
Abbildung 21: progressionsfreies Überleben nach Färbereaktion STEAP-1.....	43
Abbildung 22: rezidivfreies Überleben nach Färbereaktion STEAP-1 .....	44

## II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tumorstadien nach TNM (UICC, 2010).....	3
Tabelle 2: Grading nach WHO (1973).....	5
Tabelle 3: Grading nach WHO (2004).....	5
Tabelle 4: neue WHO-Klassifikation 2016.....	5
Tabelle 5: In dieser Arbeit untersuchte CTA mit Familie, Kennung, Genort, Immunantwort und Identifikationsmethode .....	12
Tabelle 6: Färbeintensität und Expression .....	21
Tabelle 7: Basischarakteristika des untersuchten Kollektivs .....	26
Tabelle 8: Art und Verteilung der Expression von MAGE A3 im Tumorgewebe .....	27
Tabelle 9: Expressionsergebnisse von MAGE A3 hinsichtlich der pT-Stadien .....	28
Tabelle 10: Expressionsergebnisse von MAGE A3 hinsichtlich des Gradings .....	29
Tabelle 11: Art und Verteilung der Expression von NY-ESO 1 im Tumorgewebe.....	31
Tabelle 12: Expressionsergebnisse von NY-ESO 1 hinsichtlich der pT-Stadien .....	32
Tabelle 13: Expressionsergebnisse von NY-ESO 1 hinsichtlich des Gradings .....	33
Tabelle 14: Art und Verteilung der Expression von STEAP-1 im Tumorgewebe.....	34
Tabelle 15: Expressionsergebnisse von STEAP-1 hinsichtlich der pT-Stadien.....	35
Tabelle 16: Expressionsergebnisse von STEAP-1 hinsichtlich des Gradings .....	36

## III. Abkürzungsverzeichnis

°C *Grad Celcius*

µl *Mikroliter*

5-ALA *5-Aminolävulinsäure*

ABC-Methode *Avidin-Biotin-Komplex-Methode*

AK *Antikörper*

Aqua dest. *aqua destillata*

BCG *Bacillus Calmette-Guérin*

bzw. *beziehungsweise*

CD *Cluster of differentiation*

cDNA *complementary deoxyribonucleic acid*

CIS *Carcinoma in situ*  
CT *Computertomographie*  
CTA *Cancer/Testis-Antigen(e)*  
CTLA-4 *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*  
CUETO *Club Urologico Espaniol de Tratamento Oncologico*  
DAB *3,3'-Diaminobenzidin*  
DAC *5-aza-2'-deoxycytidin*  
E.coli *Escherichia coli*  
EDTA *Ethylendiamintetraessigsäure*  
EORTC *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*  
Fa. *Firma*  
FFPE *formalin-fixed paraffin-embedded tissue*  
FGFR-3 *Fibroblast growth factor receptor 3*  
g *Gramm*  
G 1-3 *Grading, histologisches*  
GATA3 *GATA binding protein 3*  
GC-Schema *Chemotherapiekombination aus Gemcitabine und Cisplatin*  
GM-CSF *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*  
GSTT1 *glutathione-S-transferase 1*  
HCl *Salzsäure*  
HE *Hämatoxylin-Eosin*  
HER2/neu *human epidermal growth factor receptor 2*  
HEXVIX® *Hexaminolävulinsäure*  
HLA *Human Leukocyte Antigen*  
HMOX1 *heme oxygenase 1-isoform*  
HRP *horseradish peroxidase*  
i.v. *intravenös*  
Inc. *Incorporated*  
LSAB *Labeled (Strep-) Avidin-Biotin Methode*  
MAGE A3 *melanoma-associated antigen 3*  
MCNA *Mycobacterium-phlei-Zellwand-Nukleinsäure-Komplex*  
mM *Millimolar*  
mRNA *messenger ribonucleic acid*

MVAC-Schema *Chemotherapiekombination aus Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin*

NaOH *Natriumhydroxid*

NBI *Narrow Band Imaging*

non- X- CTA *CTA, nicht auf dem X-Chromosom lokalisiert*

NY-ESO 1/CTAG1B *New York esophageal squamous cell carcinoma 1/cancer/testis antigen 1B*

pT *pathologische Klassifikation (d. h. die postoperative histopathologische Klassifikation)*

PBS *phosphate buffered saline*

PD1 *programmed cell death protein-1*

PDD *Photodynamische Diagnostik*

PD-L1 *programmed cell death ligand-1*

pH *potentia Hydrogenii*

PRAME *preferentially expressed antigen in melanoma*

pTis *Karzinoma in situ*

PUNLMP *papillary urothelial neoplasia with low malignant potency*

RT-PCR *Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion*

SEREX *serological identification of antigens by recombinant expression cloning*

STEAP-1 *six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1*

TNM *Tumor, Nodus, Metastase*

TUR-B *Transurethrale Resektion der Harnblase*

UICC *Union Internationale contre le Cancer*

UPUMP *Urothelial proliferation of uncertain malignant potential*

WHO *World Health Organization*

X- CTA *CTA, auf dem X-Chromosom lokalisiert*

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Urothelkarzinom der Harnblase

### 1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese

Das Urothelkarzinom der Harnblase ist eine maligne Tumorerkrankung, die meist in der Schleimhaut der Harnblase entsteht, aber auch an anderen Stellen der ableitenden Harnwege vorkommen, in tiefere Schichten infiltrieren und Metastasen bilden kann. In Deutschland erkrankten im Jahr 2012 11270 Männer und 4140 Frauen neu an einem invasiven Harnblasenkarzinom. Zusätzlich erkrankten rund 13500 Personen an einem nicht-invasiven papillären Karzinom (pTa) oder einem Carcinoma in situ (pTis) der Harnblase. Damit befindet es sich bei Männern an vierter Stelle (4,5 %) der häufigsten bösartigen Neuerkrankungen und bei Frauen an vierzehnter Stelle (1,8 %). 3791 Männer und 1826 Frauen starben am Urothelkarzinom der Harnblase. Für das Jahr 2016 wurden in Deutschland für Männer 11900 und für Frauen 4500 Neuerkrankungen prognostiziert [1]. 2012 erkrankten weltweit 429000 Menschen neu an einem Harnblasenkarzinom, davon 330000 Männer und 99000 Frauen. Die alterspezifische Inzidenzrate (pro 100000 Personen/Jahr) war 9.0 für Männer und 2.2 für Frauen. Weltweit starben 2012 bei 165000 Menschen daran; 123000 Männer und 42000 Frauen. Für die Sterbefälle betrug die altersspezifische Inzidenzrate (pro 100000 Personen/Jahr) bei Männern 3.2, bei Frauen 0.9 [2]. 2012 lag in Deutschland das mittlere Erkrankungsalter für Männer bei 74 Jahren, für Frauen bei 76 Jahren. Die relative Überlebensrate nach 10 Jahren betrug 2012 bei Männern 52 %, bei Frauen 44 %. Diese ungleiche Verteilung beruht auf der günstigeren Tumorstadienverteilung bei Männern mit 47 % pT1-Tumoren gegenüber 37 % pT1-Tumoren bei Frauen [1].

Verschiedene Medikamente wie Chlornaphazin, Phenacetin und Cyclophosphamid, chronische Entzündungen der Harnwege, Steinleiden, Bilharziose, endemische (Balkan-) Nephropathie, genetische Prädisposition und Radiatio gelten als gesicherte Risikofaktoren für die Entstehung [3]. Vor allem sogenannte aromatische Amine, die ubiquitär in der Umwelt vorkommen, gelten als kanzerogen [4]. Mit aromatischen Aminen beruflich exponierte Personen sind unter anderem Friseure, Lackierer, Beschäftigte in der Gummiindustrie/Lederindustrie oder Zahntechniker. Deshalb ist das Harnblasenkarzinom

durch aromatische Amine schon 1936 in die Liste der Berufserkrankungen aufgenommen worden.

Der wichtigste Risikofaktor stellt der direkte oder passive Tabakrauch und das darin enthaltene 2-Naphtylamin dar [5, 6]. Somit steigt das Risiko bei Rauchern um das 2-4fache an, ein Harnblasenkarzinom zu entwickeln [7]. Ein linearer Zusammenhang besteht in Dauer und Intensität des Tabakkonsums zum Risiko der Karzinomentwicklung [8]; nach ca. 15 Jahren Tabakabstinenz befindet sich das Risiko der Erkrankung wieder auf dem Niveau von Nichtrauchern [9]. Auch andere Faktoren wie zum Beispiel Diabetes oder Haarfärbemittel werden als Risiko für eine Harnblasenkarzinom diskutiert [11-13]. Über weitere mögliche Risikofaktoren wie beispielsweise mit Chlor verunreinigtes Trinkwasser, Kaffee, Süßstoff, Ernährungsgewohnheiten, Alkohol etc. wird noch geforscht [14]. Für Kaffee etwa ergab sich entgegen älteren Vermutungen bis jetzt aber kein Beweis für ein erhöhtes Risiko [14-16].

Das Karzinom entsteht zu 95 % aus dem Urothel (Übergangsepithel), welches Harnblase, Harnleiter und Nierenbecken auskleidet; oft kann die Neoplasie gleichzeitig an mehreren Stellen des Harntraktes manifest werden (sogenannte field cancerization). Nach aktueller WHO-Klassifikation wird das Urothelkarzinom in infiltrative Tumoren und nichtinvasive Tumoren differenziert. Beim infiltrativen Urothelkarzinom können noch zusätzliche Wachstumsmuster unterschieden werden: mikrozystisch, mikropapillär, nested (nestartige Tumorzellanordnung, einschließlich großzellig nested), lymphoepitheliom-artig, plasmazytoid, sarkomatoid, siegelringzellig, diffus, riesenzellig, lipid-reich, klarzellig oder gering differenziert. Ebenfalls mit einem breiten Spektrum an von reaktiv bis hochgradig maligne reichenden Atypien können nichtinvasive Urothelkarzinome in flache und papilläre Läsionen unterschieden werden. Seltener mit 2 % sind Plattenepithelkarzinome, 1 % Adenokarzinome, sowie verbleibende 2 % mit sehr seltenen Tumoren wie anaplastischem Karzinom oder neuroendokrinem Karzinom [17]. Zu nahezu 75 % liegt bei Diagnosestellung ein nicht-muskelinvasives Urothelkarzinom der Harnblase und zu 25 % ein muskelinvasives Urothelkarzinom der Harnblase vor [18]. Nicht-muskelinvasive Urothelkarzinome neigen zu einer hohen Rezidiv- und Progressionsrate, was eine intensive Therapie und regelmäßige Nachsorge erfordert [18]. Patienten mit muskelinvasivem Karzinom erleiden in bis zu 50 % innerhalb von 5 Jahren trotz Therapie eine Metastasierung [19].

### 1.1.2 Klassifikation und TNM-Stadium

Die Behandlungsmöglichkeiten und -konzepte hängen stark von der Ausdehnung des Tumors ab, welche nach dem international gültigen TNM-System, eingeführt durch die Union Internationale contre le Cancer, vorgenommen werden [20].

T steht hierbei für die Größe und vor allem Ausdehnung des Primärtumors, N für das Fehlen oder Vorhandensein von örtlich oder benachbart (-regionär-) befallenen Lymphknoten und M für das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen. Durch ein morphologisches Grading wird das Ausmaß der Abweichung des Tumorgewebes von normalem Gewebe mikroskopisch beurteilt. Dabei spielen unter anderem Form, Anzahl der Zellteilungen und Größe des Zellkerns eine Rolle. Das Grading spielt ebenfalls bei der Therapieplanung eine wichtige Rolle.

Tabelle 1: Tumorstadien nach TNM (UICC, 2010)

<b>Primärtumor T</b>	
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis/Cis	Tumor in situ/Carcinoma in situ: "flacher Tumor", flaches anaplastisches Epithel mit geringgradiger Differenzierung, ohne Polarität und ohne Invasion
Ta	nicht invasives papilläres Karzinom
T1	Invasion in die Lamina propria
T2	Tumor infiltriert Muskulatur
T2a	Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
T2b	Tumor infiltriert tiefe Muskulatur (äußere Hälfte)
T3	Tumor infiltriert perivesikales Gewebe:
T3a	mikroskopisch
T3b	makroskopisch (extravesikale Masse)
T4	Invasion in Nachbarorgane
T4a	Prostata, Uterus, Vagina
T4b	Bauch-oder Beckenwand
TX	Angaben zur Infiltration können nicht gemacht werden

<b>Regionäre Lymphknoten N</b>	
N0	keine befallenen Lymphknoten
N1	solitäre Lymphknoten-Metastase (hypogastrisch, obturatorisch, externe iliakale oder präsakrale Lymphknoten)
N2	multiple Lymphknoten-Metastasen (hypogastrisch, obturatorisch, externe iliakale oder präsakrale Lymphknoten)
N3	Lymphknoten-Metastasen entlang der Arteriae iliacae communes
NX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
<b>Fernmetastasen M</b>	
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden

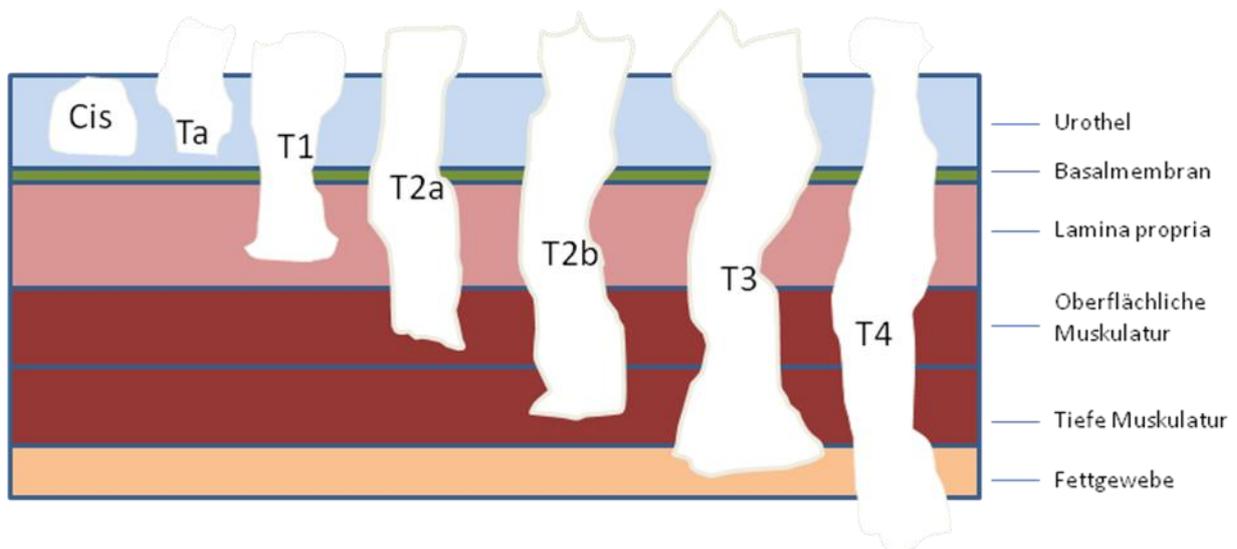


Abbildung 1: schematische T-Stadien Urothelkarzinom der Harnblase

Es existiert das dreistufige Grading nach der WHO-Klassifikation von 1973.

Danach folgte die WHO- Klassifikation von 2004, die aktuell, meist auch noch parallel zur alten Klassifikation, verwendet wird [21].

Inzwischen gibt es eine Klassifikation aus dem Jahr 2016, die mehr auf histologischer Typisierung und molekularer Charakterisierung basiert [17].

Tabelle 2: Grading nach WHO (1973)

G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert

Tabelle 3: Grading nach WHO (2004)

Urotheliales Papillom
PUNLMP ( papillary urothelial neoplasia with low malignant potency )
Low grade Karzinom
High grade Karzinom

Tabelle 4: neue WHO-Klassifikation 2016

<b>Noninvasive urothelial lesions</b>
Urothelial carcinoma in situ
Papillary urothelial carcinoma, low grade
Papillary urothelial carcinoma, high grade
Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential
Urothelial papilloma
Inverted urothelial papilloma
Urothelial proliferation of uncertain malignant potential (hyperplasia) (UPUMP)
Urothelial dysplasia

<b>Invasive urothelial tumours</b>
Infiltrating urothelial carcinoma with divergent differentiation
Nested, including large nested
Microcystic
Micropapillary
Lymphoepithelioma-like
Plasmacytoid/signet ring cell/diffuse
Sarcomatoid
Giant cell
Poorly differentiated
Lipid rich
Clear cell

### 1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild, Diagnostik und Therapie

Meist liegen bei Patienten mit Harnblasenkarzinom unspezifische Symptome vor; am häufigsten wird jedoch ein Harnblasenkarzinom bei Patienten durch Mikrohämaturie oder durch eine oftmals schmerzlose Makrohämaturie symptomatisch. Auch andere Symptome wie Dysurie, Entzündungen oder Flankenschmerz können auftreten [22, 23].

Nach einer Anamnese, die auch Fragen zu Nikotinabusus oder Exposition gegenüber oben genannten Noxen beinhaltet, folgt die körperliche Untersuchung. Diese sollte eine bimanuelle Palpation und die digital-rektale Untersuchung beinhalten.

Sonographisch kann eine Raumforderung in der Blase oder eine durch Harnstau entstandene Hydronephrose detektiert werden. Mit einer computertomographischen Untersuchung oder einer i.v.-Urographie können Raumforderungen dargestellt werden, im CT auch noch Nachbarorgane und Lymphknoten; diese Bildgebungen können jedoch keine flache Tumoren zeigen.

Die Spülzytologie von abgeschälten Tumorzellen hat eine hohe Sensitivität bei G3 bzw. high grade Karzinomen (84 %), aber eine niedrige Sensitivität bei G1 bzw. low grade Karzinomen (16 %) [24]. Die Sensitivität bei Tis schwankt zwischen 28-100 % [25]. Eine positive Zytologie kann ein Urothelkarzinomen im gesamten Harntrakt anzeigen; eine negative

Zytologie schließt einen Tumor nicht aus. Die Zytologie kann durch Steinleiden, Infekte, intravesikale Instillationen etc. verfälscht werden; bei erfahrenen Untersuchern beträgt die Spezifität jedoch über 90 % [26, 27]. Aufgrund der niedrigen Sensitivität bei G1 und low grade Tumoren wurden zahlreiche Urintests basierend auf Markern entwickelt (z. B. Blasen-tumor Assoziiertes Antigen oder Nukleäres Matrix Protein 22). Keiner davon wurde bis jetzt für die leitliniengerechte Diagnostik akzeptiert [27-29]. Die Zystoskopie ist Standard in der Detektion des Harnblasenkarzinoms. Mit der anschließenden diagnostischen transurethralen Resektion der Harnblase (TUR-B) wird einerseits die Diagnose des Karzinoms verifiziert, andererseits ist diese bereits kurativ bei vollständiger Resektion eines nicht-invasiven Harnblasenkarzinoms.

Normalerweise werden Zystoskopie und TUR-B unter Einsatz von Weißlicht durchgeführt. Manche Tumoren können so nicht erfasst werden. Deshalb wurden weitere Methoden entwickelt. Durch eine photodynamische Diagnostik (PDD), auch Fluoreszenzdiagnostik genannt, kann nach einer intravesikalen Instillation von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) oder Hexaminolävulinsäure (HEXVIX®) unter Einsatz von blauem Licht eine sensitivere Detektion von Karzinomen erreicht werden. Sie besitzt jedoch eine geringere Spezifität gegenüber Weißlicht [30, 31].

In Studien konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Narrow Band Imaging (NBI), bei dem der Kontrast zwischen normalem Gewebe und gut durchblutetem Karzinom verstärkt wird, zu einer verbesserten Detektionsrate führt [32, 33].

Bei gesicherten muskelinvasiven Tumoren wird ein Staging mittels Kontrastmittel-CT des Abdomens (mit CT-Urographie), des Beckens und des Thorax erforderlich. Nur bei auffälliger klinischer Symptomatik und/oder auffälligen diagnostischen Befunden wird ein Schädel-CT/eine Knochenszintigraphie durchgeführt [29].

Bei nicht-muskelinvasivem Karzinom besteht die Therapie aus der bereits erwähnten TUR-B. Wird bei der histologischen Untersuchung ein high grade pTa oder ein pT1-Tumor festgestellt, ist die initiale Resektion nicht vollständig erfolgt oder fehlt Muskelgewebe im resezierten Präparat, so sollte nach 2-6 Wochen eine Nachresektion erfolgen. Außerdem wird bis 24 h postoperativ die Instillation eines Chemotherapeutikums (Mitomycin C, Epirubicin, Pirarubicin) in die Harnblase empfohlen, zusätzlich kann danach bei high grade pTa oder bei pT1 Tumoren eine Rezidivprophylaxe erfolgen. Diese wird am häufigsten mit dem zuvor angewandten Chemotherapeutikum nach verschiedenen Instillationsschemata durchgeführt. Eine Immuntherapie im Sinne einer Instillation mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG) nach

transurethraler Resektion, bei der virulente Tuberkelbakterien lokal an der Schleimhaut eine Immunreaktion hervorrufen und damit auch maligne Zellen angreifen, ist ebenfalls möglich. Diese Instillation senkt das Rezidivrisiko [34]. Eine Instillation mit Alpha-Interferon in die Harnblase, welches immunmodulierend und antiproliferativ wird, oder des Mycobacterium-phlei-Zellwand-Nukleinsäure-Komplex (MCNA) kann für BCG-Versager diskutiert werden, es bestehen aber keine Empfehlungen [35, 36]. Beim pTis ist momentan die Langzeitbehandlung mit BCG-Installation nach TUR-B die Standardtherapie [37].

Beim muskelinvasiven Harnblasenkarzinom erfolgt im Stadium pT2-4, pN0-1 und M0 eine radikale Zystektomie mit ggf. vorheriger neoadjuvanter Chemotherapie und anschließender Harnableitung. Diese Harnableitung kann kontinent oder inkontinent angelegt werden. Die radikale Zystektomie besteht aus der Entfernung der Harnblase mit distalen Ureteranteilen und der Resektion der pelvinen und ggf. paraaortalen Lymphknoten. Beim Mann erfolgt noch die Resektion der Samenblasen, Prostata, proximalen Samenleitern und ggf. der Urethra. Bei der Frau werden ein Teil der vorderen Vaginalwand, der Uterus, wahlweise die Adnexen und ggf. die Urethra entfernt. Anschließend kann eine adjuvante Chemotherapie erfolgen. Im Stadium pN2-3 wird das gleiche Schema empfohlen, allerdings sollte hier eine Chemotherapie erfolgen. Neoadjuvante und adjuvante Chemotherapie mit Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin zusammen mit Cisplatin (MVAC-Schema) oder mit einer Gemcitabine-Cisplatin Kombination (GC-Schema) kann die Prognose verbessern [38, 39]. Eine Radiatio kann eine Alternative für Patienten sein, die keine radikale Zystektomie erhalten können [19].

Die Therapie des metastasierten Harnblasenkarzinoms erfolgt palliativ. Dazu wird eine systemische Polychemotherapie nach verschiedenen Schemata verabreicht, auch hier in erster Linie mit Cisplatin-haltigen Chemotherapeutikakombinationen [18, 19]. Studien zu neuen Immuntherapien laufen und erscheinen vielversprechend bei der hohen Mutationslast des Urothelkarzinoms [40, 41].

Die Prognose hängt von TNM-Stadium und Grading, aber auch von der Masse des Tumors und vom Vorkommen an verschiedenen Stellen gleichzeitig ab. Biologisches Alter und Komorbidität sind ebenfalls prognostisch relevant. Prognostisch eher günstig sind pTa und pT1 Tumoren mit niedrigem Differenzierungsgrad. Eine Tumornachsorge stellt einen wichtigen Bestandteil der Therapie dar. Frequenz und Art der Nachsorge hängen von Histologie und Behandlung ab.

Bei den nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinomen gestalten sich das Nachsorgeschema und die Zeitintervalle zwischen den Untersuchungen nach dem Scoring-System der EORTC

(European Organisation for Research and Treatment of Cancer) [42], welches folgende Faktoren berücksichtigt: Anzahl der Tumore, Tumorgröße, Rezidivrate, T- Stadium, Vorhandensein von CIS und Grading. Je nach Score kann eine Risikogruppe zugeordnet werden (low risk, intermediate risk, high risk).

Der Club Urologico Espaniol de Tratamento Oncologico (CUETO) hat für BCG-behandelte Patienten ein modifiziertes Score-System entwickelt [43].

Die Nachsorge von Patienten mit muskelinvasivem Blasenkarzinom und entsprechender Behandlung muss die Früherkennung von Tumorrezidiven, metabolischen Veränderungen und funktionellen Störungen beinhalten.

Zahlreiche molekulare Marker wurden im Hinblick auf die Prognose des Urothelkarzinoms der Harnblase untersucht. Darunter befinden sich GATA3, p63, p40, CK20, CK5/6, S100P, Uroplakin II und III, CK7, CK20, Ki-67, p53, CK5/6, CD44, Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR-3)-Mutationen, heme oxygenase 1-isoform (HMOX1), glutathione-S-transferase 1 (GSTT1), Human epidermal growth factor receptor 2 (Her2/neu) etc. [44]. Momentan kann laut konsensbasierter Empfehlung lediglich in Zweifelsfällen beim nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinom eine immunhistochemische Untersuchung mit p53, CK20 und KI-67 zur Unterscheidung low grade und high grade erfolgen. Weitere Studien werden erarbeitet [45].

Trotz der Bedeutung in Hinblick auf Prognosesicherheit und Therapiegestaltung konnte die Identifizierung molekularer Marker bis jetzt keine wesentlichen Informationen liefern.

Die Untersuchung von Cancer/Testis-Antigenen könnte neue Einblicke und Optionen eröffnen.

## **1.2 Cancer/Testis-Antigene**

Cancer/Testis-Antigen wurde erstmals 1997 als Begriff eingeführt und hat sich seitdem etabliert [46]. Cancer/Testis-Antigene (CTA) bilden eine Gruppe von Proteinen, die natürlicherweise nur im Keimzellgewebe oder in den Trophoblasten der Plazenta vorkommen [47-49]. Darüber hinaus bilden sie eine große Familie von tumorassoziierten Antigenen [50], die im Gegensatz zu tumorspezifischen Antigenen auch von gesunden Zellen gebildet werden. Die exprimierenden Arten von gesundem Gewebe beschränken sich jedoch auf vorherig genannte, in anderen gesunden Geweben werden sie gar nicht oder nur minimal exprimiert, so dass die „Tumorspezifität“ hervorgehoben werden kann. Immer mehr verschiedene in Krebszellen exprimierte CTA werden identifiziert; das Ludwig Institute for Cancer Research

führt eine ständig aktualisierte Cancer Testis-Database über die bisher entdeckten CTA [51]. Mittlerweile sind über 100 CTA-Familien bekannt.

Einige Autoren klassifizieren die CTA anhand ihrer Expressionsmuster in 3 Gruppen, nämlich in testis-restricted, testis/brain-restricted und testis-selective. Dabei bildet die Gruppe der testis-selective CTA die größte Gruppe [51, 52].

Simpson et al. unterteilten die damals bekannten CTA in solche, die auf dem X-Chromosom lokalisiert sind (X-CTA) und solche, die nicht dort lokalisiert sind (non-X-CTA) [49].

10 % des menschlichen X-Chromosoms bestehen aus CTA, wie durch die Analyse dessen herausgefunden wurde [53].

X-CTA gruppieren sich als Genfamilien auf dem Chromosom, non-X-CTA dagegen verteilen sich normalerweise ungruppiert auf dem gesamten Genom [49].

In normalen männlichen Keimzellen werden X-CTA vornehmlich im Stadium der Spermatogonien exprimiert, die proliferierende Keimzellen darstellen [54]. Non-X-CTA dagegen werden eher in einem späteren Stadium gebildet, dem der Spermatozyten [55].

Das erste CTA, MAGE A1, wurde 1991 in Melanomen entdeckt. Als Identifikationsmethode wurde eine T-Zell-basierende Epitop-Klonierungsstrategie benutzt [56]. Mit SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) fand sich eine weniger zeit- und kostenintensivere Methode zur Detektion der CTA. Dabei handelt es sich um ein serologisches Verfahren zur Identifikation von Tumorantigenen, bei der zuerst cDNA-Expressionsbibliotheken aus Tumor-mRNA hergestellt werden. Dann werden diese in Bakteriophagen kloniert und in E.coli-Bakterien exprimiert. Das darauffolgende Zusammenbringen mit Antikörpern in Seren von Tumorpatienten kann Antigene detektieren, eine anschließende Sequenzanalyse erklärt die molekulare Struktur des Antigens [57, 58]. Seitdem schreitet die Erforschung dieser vielversprechenden Proteine voran.

Da CTA auf Krebszellen beschränkt sind (außer den oben genannten gesunden Geweben) und in Versuchen zum Teil starke humorale und/oder zelluläre Immunantworten [59-61] provozieren, bildet dies ideale Voraussetzungen, um CTA als Targets in der Tumor-Vakzin-Therapie einzusetzen. Natürlich vorkommende CTA im gesunden Gewebe, beispielsweise Hoden, sind durch die Blut-Hoden-Schranke vor Immunantworten geschützt. Durch nicht vorhandene HLA-Klasse-1-Moleküle auf der Keimzelloberfläche können keine Proteine präsentiert und vom Immunsystem erkannt werden [62]. Außerdem verhindert die Schranke den Kontakt zwischen Immunzellen und heranreifenden Keimzellen [63]. Diese Tatsache nährt die Hoffnung auf eine nebenwirkungsreduzierte Krebstherapie [47]. Nakamura,

Noguchi et al. lieferten 2009 erstmals Hinweise auf eine spontane Remission eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms, eventuell bedingt durch NY-ESO 1-Antikörper und anti-NY-ESO 1 CD4 T-Zellen und CD8 T-Zellen des Patienten [64]. GlaxoSmithKline setzte ein rekombinantes MAGE A3-Protein bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und metastasiertem Melanom in 3-Phasen Studien ein [65-67]. Die Untersuchungen wurden letztendlich nicht bis zum festgelegten Endpunkt durchgeführt, aber es zeigte sich ein vielversprechender Ansatz [68].

Die Interaktion von verschiedenen CTA und eventuelle Regulationen stehen ebenfalls im Fokus der Untersuchungen, erstmals durch Cho, Caballero et al. 2006 [69]. Dort untersuchte man die CTA NY-ESO 1 und MAGE C1 als Bindungspartner lokalisiert im Zytoplasma. In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass die dort untersuchten CTA unter anderem durch epigenetische Modifikationen wie Demethylierung am Promotor und Histonacetylierung reguliert werden. Zum Beispiel zeigten 2006 Wischnewski, Pantel et al., dass bei einigen MAGE-Genen durch Behandlung mit der demethylierenden Substanz 5-aza-2'-deoxycytidin (DAC) die Expression dieser CTA gefördert wird [70]. Durch zusätzliche Behandlung mit dem Antibiotikum und Histon-Deacetylierungsinhibitor Trichostatin A kann die DAC-induzierte Expression zusätzlich heraufreguliert werden. Die Behandlung von NY-ESO 1 und weiteren CTA-X mit DAC zeigten ähnliche Ergebnisse [71].

Auch zur Krebsfrüherkennung könnten CTA herangezogen werden [72, 73].

Oftmals korreliert die Ausprägung einiger CTA mit höheren Tumorstadien, wie in einigen Studien zu verschiedenen Krebsarten (unter anderem auch zum Harnblasenkarzinom) untersucht wurde [74-76].

Über die genaue Funktion von CTA in gesundem Gewebe oder Tumorgewebe ist wie schon erwähnt noch nur wenig bekannt. Es stellt sich immer noch die Frage, ob CTA nur Nebenprodukte der Tumorentstehung sind oder direkt oder indirekt an der Neogenese beteiligt sind. Sicher ist auf jeden Fall, dass CTA zelluläre Prozesse wie Signalwege, Transkription, Translation und chromosomale Rekombination beeinflussen. Dies wird im nachfolgenden Abschnitt dargestellt.

### 1.2.1 Cancer/Testis-Antigene in dieser Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit zwei CTA im Harnblasenkarzinom: melanoma-associated antigen 3 (MAGE A3) und New York esophageal squamous cell carcinoma 1 ((NY-ESO 1), anderer Name für NY-ESO 1: cancer/testis antigen 1B (CTAG1B)).

Außerdem wird das six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1 (STEAP-1) im Harnblasenkarzinom untersucht. Dabei handelt es sich um ein Zelloberflächenantigen, das außer in gesundem Prostatagewebe und in geringerer Ausprägung im Harnblasengewebe vorwiegend in verschiedenen Krebsarten überexprimiert ist, besonders an Zell-Zell-Kontakten am sekretorischen Epithel der Prostata und Krebszellen der Prostata [77]. Per definitionem gehört STEAP-1 also nicht zu den CTA, erfüllt aber ähnliche Kriterien. Das dritte ursprünglich geplante CTA preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) musste aufgrund von unzureichenden immunhistochemischen Färbeeigenschaften des erworbenen Antikörpers mit der von uns eingesetzten Methode entfallen.

Tabelle 5: In dieser Arbeit untersuchte CTA mit Familie, Kennung, Genort, Immunantwort und Identifikationsmethode

CTA	weitere Namen	CTA-Familienmitglieder	CT-Kennung	Genort	Immunantwort	Identifikationsmethode
MAGE A3	HIP8 , HYPD , MAGE3 , MGC14613	15	CT 1.3	Xq28	zellulär und humoral	T- Zell Epitop Klonen
NY-ESO 1	CTAG1B, CTAG , CTAG1 , ESO1 , LAGE-2 , LAGE2B	3	CT 6.1	Xq28	zellulär und humoral	SEREX

MAGE A3 wurde erstmals in Melanomen identifiziert [78]. Bisher konnte MAGE A3 schon in vielen verschiedenen malignen Prozessen nachgewiesen werden. Unter anderem konnte bei gesunden Probanden sowie bei Patienten mit Lungenkrebs oder Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich eine MAGE A3-spezifische CD4 T-Zell-vermittelte Immunantwort nachgewiesen werden [79, 80]. Humorale Immunantworten mit Antikörperbildung gegen MAGE A3 wurden auch bei mehreren Tumorarten detektiert, beispielsweise bei kolorektalem Karzinom [81]. Zahlreiche Untersuchungen zu diesem CTA liegen bisher vor; darunter eine Arbeit die zeigt, dass MAGE A3 im multiplen Myelom nicht an der Regulation von Zellproliferation und -adhäsion beteiligt ist, jedoch die Genstilllegung dieses CTA zur Verbesserung der Prognose führt [82]. Außerdem ist MAGE A3 eines der am häufigsten untersuchten CTA in Bezug auf eine Tumor-Vakzine aufgrund der genannten spontanen humoralen oder der zellulären Immunantworten [67, 83].

NY-ESO 1 wurde 1997 von Chen, Scanlan et al. im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus entdeckt [46]. Bis heute konnte auch dieses CTA in einer Vielzahl an Tumoren nachgewiesen werden. Wie im vorherigen Text beschrieben, konnten zelluläre Immunantworten aufgrund NY-ESO 1 in vielen Tumorarten ausgelöst werden, unter anderem im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom [64]. Spontane humorale Immunantworten liegen ebenfalls bei mehreren untersuchten Krebsarten wie Lungenkarzinom oder Ovarialkarzinom vor; die Serumkonzentration der Antikörper gegen NY-ESO 1 scheint bei höherem T-Stadium oder Grading zu steigen [84-86]. 2013 konnten erstmals menschliche monoklonale Antikörper gegen NY-ESO 1 geklont werden, die im Tierversuch als Kombination zusammen mit Chemotherapie mit erfolgversprechendem Resultat angewendet wurden [87]. Die Bedeutung von NY-ESO 1 als zukünftige Immuntherapie unterstreichen weitere Arbeiten, die die starke Expression von NY-ESO 1 in malignen Tumoren hervorheben [88, 89] Zu NY-ESO 1 liegen mehrere Untersuchungen als zukünftige Tumor-Vakzinierung vor [90-92].

STEAP-1 war das erste identifizierte Mitglied der STEAP Familie, bestehend aus STEAP-1 bis STEAP-4 [77, 93, 94]. STEAP-1 kommt in einigen Tumorarten vor, darunter Tumoren der Prostata, der Harnblase, des Darms oder des Hodens. Die Rolle von STEAP-1 beispielsweise in der Zellproliferation oder im Tumorwachstum ist noch weitestgehend unklar. Aber diverse Studien an verschiedenen Krebsarten (am häufigsten wurde das Prostatakarzinom angegeben) sehen einen möglichen Einsatz von STEAP-1 in der Tumor-Vakzin-Therapie [95-97].

### **1.3 Fragestellung**

Die biologischen Grundlagen lassen CTA als potentielle zukünftige Prognosemarker und/oder Therapietargets für das Harnblasenkarzinom erscheinen.

In dieser Arbeit soll deshalb die immunhistochemische Bedeutung der Expression der Cancer/Testis-Antigene MAGE A3 und NY-ESO 1 und von STEAP-1 im Harnblasenkarzinom untersucht werden. Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

Sind MAGE A3, NY-ESO 1 und STEAP-1 im Harnblasenkarzinom exprimiert?

Gibt es Unterschiede in der Färbeintensität und/oder -verteilung und somit in der Expression zwischen den Tumorstadien?

Gibt es eine Korrelation der Expressionsstärke mit dem histopathologischen Grading?

Können MAGE A3, NY-ESO 1 und STEAP-1 zur prognostische Beurteilung von Harnblasenkarzinomen herangezogen werden?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Herkunft der untersuchten Tumorproben**

Die Proben der untersuchten Harnblasenkarzinome stammen von Patienten der Universitätsklinik für Urologie am Caritas-Krankenhaus St. Josef in Regensburg. Von den ursprünglich 94 in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben (FFPE-Gewebe) waren 93 für diese Arbeit verwertbar. Bei den Tumorproben wurde an einem HE-Schnitt die Repräsentativität und das Grading von einem erfahrenen Facharzt für Pathologie überprüft. Die FFPE-Gewebeproben wurden zwischen 1994 und 2009 gewonnen. Es handelt sich dabei um Tumoren der TNM-Tumorstadien pTa, pT1 und pT2 in den Differenzierungsgraden G1, G2 und G3. Das Grading erfolgte nach der WHO-Klassifikation von 1973 (siehe Tabelle oben).

Neben histopathologischen wurden auch klinische Parameter mit den ermittelten immunhistochemischen Analysen in Beziehung gesetzt und das tumorspezifische Überleben erhoben.

Die Proben stammten retrospektiv aus der Routinehistologie, das Patientenkollektiv wurde vollständig anonymisiert, so dass aus den vorliegenden Daten keinerlei Rückschlüsse mehr

auf den ursprünglichen Tumorpatienten möglich sind und nach den Vorgaben der Ethikkommission an der Universität Würzburg diese Art der Untersuchung ohne gesondertes Ethikvotum möglich war.

## **2.2 Prinzipien der Immunhistochemie**

Um die zu untersuchenden Strukturen (Antigene) im vorhandenen Gewebe sichtbar zu machen, nutzt man die Antigen-Antikörper-Reaktion. Dazu werden spezifische Antikörper (AK) verwendet, die direkt oder indirekt an einen Farbstoff gekoppelt sind. Es handelt sich hierbei um monoklonale Antikörper. Diese werden von Plasmazellklonen gebildet, sind immunhistochemisch alle identisch, affin für das gleiche Epitop und werden hauptsächlich in Mäusen hergestellt. Die dadurch erzielte hohe Spezifität erleichtert das Auswerten der Gewebeproben, da zusätzliche unerwünschte Anfärbungen/Kreuzreaktionen minimiert werden können.

Ein aufwendiges Verfahren stellt das Markieren des „Primärantikörpers“ dar; üblicher ist das Verwenden von markierten „Sekundärantikörpern“. Zur Signalverstärkung ist der Einsatz von „Tertiärantikörpern“ möglich, die an den zweiten Antikörper binden.

Eine Vielzahl von Färbe-/Detektionsmethoden ist existent, darunter eines der häufigsten Verfahren, die sogenannte Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode).

Hierbei ist der sekundäre Antikörper durch das wasserlösliche Vitamin Biotin markiert. An dieses Biotin bindet Avidin (ursprünglich aus Hühnereiweiß, heute aus gentechnisch hergestelltem Streptavidin, isoliert aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii*, gewonnen). Avidin besitzt insgesamt vier Biotinbindungsstellen, welche im Anschluss durch Markermoleküle besetzt werden können, die wiederum zur Sichtbarmachung mit Biotin gekoppelt sind. Ein solches Markermolekül ist z. B. Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP).

Eine Modifikation dieser Methode ist die Labeled (Strept-) Avidin-Biotin-Methode (LSAB), bei der nur ein Komplex aus Streptavidin und Markermolekül verwendet wird, der an das Biotin bindet [98].

In der vorliegenden Arbeit wurde das ADVANCE™ HRP Detektionssystem (ready-to-use, Code K4067, K4068, K4069, Fa. Dako) als Färbeverfahren genutzt; dieses zeichnet sich dadurch aus, dass es biotinfrei ist und zum Nachweis niedriger

Antigenkonzentrationen im Gewebe eingesetzt werden kann. Durch die Abwesenheit von Biotin werden unspezifische Färbungen aus endogenen Avidin-Biotin-Aktivitäten im Gewebe verhindert oder zumindest abgeschwächt. Als zweiten Schritt beinhaltet das System ADVANCE™ HRP Link (enthält sekundäre Anti-Maus und Anti-Kaninchen-AK in Tris-HCl-Puffer mit Stabilisierungsproteinen und einem antimikrobiellen Wirkstoff). Dritter Schritt des Systems ist ADVANCE™ HRP Enzyme (enthält mit Meerrettichperoxidase polymerisierte AK in Tris-HCl-Puffer mit Stabilisierungsproteinen und einem antimikrobiellen Wirkstoff). Zur anschließenden Sichtbarmachung des Zielantigens nach Oxidation (sichtbar als braunes Endprodukt) wurde das Substratchromogensystem Liquid DAB+ Substrate Chromogen System von Dako (Code K3468) genutzt. Dieses beinhaltet 5 ml DAB+ Chromogen (3,3'-Diaminobenzidin in Chromogenlösung) und 110 ml DAB+ Substratpuffer (Imidazol-HCl-Puffer, pH-Wert 7,5, enthält Wasserstoffperoxid und einen antimikrobiellen Wirkstoff).

### **2.3 Vorbereitung des auszuwertenden Materials**

Zunächst wurde das FFPE-Gewebe auf einer Kühlplatte (70045, 70060, Fa. Medax) gekühlt; das Kühlen ist wichtig, um aus den Paraffinblöcken mit einem Microtom (SM 2000R, Fa. Leica) 0,5 µm dünne Schnitte herstellen zu können. Danach wurden die Schnitte auf silanbeschichtete Objektträger (SuperFrost®Plus, Fa. R. Langenbrinck) aufgebracht, in dem sie in einem ca. 55 °C warmen Wasserbad (1052, Fa. GFL) aufgezogen wurden. Die Silanbeschichtung dient der besseren Haftung des aufgezogenen Gewebes. Anschließend wurde überschüssiges Wasser abgetropft und die Objektträger über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet (weitere Möglichkeit: Trocknung für 60 min bei 56-58 °C im Trockenschrank, TDO 66, Fa. Medite). Danach wurden die Schnitte in Xylol 20-25 min entparaffiniert. Ab diesem Schritt durften die Schnitte nicht mehr austrocknen. Darauf folgte die Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (je 2 x 2 min in hundertprozentigem, neunzigprozentigem, achtzigprozentigem, siebzigprozentigem Ethanol) unter Bewegung, bis eine Schlierenbildung verschwunden war.

Anschließend wurden die Schnitte fließend in Aqua dest. gewässert. Jetzt konnten die Färbungen erfolgen; dazu wurde ein Färbeautomat (freedom evo, Fa. Tecan) genutzt. Durch vorherige Austestung an Probeschnitten und parallelen Färbekontrollen mit Normalgewebe

aus Nieren- und Hodenparenchym, die in vierprozentigem gepufferten Formalin fixiert waren und aus dem Routineeingang der Pathologie der Leopoldina-Krankenhaus GmbH, Gustav-Adolf-Str. 8, 97422 Schweinfurt stammten, wurde die beste Färbemethode für die Schnitte in dieser Arbeit herausgefunden. So wurden bei jedem Antikörper verschiedene Färbemethoden, verschiedene oder keine Antigen-Demaskierungsmethoden und zuletzt verschiedene Konzentrationen der Antikörper-Verdünnungen getestet. Das jeweils beste Ergebnis ist in den einzelnen Färbeprotokollen angeführt. Dabei wurde bei den Färbeverläufen auch immer für jeden Antikörper der vorher ausgetestete Kontrollschnitt mitgeführt. Die Positivkontrollen enthielten gesichert das gesuchte Antigen; bei den Negativkontrollen wurde der AK ausgespart, um mögliche unspezifische Anfärbungen oder Verfälschungen zu identifizieren.

## **2.4 Färbeprotokolle**

### **2.4.1 Färbeprotokoll MAGE A3**

Zur vorherigen Austestung wurde Hodengewebe genutzt. Verwendet wurde ein monoklonaler, aus der Maus stammender und gegen menschliches Gewebe gerichteter Antikörper gegen MAGE A3 (Klon 1A10, Fa. antikörper-online.de, Produktnummer: ABIN1499253). Die Verdünnung betrug 1 : 500. Zur Verdünnung wurde Antibody Diluent (Ready-to-use, Code S0809, Fa. Dako) verwendet, in diesem Fall 30 µl AK + 14970 µl Antibody Diluent, da für aufgerundet 100 Schnitte 15 ml AK-Lösung benötigt wurden.

Zur Antigendemaskierung wurden die Objektträger 8 min auf höchster Stufe im Schnellkochtopf in Citratpuffer (pH 6,0, 20 mM; Zusammensetzung: 42 g Citronensäure-1-hydrat + 21 g Natriumhydroxid auf 10 l Aqua dest., dann Einstellung mit NaOH oder HCl auf pH 6,0) erhitzt, danach in Aqua dest. oder Leitungswasser abgekühlt.

Jetzt konnten die Schnitte luftblasenfrei in Coverplates (Shandon Coverplate™, Fa. Thermo Scientific) eingepasst werden und mit PBS-Puffer (phosphate buffered saline = phosphatgepufferte Salzlösung, pH 7,4; Zusammensetzung: 72 g Natriumchlorid + 14,8 g Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat + 4,3 g Kaliumdihydrogenphosphat auf 10 l Aqua dest., anschließend pH-Wert-Einstellung auf 7,4) gespült werden. Es war darauf zu achten, dass der Puffer gleichmäßig in den Coverplates abläuft. Die Coverplates wurden in den Automaten eingelegt und folgendes Färbeprogramm eingestellt:

Inkubation mit Primärantikörper in der Verdünnung 1 : 500, Einwirkzeit 60 min, danach 3-5 min Spülung mit PBS-Puffer. Inkubation mit ADVANCE™ HRP Link, Einwirkzeit 20 min, danach 3-5 min Spülung mit PBS-Puffer. Inkubation mit ADVANCE™ HRP Enzyme, Einwirkzeit 20 min, danach wieder 3-5 min Spülung mit PBS-Puffer. Anschließende 10-minütige Inkubation in Substratchromogensystem in der Verdünnung 1 : 50, danach Spülung mit Aqua dest..

Ab jetzt fanden die Schritte nicht mehr im Färbeautomaten statt. Zur besseren Wahrnehmung der Reaktion durch Bläuung wurde eine Gegenfärbung für 3 min im Hämalaunbad nach Mayer (Zusammensetzung: 6 g Hämatoxylin + 1 g Natriumiodat + 250 g Kaliumaluminiumsulfat-12-hydrat + 250 g Chloral-1-hydrat + 5 g Citronensäure-1-hydrat auf 5 l Aqua dest.; in dieser Reihenfolge über Nacht anrühren und Behälter anschließend vor Gebrauch 4-6 Wochen offen stehen lassen) mit anschließender 10-minütiger Wässerung mit Leitungswasser durchgeführt.

Jetzt wurden die Schnitte in hundertprozentigem Ethanol geschwenkt und für 25 min im Trockenschrank bei 55 °C getrocknet. Zum Abschluss wurden die Schnitte in Xylol getaucht und im Eindeckautomaten (TISSUE- TEK, Fa. Sakura) eingedeckt.

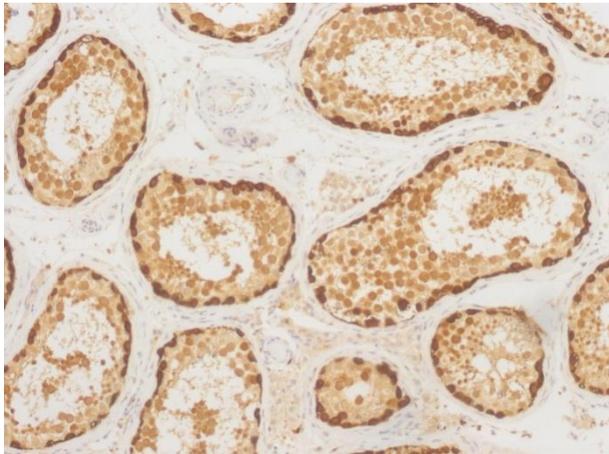


Abbildung 2: Positivkontrolle immunhistochemische Färbung MAGE A3 Hodengewebe

(Vergrößerung 100fach; positive Zellen färben sich braun)

### 2.4.2 Färbeprotokoll NY-ESO 1

Zur vorherigen Austestung wurde Hodengewebe verwendet, zum einen gesundes Hodengewebe, zum anderen Gewebe von einem embryonalen Hodenkarzinom. Im Hoden wurden die Sertoli-Zellen positiv angefärbt, Zellen des Interstitiums blieben negativ. Verwendet wurde ein monoklonaler, aus der Maus stammender und gegen menschliches Gewebe gerichteter AK gegen NY-ESO 1 (Klon 3C9, Fa. antikoerper-online.de, Produktnummer: ABIN411041). Die Verdünnung betrug 1 : 50, hier also 300 µl AK und 14700 µl Antibody Diluent.

Zur Antigendemaskierung wurden die Objektträger 3 min auf höchster Stufe im Schnellkochtopf in Target Retrieval Solution (Tris/EDTA-Puffer, pH 9,0; 10fach; verdünnt auf 1 : 10, Code S2367, Fa. Dako) erhitzt und anschließend in Aqua dest. oder Leitungswasser gekühlt.

Ab jetzt gleiches Färbeprotokoll wie bei MAGE A3, nur mit NY-ESO 1 als Primärantikörper.

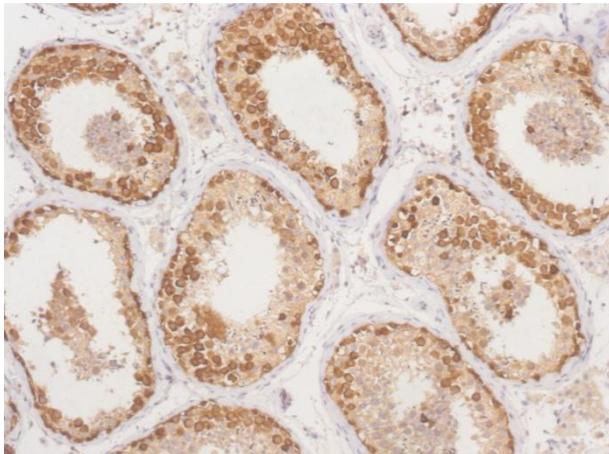


Abbildung 3: Positivkontrolle immunhistochemische Färbung NY-ESO 1 Hodengewebe  
(Vergrößerung 100fach; positive Zellen färben sich braun)

### 2.4.3 Färbeprotokoll STEAP-1

Zur vorherigen Austestung wurde Nierengewebe verwendet. Man sieht eine kräftige spezifische immunhistochemische Färbereaktion im Kontrollgewebe, das nach Vorgaben der Herstellerdatenblätter für die Antikörper ausgewählt wurde. Verwendet wurde ein

monoklonaler, aus der Maus stammender und gegen menschliches Gewebe gerichteter AK gegen STEAP-1 (Klon J2D2, Fa. LifeSpan, BioSciences, Inc., Catalog-ID: LS-B3003/31773). Die Verdünnung betrug 1 : 400, in diesem Fall also 37,5 µl AK und 14962,5 µl Antibody Diluent. Bei diesem AK wurde durch vorheriges Austesten festgestellt, dass keine Antigendemaskierung notwendig war.

Ab jetzt gleiches Färbeprotokoll wie bei MAGE A3, nur mit STEAP-1 als Primärantikörper.

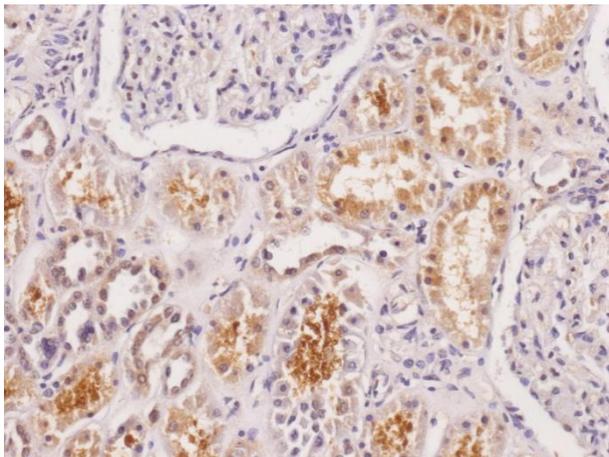


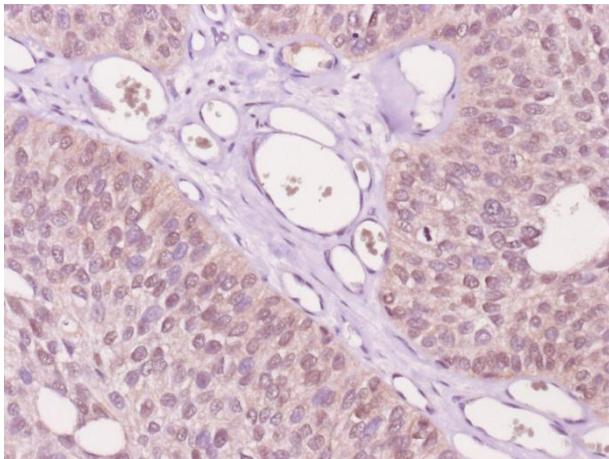
Abbildung 4: Positivkontrolle immunhistochemische Färbung STEAP-1 Nierengewebe  
(Vergrößerung 100fach; positive Zellen färben sich braun)

## **2.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbung**

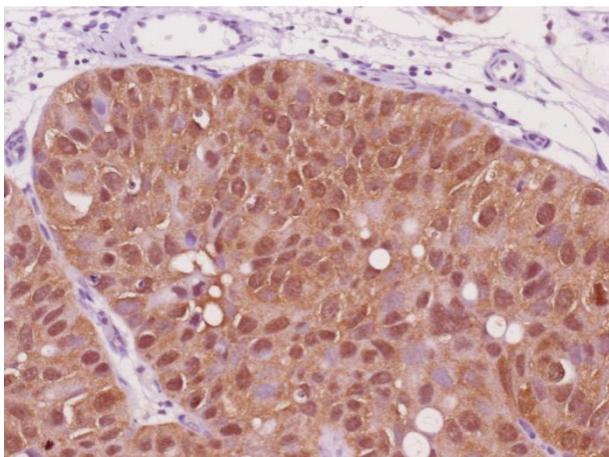
Die semiquantitative Auswertung der Ausprägung der Färbungen für MAGE A3, STEAP-1 und NY-ESO 1 erfolgte unter Supervision von Priv.-Doz. Dr. med. Völker (Pathologe, Leopoldina Krankenhaus Schweinfurt) nach folgenden Kriterien:

**Tabelle 6: Färbeintensität und Expression**

0	negativ (keine Färbung) = keine Expression
1	fokal schwach angefärbt = fokal schwache Expression
2	kontinuierlich schwach angefärbt = schwache Expression im gesamten Tumoreal
3	fokal stark angefärbt = fokal starke Expression
4	kontinuierlich stark angefärbt = starke Expression im gesamten Tumoreal



**Abbildung 5: Immunhistochemische Färbung MAGE A3 Urothelkarzinom**  
(Anfärbung kontinuierlich schwach, Vergrößerung 200fach;  
positive Zellen färben sich braun)



**Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung MAGE A3 Urothelkarzinom**  
(Anfärbung kontinuierlich stark, Vergrößerung 200fach;  
positive Zellen färben sich braun)

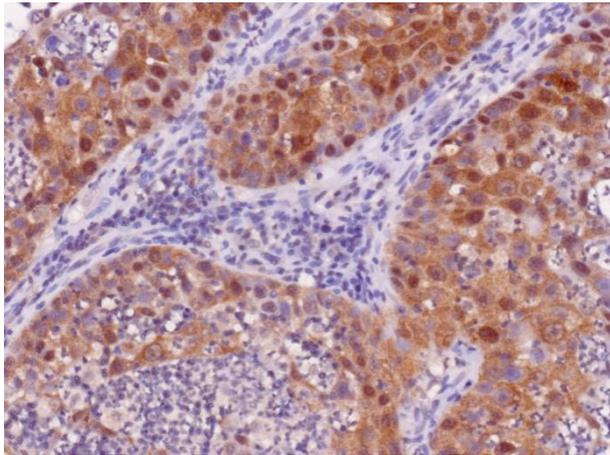


Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung MAGE A3 Urothelkarzinom  
(Anfärbung kontinuierlich stark, Vergrößerung 200fach;  
positive Zellen färben sich braun, nicht angefärbtes Material  
ist reaktiv verändertes Urothel)

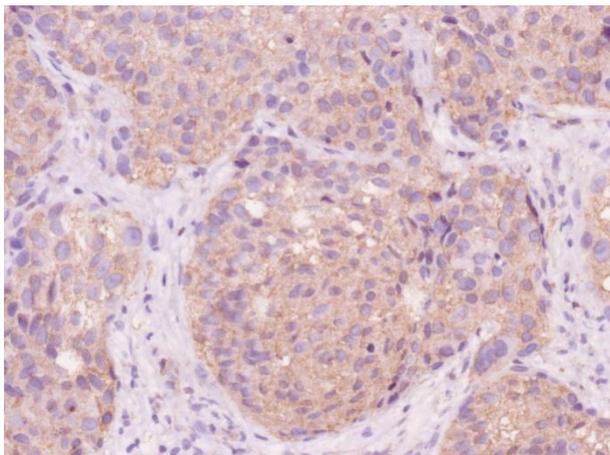


Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung NY-ESO 1 Urothelkarzinom  
(Anfärbung kontinuierlich schwach, Vergrößerung 200fach;  
positive Zellen färben sich braun)

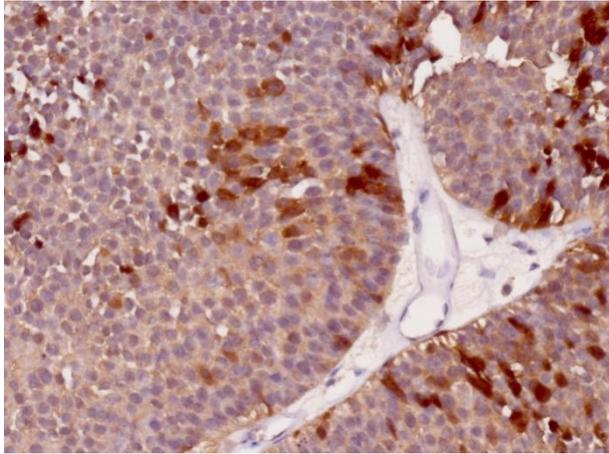


Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung NY-ESO 1 Urothelkarzinom

(Anfärbung kontinuierlich schwach, fokal stark, Vergrößerung 200fach;  
positive Zellen färben sich braun)

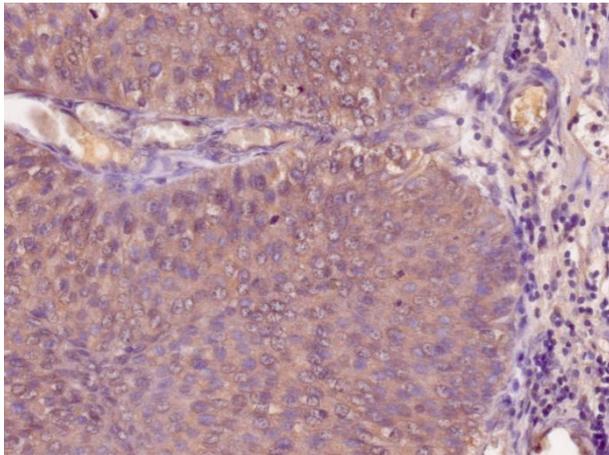


Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung STEAP-1 Urothelkarzinom

(Anfärbung kontinuierlich schwach, Vergrößerung 200fach;  
positive Zellen färben sich braun)

Zur Auswertung wurde ein Mikroskop Olympus BX50 F4 (Fa. Olympus) verwendet. Zwischen der Färbung von Membran und Zytoplasma (ggf. auch Nukleus) wurde nicht differenziert, da die Färbungen fast ausnahmslos gleichmäßig in den Zellen reagierten. In die weitere Auswertung ging das vorherrschende Expressionsverhalten ein.

## **2.6 Statistische Auswertung**

Die Datenerfassung und -auswertung sowie die Berechnung der Signifikanzen wurde mit Hilfe des Computersoftwareprogramms SPSS Version 23.0 (IBM Statistics) durchgeführt. Die Berechnung der statistischen Relevanz der Unterschiede bei der Erstellung der Überlebenskurven nach Kaplan-Meier erfolgte mittels Log-Rank-Test. Hierbei wurden die tumorspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeiten ermittelt. Um auch die Patienten in die Analyse mit einbeziehen zu können, die tumorunabhängig verstorben waren bzw. deren Todesursache unklar war, wurden diese als zensiert behandelt. Das Signifikanzniveau wurde bei 5 % ( $p < 0.05$ ) angesetzt. Hochsignifikante Ergebnisse wurden bei einem p-Wert  $< 0.005$  angenommen. Die Ermittlung der Abhängigkeiten zwischen den Parametern erfolgte mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes nach Pearson.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Deskriptive Analyse klinisch-pathologische Parameter**

Von den vorliegenden 93 FFPE-Geweben gingen alle Tumorproben in die Auswertung ein. Bei dem zu untersuchenden Material handelte es sich um Tumorgewebe von 76 Männern und 17 Frauen; das Alter der Patienten lag im Mittel bei 68 Jahren. Der jüngste Patient war 41, der älteste Patient 90 Jahre alt. Bei 42 Patienten lag das Tumorstadium pTa (45,2 %), bei 29 Patienten das Tumorstadium pT1 (31,2 %) und bei 22 Patienten das Tumorstadium pT2 (23,7 %) vor (s. Abbildung 11).

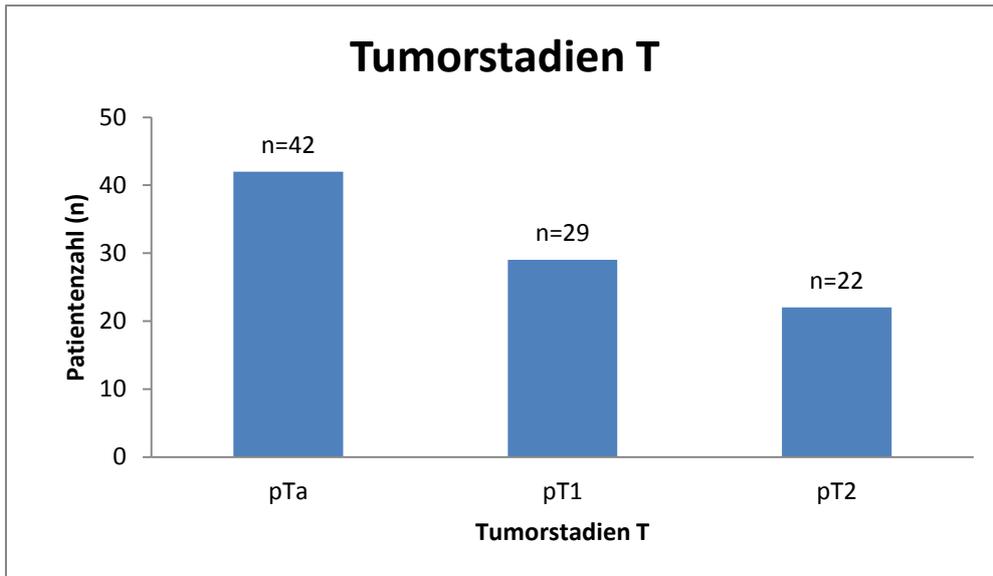


Abbildung 11: Verteilung der Tumorstadien nach Häufigkeit

Die Einteilung nach Malignitätsgrad/Grading erfolgte bei dieser Arbeit in die Differenzierungsgrade G1 bis G3, wobei G3 mit „schlecht differenziert bis undifferenziert“ gleichzusetzen ist. Es fanden sich 17 Fälle mit dem Differenzierungsgrad G1 (18,3 %), 29 Fälle mit G2 (31,2 %) und 47 Fälle mit G3 (50,5 %); dies ist auf Abbildung 12 dargestellt.

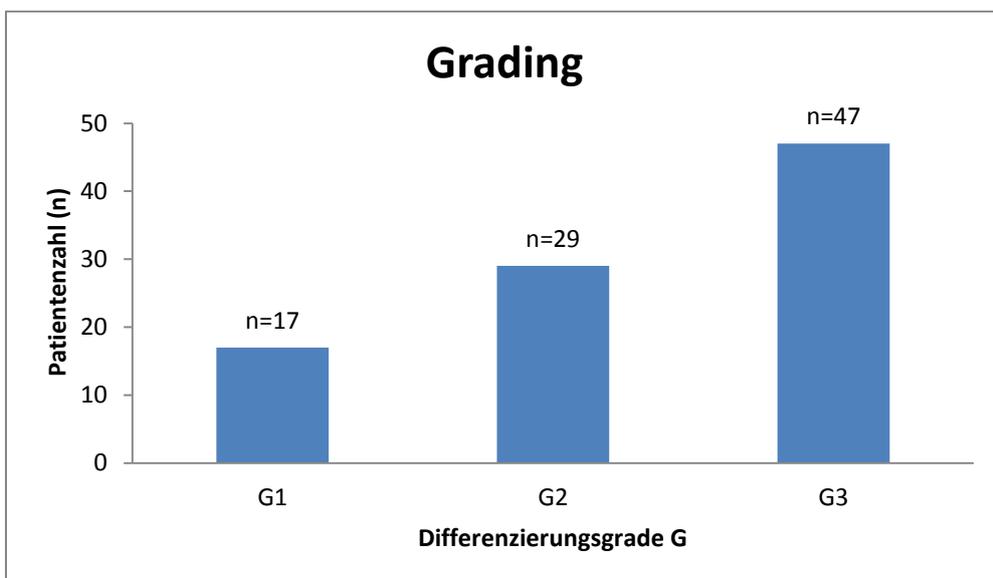


Abbildung 12: Verteilung des Gradings nach Häufigkeit

Alle Basischarakteristika des untersuchten Kollektivs einschließlich der Tumoreigenschaften sind in folgender Tabelle dargestellt:

Tabelle 7: Basischarakteristika des untersuchten Kollektivs

<b>Basischarakteristika</b>	<b>Kollektiv (n=93)</b>
<b>Geschlecht</b>	
männlich	76
weiblich	17
<b>Alter (Jahre)</b>	
Median	68 Jahre
≤ 75	68 Patienten
> 75	25 Patienten
<b>Tumorstadium T</b>	<b>Kollektiv (n=93); (prozentualer Anteil)</b>
pTa	42; (45,2 %)
pT1	29; (31,2 %)
pT2	22; (23,7 %)
<b>Grading G</b>	
G1	17; (18,3 %)
G2	29; (31,2 %)
G3	47; (50,5 %)

### 3.2 Ergebnisse der Färbungen in Bezug auf T-Stadium und Grading

In den folgenden Ergebnistabellen wird das Expressionsverhalten der CTA MAGE A3 und NY-ESO 1 und von STEAP-1 in Bezug auf T-Stadium und Grading dargestellt. Dazu wurde zu Beginn der Erstellung dieser Arbeit das Expressionsverhalten in zwei weitere abgewandelte Kategorien Umfang und Intensität unterschieden, um anschließend das Verhalten in den drei vorhandenen Tumorstadien und drei Gradingstufen besser beurteilen zu können. Zum einen wurde der Umfang der Expression bestimmt, in dem dieser in „keine oder fokale Expression“ und in „Expression im gesamten Tumor“ unterteilt wurde. Das bedeutet,

dass alle Proben, die keine Färbung aufzeigten, zusammen mit allen Proben, die entweder fokal schwach oder fokal stark angefärbt wurden, zur einen Gruppe Umfang gezählt wurden, zur anderen Gruppe Umfang zählten alle Proben, die entweder eine schwache oder eine starke Färbereaktion in der ganzen Tumorprobe zeigten. Zum anderen wurde die Intensität der Färbung in „keine oder schwache Expression“ und „starke Expression“ unterteilt. Dies bedeutet, dass zur einen Gruppe Intensität alle nicht angefärbten sowie alle schwach fokal oder schwach im ganzen Tumor angefärbten Tumorproben zählten und zur anderen Gruppe Intensität alle Tumorproben mit starker fokaler Färbung oder starker Färbung im ganzen Tumor gezählt wurden.

Somit ließen sich beide Eigenschaften getrennt beurteilen, was für die routinemäßige Beurteilung der Marker jedoch nicht zielführend erschien.

Daher wurden die beiden ursprünglich erhobenen Klassifikationen zu einer zusammengeführt und lediglich zwischen fehlender/schwacher Expression und starker Expression stratifiziert.

Die Beobachtung richtete sich dabei auf eventuell vorhandene Korrelationen zwischen Expression/Verteilung des entsprechenden CTA/STEAP-1 und des T-Stadiums und/oder des Differenzierungsgrades.

### 3.2.1 Expression MAGE A3

Die Auswertung der Färbeintensität und somit der Expression der CTA/von STEAP-1 wurde nach den Kriterien wie bereits oben dargestellt (siehe auch Tabelle 6) vorgenommen. Dabei ergaben sich für MAGE A3 im Tumorgewebe der 93 Fälle folgende in Tabelle 8 und Abbildung 13 dargestellten Expressionsmuster:

Tabelle 8: Art und Verteilung der Expression von MAGE A3 im Tumorgewebe

<b>Expression</b>	<b>Häufigkeit (n)</b>
0 (keine Expression)	29
1 (fokal schwache Expression)	17
2 (schwache Expression im gesamten Tumoreal)	33
3 (fokal starke Expression)	8
4 (starke Expression im gesamten Tumoreal)	6

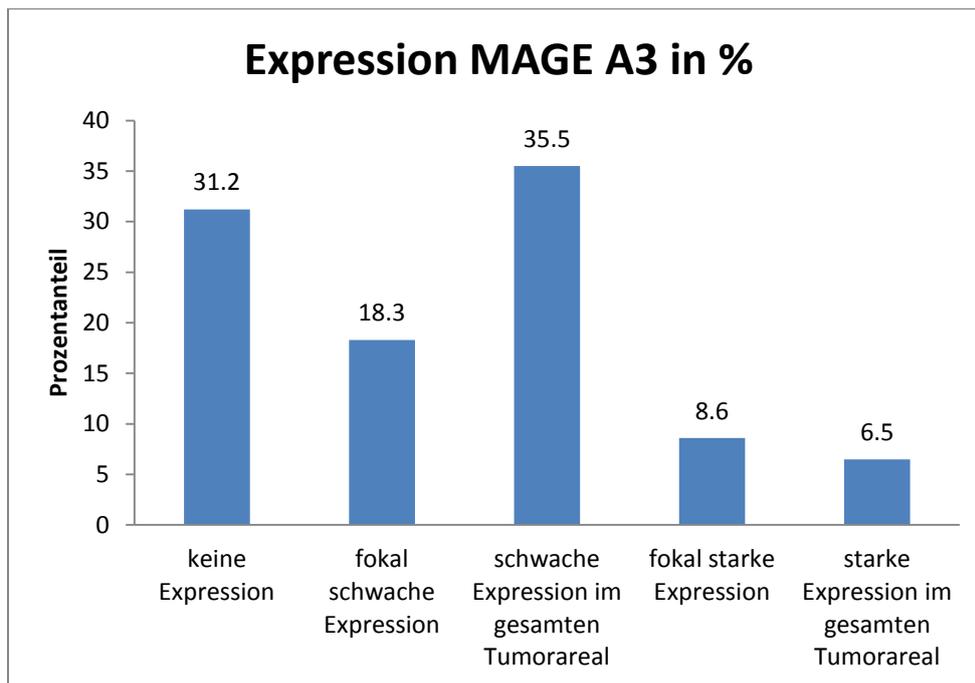


Abbildung 13: Verteilung der Expression von MAGE A3 in Prozent der untersuchten Fälle

Zusammengefasst in die Kategorien „keine oder schwache Expression“ und „starke Expression“ ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tabelle 9: Expressionsergebnisse von MAGE A3 hinsichtlich der pT-Stadien

pT-Stadium		MAGE A3		Gesamtsumme
		keine oder schwache Expression	starke Expression	
pTa	Anzahl (n)	39	3	42
	% innerhalb des pT-Stadiums	92,9 %	7,1%	100,0 %
	% innerhalb von MAGE A3	49,4 %	21,4 %	45,2 %
	% der Gesamtzahl	41,9 %	3,2 %	45,2 %
pT1	Anzahl (n)	23	6	29
	% innerhalb des pT-Stadiums	79,3 %	20,7 %	100,0 %

	% innerhalb von MAGE A3	29,1 %	42,9 %	31,2%
	% der Gesamtzahl	24,7 %	6,5 %	31,2 %
pT2	Anzahl (n)	17	5	22
	% innerhalb des pT-Stadiums	77,3 %	22,7 %	100,0 %
	% innerhalb von MAGE A3	21,5 %	35,7 %	23,7 %
	% der Gesamtzahl	18,3 %	5,4 %	23,7 %
Gesamtsumme	Anzahl (n)	79	14	93
	% innerhalb des pT-Stadiums	84,9 %	15,1 %	100,0 %
	% innerhalb von MAGE A3	100,0 %	100,0 %	100,0 %
	% der Gesamtzahl	84,9 %	15,1%	100,0 %

Es zeigten sich bezogen auf die T-Stadien bei 84,9 % der Gesamtfälle keine oder eine schwache Expression und bei 15,1 % eine starke Expression im gesamten Tumor. Ein signifikanter Zusammenhang war mit  $p = 0.150$  nicht gegeben.

Tabelle 10: Expressionsergebnisse von MAGE A3 hinsichtlich des Gradings

Grading		MAGE A3		Gesamtsumme
		keine oder schwache Expression	starke Expression	
G1	Anzahl (n)	17	0	17
	% innerhalb des Gradings	100 %	0 %	100,0 %
	% innerhalb von MAGE A3	21,5 %	0 %	18,3 %
	% der Gesamtzahl	18,3 %	0 %	18,3 %
G2	Anzahl (n)	26	3	29

	% innerhalb des Gradings	89,7 %	10,3 %	100,0 %
	% innerhalb von MAGE A3	32,9 %	21,4 %	31,2%
	% der Gesamtzahl	28,0 %	3,2 %	31,2 %
G3	Anzahl (n)	36	11	47
	% innerhalb des Gradings	76,6 %	23,4 %	100,0 %
	% innerhalb von MAGE A3	45,6 %	78,6 %	50,5 %
	% der Gesamtzahl	38,7 %	11,8%	50,5 %
Gesamtsumme	Anzahl (n)	79	14	93
	% innerhalb des Gradings	84,9 %	15,1 %	100,0 %
	% innerhalb von MAGE A3	100,0 %	100,0 %	100,0 %
	% der Gesamtzahl	84,9 %	15,1%	100,0 %

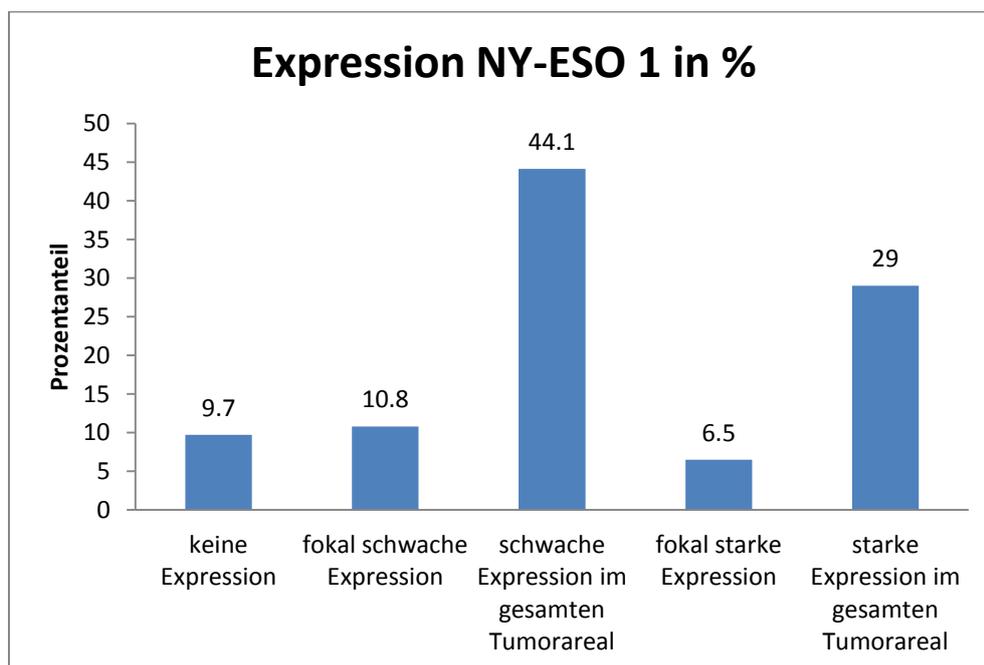
Es zeigten sich bezogen auf das Grading bei 84,9 % der Gesamtfälle keine oder eine schwache Expression und bei 15,1 % eine starke Expression im gesamten Tumor. Ein signifikanter Zusammenhang war mit  $p = 0.048$  gegeben.

### 3.2.2 Expression NY-ESO 1

Das Expressionsmuster von NY-ESO 1 im Tumorgewebe bei insgesamt 93 Fällen ergab folgende Ergebnisse, dargestellt in Tabelle 17 und Abbildung 14:

**Tabelle 11:** Art und Verteilung der Expression von NY-ESO 1 im Tumorgewebe

<b>Expression</b>	<b>Häufigkeit (n)</b>
0 (keine Expression)	9
1 (fokal schwache Expression)	10
2 (schwache Expression im gesamten Tumorareal)	41
3 (fokal starke Expression)	6
4 (starke Expression im gesamten Tumorareal)	27



**Abbildung 14:** Verteilung der Expression von NY-ESO 1 in Prozent der untersuchten Fälle

Zusammengefasst in die Kategorien „keine oder schwache Expression“ und „starke Expression“ ergaben sich folgende Ergebnisse:

**Tabelle 12:** Expressionsergebnisse von NY-ESO 1 hinsichtlich der pT-Stadien

pT-Stadium		NY-ESO 1		Gesamtsumme
		keine oder schwache Expression	starke Expression	
pTa	Anzahl (n)	30	12	42
	% innerhalb des pT-Stadiums	71,4 %	28,6%	100,0 %
	% innerhalb von NY-ESO 1	50,0 %	36,4 %	45,2 %
	% der Gesamtzahl	32,3 %	12,9 %	45,2 %
pT1	Anzahl (n)	18	11	29
	% innerhalb des pT-Stadiums	62,1 %	37,9 %	100,0 %
	% innerhalb von NY-ESO 1	30,0 %	33,3 %	31,2%
	% der Gesamtzahl	19,4 %	11,8 %	31,2 %
pT2	Anzahl (n)	12	10	22
	% innerhalb des pT-Stadiums	54,5 %	45,5 %	100,0 %
	% innerhalb von NY-ESO 1	20,0 %	30,3 %	23,7 %
	% der Gesamtzahl	12,9 %	10,8 %	23,7 %
Gesamtsumme	Anzahl (n)	60	33	93
	% innerhalb des pT-Stadiums	64,5 %	35,5 %	100,0 %
	% innerhalb von NY-ESO 1	100,0 %	100,0 %	100,0 %
	% der Gesamtzahl	64,5 %	35,5%	100,0 %

Bezogen auf die T-Stadien zeigten sich bei 64,5 % der Gesamtfälle keine oder eine schwache Expression und bei 35,5 % eine starke Expression im gesamten Tumor. Ein signifikanter Zusammenhang war mit  $p = 0.385$  nicht gegeben.

**Tabelle 13:** Expressionsergebnisse von NY-ESO 1 hinsichtlich des Gradings

Grading		NY-ESO 1		Gesamtsumme
		keine oder schwache Expression	starke Expression	
G1	Anzahl (n)	17	0	17
	% innerhalb des Gradings	100 %	0 %	100,0 %
	% innerhalb von NY-ESO 1	28,3 %	0 %	18,3 %
	% der Gesamtzahl	18,3 %	0 %	18,3 %
G2	Anzahl (n)	20	9	29
	% innerhalb des Gradings	69,0 %	31,0 %	100,0 %
	% innerhalb von NY-ESO 1	33,3 %	27,3 %	31,2%
	% der Gesamtzahl	21,5 %	9,7 %	31,2 %
G3	Anzahl (n)	23	24	47
	% innerhalb des Gradings	48,9 %	51,1 %	100,0 %
	% innerhalb von NY-ESO 1	38,3 %	72,7 %	50,5 %
	% der Gesamtzahl	24,7 %	25,8%	50,5 %
Gesamtsumme	Anzahl (n)	60	33	93
	% innerhalb des Gradings	64,5 %	35,5 %	100,0 %
	% innerhalb von NY-ESO 1	100,0 %	100,0 %	100,0 %
	% der Gesamtzahl	64,5 %	35,5 %	100,0 %

Hier zeigten sich bezogen auf das Grading bei 64,5 % der Gesamtfälle keine oder eine schwache Expression und bei 35,5 % eine starke Expression im gesamten Tumor. Eine starke

Expression von NY-ESO 1 war dabei statistisch hochsignifikant mit schlechter differenzierten Tumoren assoziiert ( $p < 0.001$ ).

### 3.2.3 Expression STEAP-1

Das Expressionsmuster von STEAP-1 im Tumorgewebe bei insgesamt 93 Fällen wird in Tabelle 26 und Abbildung 15 dargestellt:

Tabelle 14: Art und Verteilung der Expression von STEAP-1 im Tumorgewebe

Expression	Häufigkeit (n)
0 (keine Expression)	19
1 (fokal schwache Expression)	28
2 (schwache Expression im gesamten Tumoreal)	33
3 (fokal starke Expression)	9
4 (starke Expression im gesamten Tumoreal)	4

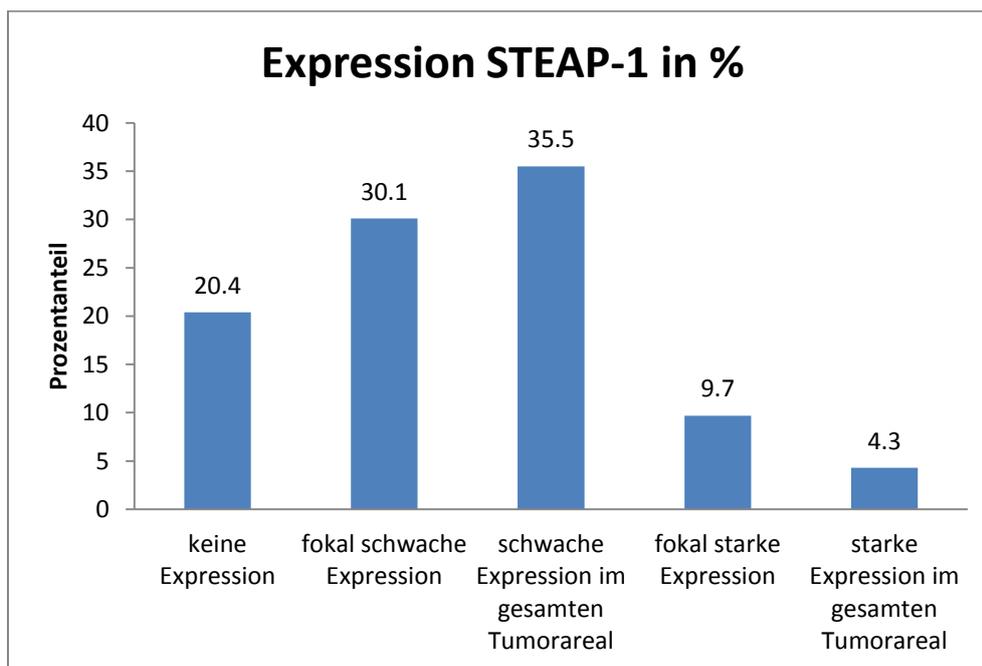


Abbildung 15: Verteilung der Expression von STEAP-1 in Prozent der untersuchten Fälle

Zusammengefasst in die Kategorien „keine oder schwache Expression“ und „starke Expression“ ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tabelle 15: Expressionsergebnisse von STEAP-1 hinsichtlich der pT-Stadien

pT-Stadium		STEAP-1		Gesamtsumme
		keine oder schwache Expression	starke Expression	
pTa	Anzahl (n)	38	4	42
	% innerhalb des pT-Stadiums	90,5 %	9,5 %	100,0 %
	% innerhalb von STEAP-1	47,5 %	30,8 %	45,2 %
	% der Gesamtzahl	40,9 %	4,3 %	45,2 %
pT1	Anzahl (n)	25	4	29
	% innerhalb des pT-Stadiums	86,2 %	13,8 %	100,0 %
	% innerhalb von STEAP-1	31,3 %	30,8 %	31,2%
	% der Gesamtzahl	26,9 %	4,3 %	31,2 %
pT2	Anzahl (n)	17	5	22
	% innerhalb des pT-Stadiums	77,3 %	22,7 %	100,0 %
	% innerhalb von STEAP-1	21,3 %	38,5 %	23,7 %
	% der Gesamtzahl	18,3 %	5,4 %	23,7 %
Gesamtsumme	Anzahl (n)	80	13	93
	% innerhalb des pT-Stadiums	86,0 %	14,0 %	100,0 %
	% innerhalb von STEAP-1	100,0 %	100,0 %	100,0 %
	% der Gesamtzahl	86,0 %	14,0 %	100,0 %

Auf die T-Stadien bezogen ergaben sich bei 86,0 % der Gesamtfälle keine oder eine schwache Expression und bei 14,0 % eine starke Expression im gesamten Tumor. Ein signifikanter Zusammenhang war mit  $p = 0.351$  nicht gegeben.

Tabelle 16: Expressionsergebnisse von STEAP-1 hinsichtlich des Gradings

Grading		STEAP-1		Gesamtsumme
		keine oder schwache Expression	starke Expression	
G1	Anzahl (n)	16	1	17
	% innerhalb des Gradings	94,1 %	5,9 %	100,0 %
	% innerhalb von STEAP-1	20,0 %	7,7 %	18,3 %
	% der Gesamtzahl	17,2 %	1,1 %	18,3 %
G2	Anzahl (n)	25	4	29
	% innerhalb des Gradings	86,2 %	13,8 %	100,0 %
	% innerhalb von STEAP-1	31,3 %	30,8 %	31,2%
	% der Gesamtzahl	26,9 %	4,3 %	31,2 %
G3	Anzahl (n)	39	8	47
	% innerhalb des Gradings	83,0 %	17,0 %	100,0 %
	% innerhalb von STEAP-1	48,8 %	61,5 %	50,5 %
	% der Gesamtzahl	41,9 %	8,6 %	50,5 %
Gesamtsumme	Anzahl (n)	80	13	93
	% innerhalb des Gradings	86,0 %	14,0 %	100,0 %
	% innerhalb von STEAP-1	100,0 %	100,0 %	100,0 %
	% der Gesamtzahl	86,0 %	14,0 %	100,0 %

In dieser Auswertung des Färberresultats zeigten sich bezogen auf das Grading bei 86,0 % der Gesamtfälle keine oder eine schwache Expression und bei 14,0 % eine starke Expression im gesamten Tumor. Ein signifikanter Zusammenhang war mit  $p = 0.525$  nicht gegeben.

### 3.2.4 Expression allgemein

Insgesamt zeigte sich in den 93 untersuchten Tumorgeweben der Harnblase eine Expression von MAGE A3 zu 68,8 %, von NY-ESO 1 zu 90,3 % und von STEAP-1 zu 79,6 %, unabhängig von starker oder schwacher Expression und fokaler oder im gesamten Tumor vorhandener Expression.

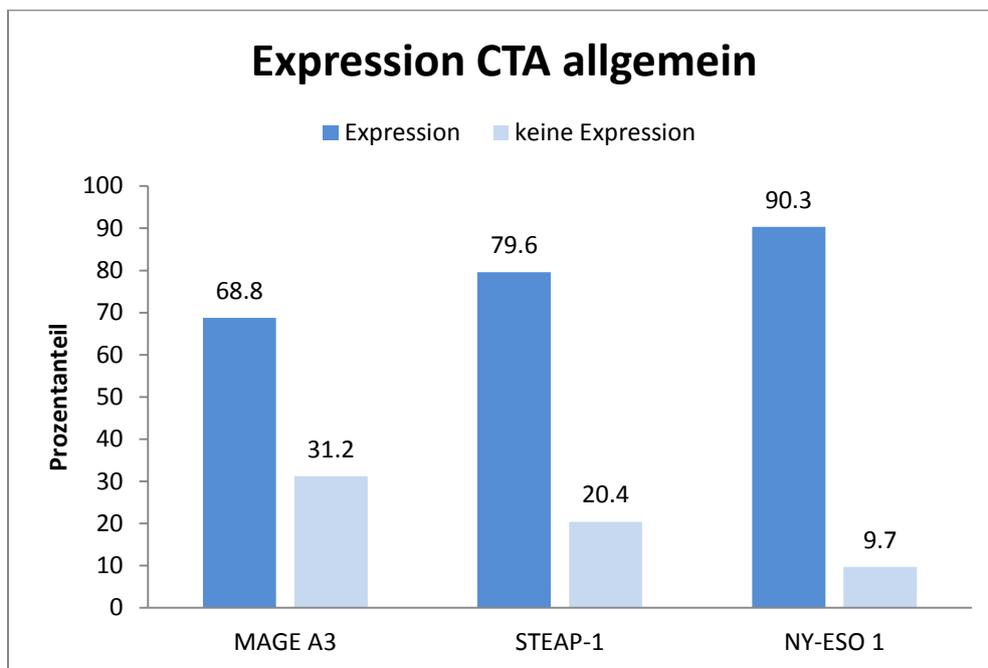


Abbildung 16: Expression MAGE A3, STEAP-1 und NY-ESO 1 allgemein im untersuchten Urothelkarzinom der Harnblase

### 3.3 Überlebenswahrscheinlichkeiten nach Kaplan-Meier

Um Prognosefaktoren für das Überleben der Patienten mit CTA oder STEAP-1 zu identifizieren, wurde eine univariate Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier durchgeführt. Hier konnten insgesamt 93 Patienten eingeschlossen werden. Dafür

wurde das kumulative Überleben gegen die Überlebenszeit (SurvivalDauer) in Monaten aufgetragen. Für diese wurden die Parameter Färbereaktion MAGE A3, Färbereaktion NY-ESO-1 und Färbereaktion STEAP-1 verwendet.

Außerdem wurden zu den Mittelwerten jeweils der Standardfehler und das 95 %-Konfidenzintervall bestimmt.

### **3.3.1 Überlebenskurven in Abhängigkeit der immunhistochemischen Färbereaktion mit MAGE A3**

Für die Auswertung in Abhängigkeit von der Färbereaktion mit MAGE A3 wurden 93 Patienten eingeschlossen. Davon zeigten 79 eine schwache bis keine Färbereaktion, 14 reagierten mit starker Anfärbung.

Das Ergebnis des p-Wertes beim progressionsfreien Überleben war mit 0.032 statistisch signifikant. Eine schwache bis keine Reaktion auf MAGE A3 zeigt offenbar einen Überlebensvorteil an. Das progressionsfreie Überleben von Patienten bei keiner/schwacher Expression von MAGE A3 lag nach 60 Monaten bei 84 % und bei 59 % im Falle starker Expression. Abbildung 17 zeigt die zugehörigen Überlebenskurven nach Kaplan-Meier.

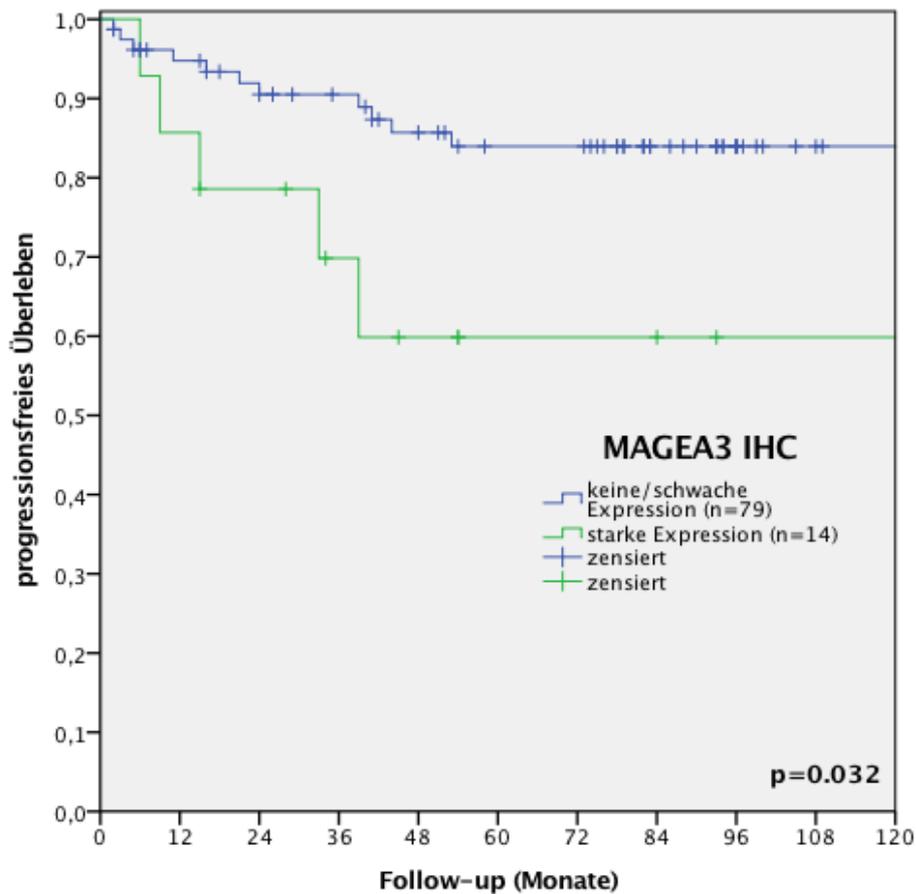


Abbildung 17: progressionsfreies Überleben nach Färbereaktion MAGE A3

Der p-Wert für das rezidivfreie Überleben ist mit 0.993 nicht statistisch signifikant

Das rezidivfreie Überleben von Patienten bei keiner/schwacher Expression von MAGE A3 lag nach 60 Monaten bei 60 % und bei 64 % bei starker Expression. Abbildung 18 zeigt die zugehörigen Überlebenskurven nach Kaplan-Meier.

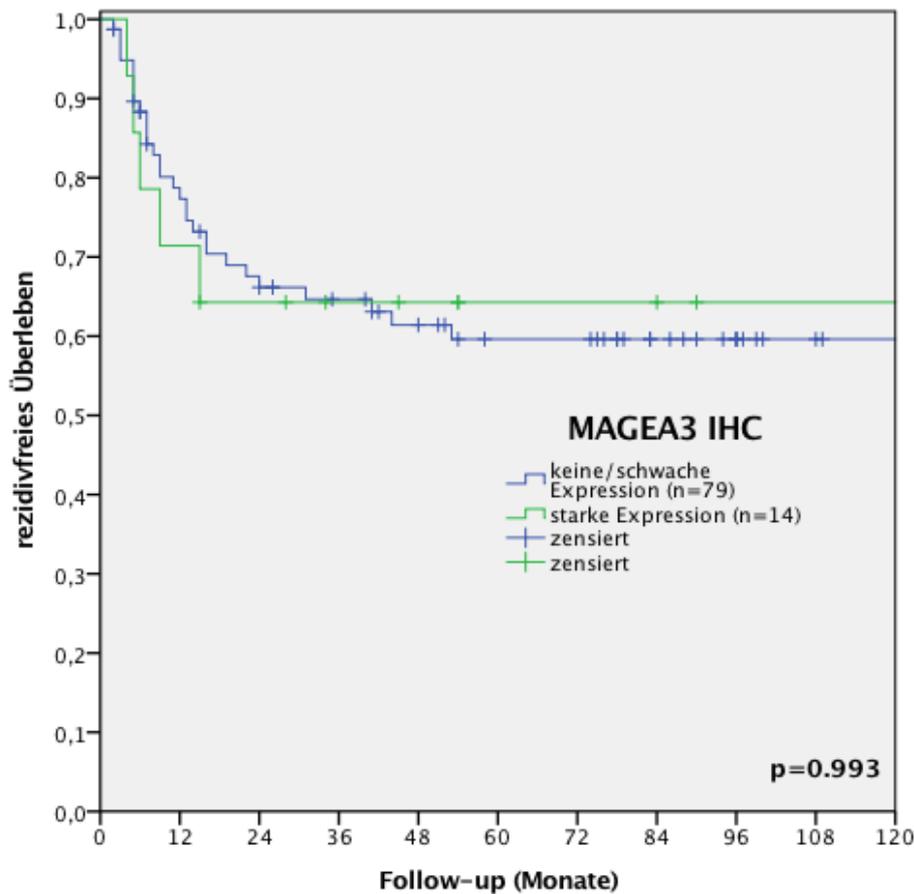


Abbildung 18: rezidivfreies Überleben nach Färbereaktion MAGE A3

### 3.3.2 Überlebenskurven in Abhängigkeit der immunhistochemischen Färbereaktion mit NY-ESO 1

Es konnten 93 Patienten in die Auswertung eingeschlossen werden. Davon zeigten 60 eine schwache bis keine Färbereaktion, 33 reagierten mit starker Anfärbung.

Die Analyse der Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier beim progressionsfreien Überleben ergab bei dieser Untersuchung mit einem p-Wert von 0.405 kein statistisch signifikantes Ergebnis. In Abbildung 19 sind die zugehörigen Überlebenskurven nach Kaplan-Meier dargestellt.

Das progressionsfreie Überleben von Patienten bei keiner/schwacher Expression von NY-ESO 1 lag nach 60 Monaten bei 82 % und bei 76 % bei starker Expression.

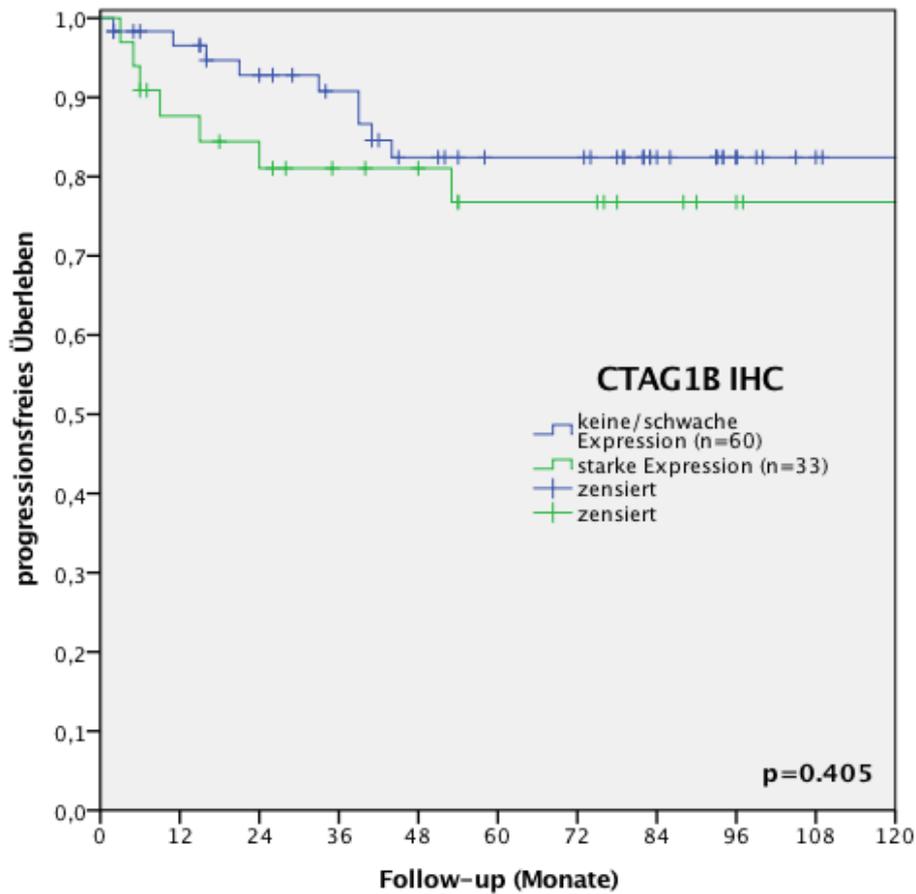


Abbildung 19: progressionsfreies Überleben nach Färbereaktion NY-ESO 1 (hier unter CTAG1B geführt)

Der p-Wert für das rezidivfreie Überleben war mit 0.562 nicht statistisch signifikant.

Das rezidivfreie Überleben von Patienten bei keiner/schwacher Expression von NY-ESO 1 lag nach 60 Monaten bei 58 % und bei 64 % bei starker Expression. Abbildung 20 zeigt die zugehörigen Überlebenskurven nach Kaplan-Meier.

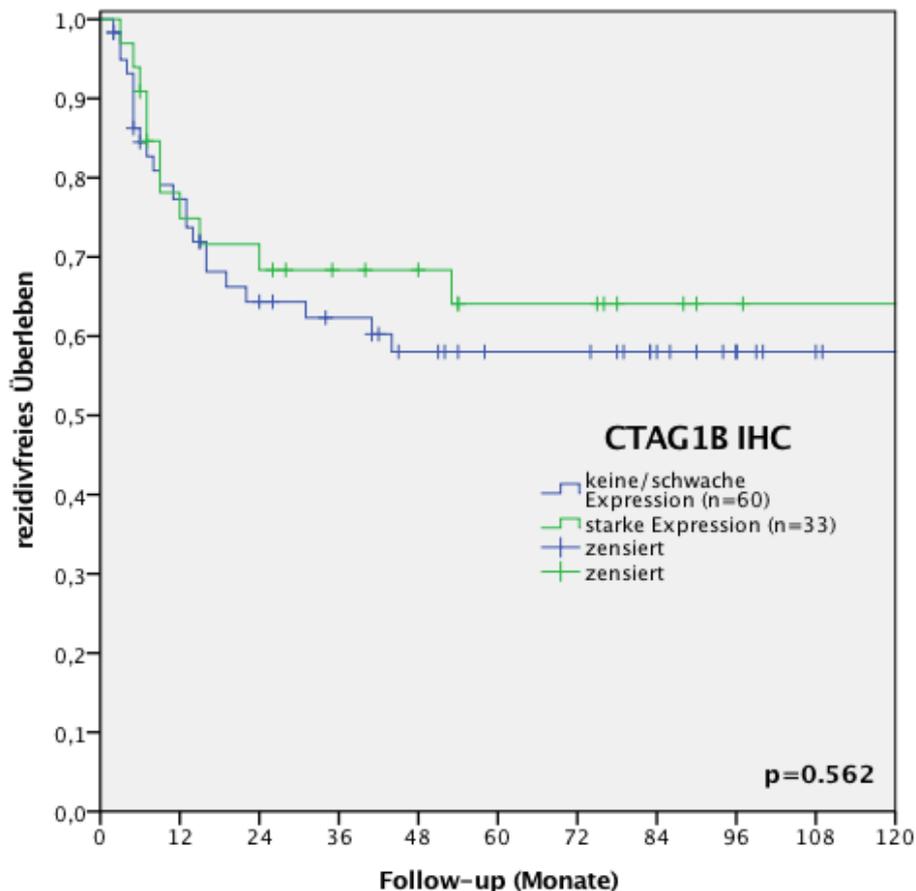


Abbildung 20: rezidivfreies Überleben nach Färbereaktion NY-ESO 1 (hier unter CTAG1B geführt)

### 3.3.3 Überlebenskurven in Abhängigkeit der immunhistochemischen Färbereaktion mit STEAP-1

In dieser Statistik wurden die Ergebnisse von 93 Patienten ausgewertet. 80 der Patienten zeigten eine schwache bis keine Färbereaktion, 13 zeigten eine starke Färbereaktion. Der p-Wert der Analyse der Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier beim progressionsfreien Überleben lag bei 0.461. Auch hier ergab sich kein statistisch signifikantes Ergebnis. Die zugehörigen Überlebenskurven werden in Abbildung 21 dargestellt.

Das progressionsfreie Überleben von Patienten bei keiner/schwacher Expression von STEAP-1 lag nach 60 Monaten bei 81 % und bei 74 % bei starker Expression.

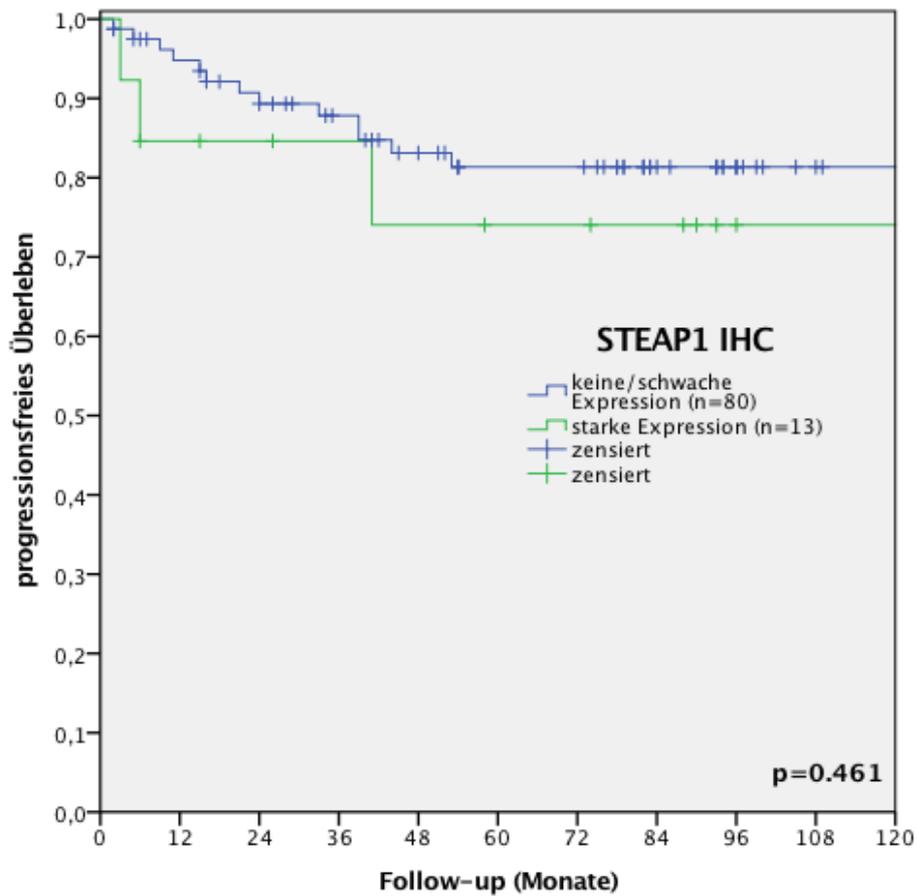


Abbildung 21: progressionsfreies Überleben nach Färbereaktion STEAP-1

Der p-Wert für das rezidivfreie Überleben war mit 0.325 nicht statistisch signifikant.

Das rezidivfreie Überleben von Patienten bei keiner/schwacher Expression von STEAP-1 lag nach 60 Monaten bei 58 % und bei 74 % bei starker Expression. Abbildung 22 zeigt die zugehörigen Überlebenskurven nach Kaplan-Meier.

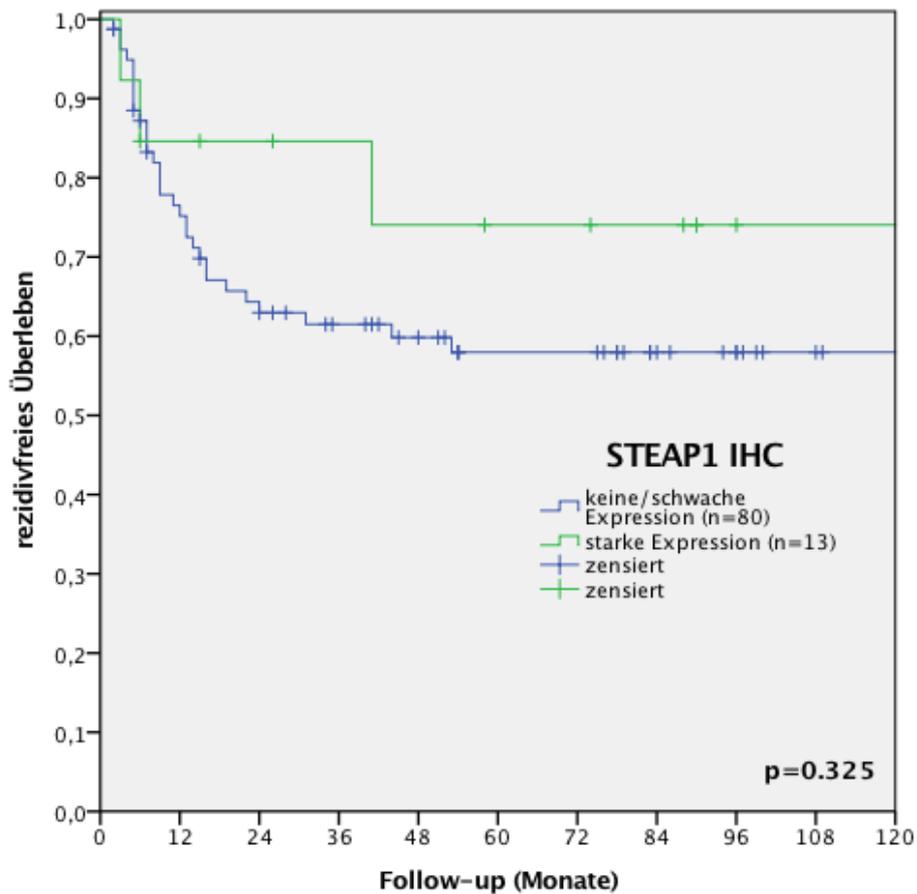


Abbildung 22: rezidivfreies Überleben nach Färbereaktion STEAP-1

## 4 Diskussion

Cancer/Testis-Antigene und STEAP-1 bieten ein interessantes Ziel in der Entwicklung neuer individualisierter Therapieansätze gegen Krebs. Sie sind deshalb so zukunftsweisend, da sie, außer in Keimzellgewebe oder Trophoblasten der Plazenta, nur in malignem Tumorgewebe vorkommen. Keimzellgewebe oder Trophoblasten als somatisches Gewebe ist immungeschützt, das bedeutet, dass es durch die Blut-Hoden-Schranke bzw. durch die Plazentaschranke abgeschirmt wird [99]. Außerdem werden in diesem Gewebe keine MHC-Klasse 1 Komplexe exprimiert [100].

Zur Aktivierung der körpereigenen humoralen und zellulären Abwehr könnte der immunogene Effekt der CTA und STEAP-1 auf T-Zellen genutzt werden. So würde gezielt das maligne Gewebe durch CD4 T-Lymphozyten und CD8 T-Lymphozyten des

Immunsystems angegriffen [85, 101, 102]. Das gesunde Gewebe würde nicht angegriffen werden. Außerdem könnten die Marker zu Früherkennung maligner Tumoren herangezogen werden. Es liefen bereits klinische Studien bis Phase 3 mit MAGE A3 und/oder NY-ESO 1 als Impfstoff bei unterschiedlichen Tumorarten wie nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, Neuroblastom, Ewing-Sarkom, Osteosarkom oder Rhabdomyosarkom; beim nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom wurde die Studie eingestellt [68, 83, 103-106].

Viele Studien zu CTA stützen sich auf Untersuchungen der CTA-Expression mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). In dieser Arbeit wurde die Expression der zwei Cancer/Testis-Antigene MAGE A3 und NY-ESO 1 und des Proteins STEAP-1 im Harnblasenkarzinom mit kommerziell verfügbaren Antikörpern immunhistochemisch untersucht. Dabei wurden diese in den Tumorstadien pTa, pT1 und pT2 und im Grading G1, G2 und G3 an insgesamt 93 Fällen untersucht. Ziel der Arbeit war die Analyse der Expressionsmuster und die anschließende Bewertung des Nutzens. Hierzu wurden univariate Kaplan-Meier Kurven erstellt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Prognose und Expression herauszufinden.

CTA und die Mitglieder der STEAP-Familie (STEAP 1-4) haben schon seit Längerem einen Stellenwert in der Krebsforschung als mögliche Angriffsziele für eine Therapie. MAGE A3, NY-ESO 1 und STEAP-1 wurden schon in zahlreichen Arbeiten zu diversen Karzinomerkkrankungen untersucht. Zum Thema Harnblasenkarzinom existieren bisher noch wenige Arbeiten. Dies ist zudem die erste Arbeit, die die drei genannten Marker am Harnblasenkarzinom immunhistochemisch gemeinsam untersucht.

Die immunhistochemische Färbung bietet eine zuverlässige und einfache, kostengünstig standardisierbare Nachweismethode für Proteine und somit für MAGE A3, NY-ESO 1 und STEAP-1; deshalb wurde diese Nachweismethode bewusst für die vorliegende Arbeit ausgewählt.

Die Expression von MAGE A3 im Harnblasenkarzinom konnte schon mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) dargestellt werden [74, 107-109]. Diese Arbeiten zeigten, dass die Familie der MAGE, darunter auch MAGE A3, im Harnblasenkarzinom exprimiert ist. Bei Geng, Yu et al. belief sich die Expression auf 55 % der 20 untersuchten Fälle [107]. Dyrskjot, Zieger et al. erhielten das Ergebnis, dass 43 % ihrer 350 untersuchten Tumoren MAGE A3 exprimierten [108]. 46,5 % des untersuchten Kollektivs (n = 144) bei Lerut, Van Poppel et al. exprimierten das CTA [109].

Immunhistochemisch wurde MAGE A3 in einer Arbeit zur Bestätigung der RT-PCR und Immunoblottingergebnisse (Westernblot) untersucht [110]. Hier waren von 102 untersuchten Urothelkarzinomen der Harnblase 58,8 % MAGE A3 positiv, im Immunoblotting ergaben 52,9 % ein positives Ergebnis und immunhistochemisch wurde bei nur einigen ausgewählten Fällen ein spezielles Färbemuster für MAGE A3 beschrieben. 2016 wurde in einer Arbeit nachgewiesen, dass bei immunhistochemischer Färbung von 156 Urothelkarzinomen der Harnblase 48,1 % der Proben MAGE A3 exprimierten und lediglich 10,3 % NY-ESO-1 [111]. MAGE A3 und NY-ESO 1 wurden schon als potentielle Ziele für eine Impfung bei Harnblasenkarzinom oder zur zielgerichtete Antikörpertherapie genannt [112]; Studien dazu liefern neue Erkenntnisse. Kerkar, Wang et al. favorisieren mit ihren Ergebnissen klar MAGE A3 als Target für eine Immuntherapie [111]. Auch die Kombination aus einer BCG-Instillation intravesikal mit einer MAGE A3 Vakzine wurde schon in einer Phase 1 Studie erprobt und verbesserte die Immunantwort [113]. Krebsstammzellen exprimieren ebenfalls MAGE A3 (RT-PCR) [114].

Bezüglich der Tumorstadien konnte sich keine Signifikanz zwischen T-Stadium und Expression zeigen lassen. Dies steht im Gegensatz zu einer Arbeit, in der ein proportionaler Zusammenhang zwischen pT-Stadium und Expression vorliegt [108]. Den unterschiedlichen Ergebnissen könnten mehrere Ursachen zugrunde liegen. So wurden in vorliegender Arbeit die pT-Stadien pTa, pT1 und pT2 getrennt beurteilt. Bei Dyrskjot, Zieger et al. wurden zwar auch pTa und pT1 getrennt analysiert, fortgeschrittene Stadien pT2-4 jedoch zusammengefasst [108]. In dieser Arbeit wurde immunhistochemische Färbung als Methode verwendet, in der anderen der Nachweis durch RT-PCR geführt. Ebenso war das Patientenkollektiv in vorliegender Arbeit kleiner (n = 93 versus n = 350). Zum Schluss lag in dieser Arbeit eine spezielle Unterteilung der Färbeintensitäten vor. Somit konnte die Färbereaktion präziser beschrieben werden und geht auch auf unterschiedlich stark angefärbte Bereiche ein. Erst nach dieser Unterteilung der Färbeintensitäten wurde die Einteilung in „keine oder schwache“ und „starke“ Expression vorgenommen, da als Ziel eine routinemäßige Beurteilung der Marker angestrebt wird. Diese Unterteilung macht die Auswertung deutlicher und wird so in den anderen beschriebenen immunhistochemischen Arbeiten nicht aufgeführt.

Auf das Grading bezogen zeigte sich bei MAGE A3 ein signifikanter Zusammenhang zwischen schlechterem Grading und Expression; je schlechter das Grading, desto häufiger die starke Expression.

Zu diesem Ergebnis kommt auch die bereits erwähnte Arbeit [108]. Diese Tatsache stellt einen wichtigen Punkt für eine mögliche Therapieoption bei Karzinomen mit höherer Entdifferenzierung dar. Dies könnte damit zusammenhängen, dass schlecht differenzierte Tumore eine generell höhere Mutationsrate aufweisen dürften und es dadurch auch zu Veränderungen in der Expression von Proteinen führen könnte.

Bei der Kaplan-Meier Analyse ist bei starker Anfärbung der p-Wert mit 0.032 beim progressionsfreien Überleben statistisch signifikant, was einen Überlebensvorteil für Patienten ohne bzw. mit schwacher MAGE A3-Expression bedeutet. Einen Trend zur Signifikanz bei Expression von MAGE A3 ( $p = 0.0599$ ) zu einem kürzeren progressionsfreien Überleben konnte auch in einer anderen Arbeit gezeigt werden [108].

Jedoch gibt es auch Ergebnisse, die keine fassbaren Zusammenhänge zwischen Expression und Tumorcharakteristika sehen [109]. Im Speziellen konnte bei Lerut, Van Poppel et al. mittels RT-PCR kein Zusammenhang zwischen höherem pT-Stadium und Expression gezeigt werden bei einer untersuchten Fallzahl von  $n = 144$ . Ein Zusammenhang zum Grading wurde aber nicht untersucht. Auch die pT-Stadien waren mit pT1-pT4 nicht mit vorliegender Arbeit zu vergleichen (pTa, pT1, pT2).

Auch die Kombination einer BCG-Instillation zusammen mit einer MAGE A3 Vakzine wurde in einer Arbeit als möglicher Benefit für Patienten mit nicht-muskelinvasivem Harnblasenkarzinom beschrieben [113].

Insgesamt zeigte sich in vorliegender Arbeit eine Gesamtexpression von MAGE A3 in den untersuchten Tumorpräparaten von 68,8 % und bietet somit eine vielversprechende Grundlage für weitere Untersuchungen.

NY-ESO 1 im Zusammenhang mit dem Harnblasenkarzinom wurde 1997 erstmals mittels RT-PCR untersucht [46]. Eine immunhistochemische Untersuchung an lediglich neun Harnblasenkarzinompräparaten lieferte zwei NY-ESO 1 positive Tumoren [115]. Eine Arbeit zeigte, dass nicht alle Tumoren, die NY-ESO 1 mRNA exprimierten, auch bei immunhistochemischer Untersuchung NY-ESO 1 positiv waren; in diesem Fall nur zwei von vierzehn G3-Tumoren und null von sechs G1/G2-Tumoren [116]. Dies zeigt, dass die Detektionsmethode eine große Rolle spielt und unterschiedliche Expressionsmuster bestehen. Durch andere Arbeiten wird die These dieser Arbeit gestützt, dass eine schlechtere Differenzierung des Tumors mit der Höhe der Expression korreliert [108, 116, 117]. In einer

Arbeit wurde der Zusammenhang von immunhistochemischer Expression von NY-ESO 1 und Tumorprogression untersucht; es wurde kein Zusammenhang gesehen [118]. Eine Arbeit untersuchte ebenfalls verschiedene CTA immunhistochemisch und mittels RT-PCR im Harnblasenkarzinom, unter anderem auch NY-ESO 1, mit dem Ergebnis, dass CTA als prädiktive Marker dienen können [112].

Jedoch exprimierten in einer immunhistochemischen Untersuchung nur 10,3 % von 156 Urothelkarzinomen der Harnblase NY-ESO 1 [111]. Auch wenn dort angegeben wurde, dass auch schwache oder nur fokal angefärbte Präparate mit eingeschlossen wurden, steht dies im großen Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, in der mit 90,3 % die meisten Tumore NY-ESO 1 exprimierten. Bei Kerkar, Wang et al. ist nicht angegeben, welche Harnblasentumorpräparate (pT-Stadium, Grading) genau untersucht wurden. Dies könnte eine Erklärung für diesen Unterschied im Ergebnis sein.

Es liegen schon Untersuchungen zur Wirksamkeit von NY-ESO 1-Impfkombinationen vor, zum Beispiel zusammen mit BCG und GM-CSF, die eine Immunantwort bei Patienten mit Harnblasenkarzinom lieferten [119]. NY-ESO 1 spezifische Antikörperantworten wurden bei fünf von sechs Patienten mit NY-ESO 1 positivem Harnblasenkarzinom hervorgerufen; CD 8+ Antworten traten bei einem von sechs Patienten und CD4+ Antworten bei sechs von sechs Patienten auf.

Die vorliegende Arbeit kann die mögliche Bedeutung von NY-ESO 1 als wichtiges CTA mit einer Expression im Harnblasenkarzinom, die von allen genannten Arbeiten bisher mit 90,3 % am höchsten ist, unterstreichen. Bei der Korrelation Reaktion/Grading stellte sich sogar ein hochsignifikantes Ergebnis heraus.

In der Kaplan-Meier-Auswertung zeigte eine starke NY-ESO-1 Anfärbung jedoch kein statistisch signifikantes Ergebnis für ein schlechteres progressionsfreies Überleben.

In mehreren Arbeiten wurde beschrieben, dass das Harnblasenkarzinom STEAP exprimiert [77, 120, 121]. Ebenso wurde STEAP-1 als interessante Zielstruktur zur Antikörpertherapie untersucht [122]. 2005 und 2006 konnte STEAP erstmals als Zielstruktur für zytotoxische T-Zellen und für humane CD8 T-Lymphozyten aufgezeigt werden [120, 121]. Somit konnte STEAP-1 als potentielle Zielstruktur für T-Zell-basierte Immuntherapie oder Antikörpertherapie, nicht nur beim Harnblasenkarzinom, untersucht werden [123, 124] . Es konnte mit Hilfe von dye transfer assay gezeigt werden, dass STEAP-1 in interzelluläre Kommunikation zwischen Tumorzellen und Stromazellen in unmittelbarer Umgebung involviert ist und damit eine Rolle für das Tumorstadium spielen könnte [125].

Insgesamt haben sich im Vergleich zu den beiden anderen Markern noch relativ wenige Arbeiten mit STEAP-1 im Zusammenhang mit dem Harnblasenkarzinom beschäftigt.

Keine andere Arbeit hat bis jetzt die Expression von STEAP-1 am Harnblasenkarzinom immunhistochemisch mit Angaben von Zahlen untersucht. Somit ist die vorliegende Arbeit die einzige, die dazu ein Ergebnis bietet. Hier lag die Gesamtexpression von STEAP-1 bei 79,6 % des untersuchten Gewebes.

In der Kaplan-Meier-Auswertung zeigte eine starke STEAP-1 Färbereaktion kein statistisch signifikantes Ergebnis für ein schlechteres progressionsfreies Überleben, jedoch war ein schwaches Färbeergebnis mit einem längere progressionsfreien Überleben, wenn auch nicht signifikant, verbunden.

In vielen Arbeiten konnte herausgestellt werden, dass MAGE A3, NY-ESO 1 und STEAP-1 wertvolle prognostische Anhaltspunkte liefern.

Das Expressionsverhalten mit differenzierter Verteilung ist in den genannten Arbeiten nicht beschrieben bzw. detailliert bewertet worden. So bleibt unklar, ob in den anderen Arbeiten zu diesem Thema z. B. fokal positive Reaktionen im Tumorgewebe möglicherweise als negativ gewertet wurden. Allerdings scheint auch eine gering positive Reaktion bei heterogener Verteilung im Tumorgewebe bewertet werden zu müssen. Bei der momentan viel diskutierten Immun-basierten Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren beim Urothelkarzinom (PD-L1-Inhibitoren, PD1-Inhibitoren und CTLA-4-Inhibitoren) wertet man auch abgestuft die Expression nach prozentualer Verteilung im Tumorgewebe [40, 126]. Bei Bronchialkarzinomen reicht für einen Therapieansatz in der second-line-Therapie eine positive Rate von 1 % der Tumorzellen, um den Tumor als positiv zu bewerten [127]. Auch bei der Expression von HER2/neu (Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren) im Magenkarzinom ist ein kleiner Anteil positiver Zellen ausreichendes Argument für eine Antikörpertherapie [128]. Insofern erscheint auch hier eine Analyse unter Berücksichtigung der Verteilung und Expressionsstärke im Tumorgewebe gerechtfertigt.

Bezüglich des Gradings lässt diese Arbeit darauf schließen, dass die Expression von MAGE A3, STEAP-1 und NY-ESO 1 mit nachlassender Tumordifferenzierung zunimmt. Zu diesem Ergebnis kamen auch die meisten oben genannten Arbeiten.

Als wesentliches Ergebnis kann festgehalten werden, dass die untersuchten Marker in zu jeweils mehr als der Hälfte der Tumorgewebe vorhanden sind. Zusammengefasst exprimierten

79,6 % der Tumoren wenigstens einen untersuchten Marker. Dabei liegt die Expression von MAGE A3 bei 68,8 %, von STEAP-1 bei 79,6 % und die Expression von NY-ESO 1 sogar bei 90,3 %.

Wenn man also die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Ergebnissen anderer publizierter Arbeiten vergleicht, so könnten die immunhistochemisch nachgewiesenen Marker ein Target in der Beurteilung von Prognose und möglicherweise Therapie des Harnblasenkarzinoms darstellen.

Abweichende Ergebnisse zu anderen Arbeiten können zum einen an der Detektionsmethode liegen; die meisten Arbeiten verwendeten RT-PCR zur Expressionsbestimmung. Zu STEAP-1 fand sich lediglich eine weitere Arbeit, die immunhistochemisch die Expression im Harnblasenkarzinom untersucht hat [77]. Die Festlegung der Bestimmung der Färbeintensität trägt auch zu unterschiedlichen Ergebnissen aller immunhistochemischen Arbeiten bei.

In dieser Arbeit wurden 93 verschiedene Gewebepräparate des Harnblasenkarzinoms untersucht. Die pT-Stadien des untersuchten Tumorgewebes, welche sich in 42 pTa-, 29 pT1- und 22 pT2-Stadien unterteilte, lieferte einen guten Überblick über diese Stadien. Ebenso das Grading, welches sich in 17 G1-, 29 G2- und 47 G3-Tumoren unterteilte. Studien mit größeren Kollektiven müssen folgen, wenn es um die Einführung von Behandlungsansätzen geht. Diese Arbeit bietet einen Gesamtüberblick der Expression auf genannte pT-Stadien und Differenzierungsgrade.

## **5 Zusammenfassung**

Das Harnblasenkarzinom ist eine der häufigsten malignen Tumorarten weltweit, so dass ständig Fortschritte bei der Behandlung gesucht werden. Obwohl sich in den letzten Jahren die Therapie betroffener Patienten immer wieder verfeinert hat, ist die Prognose der Erkrankung im fortgeschrittenen Stadium schlecht. Das Ziel ist es, durch neue Detektionsmethoden und Therapieansätze die Prognose zu verbessern. CTA und andere spezielle biologische Marker bieten deshalb schon seit Längerem einen hochinteressanten Ansatzpunkt, da sie fast selektiv in Tumorgewebe exprimiert werden. Diese weiterhin als Zielantigene für Immuntherapien zu untersuchen kann zukünftig eine wichtige Säule der Krebstherapie darstellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Expressionsmuster der CTA MAGE A3 und NY-ESO 1 sowie von STEAP-1 im Harnblasenkarzinom und ihre Korrelation mit pT-Stadium und Grading immunhistochemisch zu untersuchen. Dafür standen Karzinompräparate von insgesamt 93 Patienten der urologischen Klinik der Universität Regensburg aus dem Zeitraum 1994 bis 2009 für eine retrospektive Analyse zur Verfügung. Die Präparate stammten von 76 männlichen und 17 weiblichen Patienten, der Median lag bei 68 Jahren. In 79,6 % der untersuchten Schnitte konnte wenigstens ein genanntes Antigen nachgewiesen werden. Dabei war als Kernergebnis NY-ESO 1 mit 90,3 % Expression in den untersuchten Präparaten am häufigsten vorhanden, im Gegensatz zu anderen Arbeiten.

Bezüglich des Zusammenhangs zwischen Expression und T-Stadium konnte kein statistisch signifikantes Ergebnis erhoben werden. Es wurde allerdings gezeigt, dass starke Expression von NY-ESO 1 mit schlecht differenzierten Tumoren assoziiert war.

Dies darf als eines der Kernergebnisse dieser Arbeit zählen.

Bei MAGE A3 zeigte sich auf das Grading bezogen ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen schlechterem Grading und Expression.

Hinsichtlich der Prognose konnte bei MAGE A3 ein statistisch signifikantes Ergebnis bezüglich starker Färbereaktion und kürzerem progressionsfreien Überleben gezeigt werden.

Auch dies stellen Kernergebnisse dieser Arbeit dar.

Insgesamt stellten sich die untersuchten Marker, besonders MAGE A3, als verstärkt zu untersuchende Prognosefaktoren beim Harnblasenkarzinom dar. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet scheinen sinnvoll.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe, ed. 2015, Berlin. p. 106-109.
2. Ferlay, J., et al., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 2015. 136(5): p. E359-86.
3. Otto, T. and H. Rubben, [Prevention of bladder cancer]. *Urologe A*, 2004. 43(5): p. 562-4.
4. Vineis, P. and R. Pirastu, Aromatic amines and cancer. *Cancer Causes Control*, 1997. 8(3): p. 346-55.
5. Cole, P., et al., Smoking and cancer of the lower urinary tract. *N Engl J Med*, 1971. 284(3): p. 129-34.
6. Zeegers, M.P., et al., The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer*, 2000. 89(3): p. 630-9.
7. Negri, E. and C. La Vecchia, Epidemiology and prevention of bladder cancer. *Eur J Cancer Prev*, 2001. 10(1): p. 7-14.
8. Boffetta, P., Tobacco smoking and risk of bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 2008(218): p. 45-54.
9. Tyczynski, J. and D. Parkin. BLADDER CANCER IN EUROPE. 2003; Available from: <http://www.encl.eu/images/docs/factsheets/bladder-factsheets.pdf>.
10. Ferlay, J., et al., Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 2010. 127(12): p. 2893-917.
11. Larsson, S.C., et al., Diabetes mellitus and risk of bladder cancer: a meta-analysis. *Diabetologia*, 2006. 49(12): p. 2819-23.
12. Koutros, S., et al., Hair dye use and risk of bladder cancer in the New England bladder cancer study. *Int J Cancer*, 2011. 129(12): p. 2894-904.
13. Ros, M.M., et al., Personal hair dye use and the risk of bladder cancer: a case-control study from The Netherlands. *Cancer Causes Control*, 2012. 23(7): p. 1139-48.
14. Burger, M., et al., Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*, 2013. 63(2): p. 234-41.
15. Turati, F., et al., Coffee, Tea, Cola and Bladder Cancer Risk: Dose- and Time-Relationships. *Urology*, 2015.

16. Villanueva, C.M., et al., Coffee consumption, genetic susceptibility and bladder cancer risk. *Cancer Causes Control*, 2009. 20(1): p. 121-7.
17. Humphrey, P.A., et al., The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*, 2016. 70(1): p. 106-19.
18. Babjuk, M., et al., EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol*, 2016.
19. Alfred Witjes, J., et al., Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *Eur Urol*, 2016.
20. UICC International Union Against Cancer, C. von Wittekind, and H.J. Meyer, TNM Klassifikation maligner Tumoren. 7. Auflage ed. 2010, Berlin: Springer.
21. Seitz, M., et al., [Urinary bladder tumours. The new 2004 WHO classification]. *Urologe A*, 2005. 44(9): p. 1073-86.
22. Shephard, E.A., et al., Clinical features of bladder cancer in primary care. *Br J Gen Pract*, 2012. 62(602): p. e598-604.
23. Metts, M.C., et al., Bladder cancer: a review of diagnosis and management. *J Natl Med Assoc*, 2000. 92(6): p. 285-94.
24. Yafi, F.A., et al., Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol*, 2015. 33(2): p. 66 e25-31.
25. Tetu, B., Diagnosis of urothelial carcinoma from urine. *Mod Pathol*, 2009. 22 Suppl 2: p. S53-9.
26. Raitanen, M.P., et al., Differences between local and review urinary cytology in diagnosis of bladder cancer. An interobserver multicenter analysis. *Eur Urol*, 2002. 41(3): p. 284-9.
27. Lokeshwar, V.B., et al., Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology*, 2005. 66(6 Suppl 1): p. 35-63.
28. Solomon, J.P. and D.E. Hansel, Prognostic factors in urothelial carcinoma of the bladder: histologic and molecular correlates. *Adv Anat Pathol*, 2015. 22(2): p. 102-12.
29. Babjuk, M., et al., EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol*, 2017. 71(3): p. 447-461.
30. Kausch, I., et al., Photodynamic diagnosis in non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and cumulative analysis of prospective studies. *Eur Urol*, 2010. 57(4): p. 595-606.

31. Mowatt, G., et al., Photodynamic diagnosis of bladder cancer compared with white light cystoscopy: Systematic review and meta-analysis. *Int J Technol Assess Health Care*, 2011. 27(1): p. 3-10.
32. Cauberg, E.C., et al., Narrow band imaging cystoscopy improves the detection of non-muscle-invasive bladder cancer. *Urology*, 2010. 76(3): p. 658-63.
33. Li, K., et al., Diagnosis of narrow-band imaging in non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Urol*, 2013. 20(6): p. 602-9.
34. Sylvester, R.J., M.A. van der, and D.L. Lamm, Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol*, 2002. 168(5): p. 1964-70.
35. Li, R., et al., Efficacy of Mycobacterium Phlei Cell Wall-Nucleic Acid Complex (MCNA) in BCG-Unresponsive Patients. *Bladder Cancer*, 2017. 3(1): p. 65-71.
36. Chou, R., et al., Intravesical Therapy for the Treatment of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Urol*, 2017. 197(5): p. 1189-1199.
37. Sylvester, R.J., et al., Bacillus calmette-guerin versus chemotherapy for the intravesical treatment of patients with carcinoma in situ of the bladder: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol*, 2005. 174(1): p. 86-91; discussion 91-2.
38. Rosenblatt, R., et al., Pathologic downstaging is a surrogate marker for efficacy and increased survival following neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy for muscle-invasive urothelial bladder cancer. *Eur Urol*, 2012. 61(6): p. 1229-38.
39. Leow, J.J., et al., Adjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer: a 2013 updated systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Eur Urol*, 2014. 66(1): p. 42-54.
40. Farina, M.S., K.T. Lundgren, and J. Bellmunt, Immunotherapy in Urothelial Cancer: Recent Results and Future Perspectives. *Drugs*, 2017. 77(10): p. 1077-1089.
41. Zibelman, M., C. Ramamurthy, and E.R. Plimack, Emerging role of immunotherapy in urothelial carcinoma-Advanced disease. *Urol Oncol*, 2016. 34(12): p. 538-547.
42. Sylvester, R.J., et al., Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol*, 2006. 49(3): p. 466-5; discussion 475-7.
43. Fernandez-Gomez, J., et al., Predicting nonmuscle invasive bladder cancer recurrence and progression in patients treated with bacillus Calmette-Guerin: the CUETO scoring model. *J Urol*, 2009. 182(5): p. 2195-203.
44. Ather, M.H. and S.M. Nazim, New and contemporary markers of prognosis in nonmuscle invasive urothelial cancer. *Korean J Urol*, 2015. 56(8): p. 553-64.

45. Retz, M., J.E. Gschwend, and P. Maisch, [Short version of the German S3 guideline for bladder cancer]. *Urologe A*, 2016. 55(9): p. 1173-87.
46. Chen, Y.T., et al., A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(5): p. 1914-8.
47. Kalejs, M. and J. Erenpreisa, Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and "brain-storming" session. *Cancer Cell Int*, 2005. 5(1): p. 4.
48. Ghafouri-Fard, S. and M.H. Modarressi, Cancer-testis antigens: potential targets for cancer immunotherapy. *Arch Iran Med*, 2009. 12(4): p. 395-404.
49. Simpson, A.J., et al., Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(8): p. 615-25.
50. Fratta, E., et al., The biology of cancer testis antigens: putative function, regulation and therapeutic potential. *Mol Oncol*, 2011. 5(2): p. 164-82.
51. Almeida, L.G., et al., CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens. *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(Database issue): p. D816-9.
52. Hofmann, O., et al., Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(51): p. 20422-7.
53. Ross, M.T., et al., The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*, 2005. 434(7031): p. 325-37.
54. Jungbluth, A.A., et al., Monoclonal antibody MA454 reveals a heterogeneous expression pattern of MAGE-1 antigen in formalin-fixed paraffin embedded lung tumours. *Br J Cancer*, 2000. 83(4): p. 493-7.
55. Tureci, O., et al., Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(9): p. 5211-6.
56. van der Bruggen, P., et al., A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 1991. 254(5038): p. 1643-7.
57. Sahin, U., et al., Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(25): p. 11810-3.
58. Tureci, O., U. Sahin, and M. Pfreundschuh, Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Mol Med Today*, 1997. 3(8): p. 342-9.
59. Scanlan, M.J., et al., Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*, 2002. 188: p. 22-32.
60. van Rhee, F., et al., NY-ESO-1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood*, 2005. 105(10): p. 3939-44.

61. Goodyear, O., et al., CD8+ T cells specific for cancer germline gene antigens are found in many patients with multiple myeloma, and their frequency correlates with disease burden. *Blood*, 2005. 106(13): p. 4217-24.
62. Fiszer, D. and M. Kurpisz, Major histocompatibility complex expression on human, male germ cells: a review. *Am J Reprod Immunol*, 1998. 40(3): p. 172-6.
63. Westbrook, V.A., et al., Genomic organization, incidence, and localization of the SPAN-x family of cancer-testis antigens in melanoma tumors and cell lines. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(1 Pt 1): p. 101-12.
64. Nakamura, Y., et al., Spontaneous remission of a non-small cell lung cancer possibly caused by anti-NY-ESO-1 immunity. *Lung Cancer*, 2009. 65(1): p. 119-22.
65. Vansteenkiste, J., et al., Adjuvant MAGE-A3 immunotherapy in resected non-small-cell lung cancer: phase II randomized study results. *J Clin Oncol*, 2013. 31(19): p. 2396-403.
66. Kruit, W.H., et al., Selection of immunostimulant AS15 for active immunization with MAGE-A3 protein: results of a randomized phase II study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group in Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol*, 2013. 31(19): p. 2413-20.
67. Caballero, O.L. and Y.T. Chen, Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci*, 2009. 100(11): p. 2014-21.
68. Cuppens, K. and J. Vansteenkiste, Vaccination therapy for non-small-cell lung cancer. *Curr Opin Oncol*, 2014. 26(2): p. 165-70.
69. Cho, H.J., et al., Physical interaction of two cancer-testis antigens, MAGE-C1 (CT7) and NY-ESO-1 (CT6). *Cancer Immun*, 2006. 6: p. 12.
70. Wischnewski, F., K. Pantel, and H. Schwarzenbach, Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells. *Mol Cancer Res*, 2006. 4(5): p. 339-49.
71. Almstedt, M., et al., The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine induces expression of NY-ESO-1 and other cancer/testis antigens in myeloid leukemia cells. *Leuk Res*, 2010. 34(7): p. 899-905.
72. Kanojia, D., et al., Sperm-associated antigen 9, a novel biomarker for early detection of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009. 18(2): p. 630-9.
73. Suri, A., Cancer testis antigens--their importance in immunotherapy and in the early detection of cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 2006. 6(4): p. 379-89.
74. Patard, J.J., et al., Expression of MAGE genes in transitional-cell carcinomas of the urinary bladder. *Int J Cancer*, 1995. 64(1): p. 60-4.

75. Brasseur, F., et al., Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int J Cancer*, 1995. 63(3): p. 375-80.
76. Goydos, J.S., M. Patel, and W. Shih, NY-ESO-1 and CTP11 expression may correlate with stage of progression in melanoma. *J Surg Res*, 2001. 98(2): p. 76-80.
77. Hubert, R.S., et al., STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(25): p. 14523-8.
78. Gaugler, B., et al., Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med*, 1994. 179(3): p. 921-30.
79. Tsuji, T., et al., Characterization of preexisting MAGE-A3-specific CD4+ T cells in cancer patients and healthy individuals and their activation by protein vaccination. *J Immunol*, 2009. 183(7): p. 4800-8.
80. Cesson, V., et al., MAGE-A3 and MAGE-A4 specific CD4(+) T cells in head and neck cancer patients: detection of naturally acquired responses and identification of new epitopes. *Cancer Immunol Immunother*, 2011. 60(1): p. 23-35.
81. Scanlan, M.J., et al., Cancer-related serological recognition of human colon cancer: identification of potential diagnostic and immunotherapeutic targets. *Cancer Res*, 2002. 62(14): p. 4041-7.
82. Atanackovic, D., et al., Cancer-testis antigens MAGE-C1/CT7 and MAGE-A3 promote the survival of multiple myeloma cells. *Haematologica*, 2010. 95(5): p. 785-93.
83. Atanackovic, D., et al., Booster vaccination of cancer patients with MAGE-A3 protein reveals long-term immunological memory or tolerance depending on priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(5): p. 1650-5.
84. Tureci, O., et al., Humoral immune responses of lung cancer patients against tumor antigen NY-ESO-1. *Cancer Lett*, 2006. 236(1): p. 64-71.
85. Stockert, E., et al., A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J Exp Med*, 1998. 187(8): p. 1349-54.
86. Odunsi, K., et al., NY-ESO-1 and LAGE-1 cancer-testis antigens are potential targets for immunotherapy in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, 2003. 63(18): p. 6076-83.
87. Gupta, A., et al., A novel human-derived antibody against NY-ESO-1 improves the efficacy of chemotherapy. *Cancer Immun*, 2013. 13: p. 3.
88. Burgess, M., et al., Immunotherapy in Sarcoma: Future Horizons. *Curr Oncol Rep*, 2015. 17(11): p. 52.
89. Burgess, M. and H. Tawbi, Immunotherapeutic approaches to sarcoma. *Curr Treat Options Oncol*, 2015. 16(6): p. 26.

90. Chen, J.L., et al., NY-ESO-1 specific antibody and cellular responses in melanoma patients primed with NY-ESO-1 protein in ISCOMATRIX and boosted with recombinant NY-ESO-1 fowlpox virus. *Int J Cancer*, 2015. 136(6): p. E590-601.
91. Jager, E., et al., Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(22): p. 12198-203.
92. Old, L.J., Cancer vaccines: an overview. *Cancer Immun*, 2008. 8 Suppl 1: p. 1.
93. Porkka, K.P., M.A. Helenius, and T. Visakorpi, Cloning and characterization of a novel six-transmembrane protein STEAP2, expressed in normal and malignant prostate. *Lab Invest*, 2002. 82(11): p. 1573-82.
94. Chen, X., et al., STEAP4, a gene associated with insulin sensitivity, is regulated by several adipokines in human adipocytes. *Int J Mol Med*, 2010. 25(3): p. 361-7.
95. Gomes, I.M., et al., STEAP1 is overexpressed in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia lesions, and it is positively associated with Gleason score. *Urol Oncol*, 2014. 32(1): p. 53 e23-9.
96. Kim, S., et al., Vaccination with recombinant adenoviruses and dendritic cells expressing prostate-specific antigens is effective in eliciting CTL and suppresses tumor growth in the experimental prostate cancer. *Prostate*, 2009. 69(9): p. 938-48.
97. Gomes, I.M., C.J. Maia, and C.R. Santos, STEAP proteins: from structure to applications in cancer therapy. *Mol Cancer Res*, 2012. 10(5): p. 573-87.
98. IHC World. Introduction to Immunohistochemistry. 2003-2011; Available from: [http://www.ihcworld.com/\\_intro/ihc-methods.htm](http://www.ihcworld.com/_intro/ihc-methods.htm).
99. Barker, C.F. and R.E. Billingham, Immunologically privileged sites. *Adv Immunol*, 1977. 25: p. 1-54.
100. Tomita, Y., et al., Immunohistochemical detection of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and major histocompatibility complex class I antigens in seminoma. *J Urol*, 1993. 149(3): p. 659-63.
101. Gnjatic, S., et al., Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(15): p. 8862-7.
102. Jager, E., et al., Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(9): p. 4760-5.
103. Esfandiary, A. and S. Ghafouri-Fard, MAGE-A3: an immunogenic target used in clinical practice. *Immunotherapy*, 2015. 7(6): p. 683-704.
104. Esfandiary, A. and S. Ghafouri-Fard, New York esophageal squamous cell carcinoma-1 and cancer immunotherapy. *Immunotherapy*, 2015. 7(4): p. 411-39.

105. Krishnadas, D.K., et al., A phase I trial combining decitabine/dendritic cell vaccine targeting MAGE-A1, MAGE-A3 and NY-ESO-1 for children with relapsed or therapy-refractory neuroblastoma and sarcoma. *Cancer Immunol Immunother*, 2015. 64(10): p. 1251-60.
106. Vansteenkiste, J.F., et al., Efficacy of the MAGE-A3 cancer immunotherapeutic as adjuvant therapy in patients with resected MAGE-A3-positive non-small-cell lung cancer (MAGRIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2016. 17(6): p. 822-35.
107. Geng, L., et al., [Expression of melanoma antigen gene in urinary transitional cell carcinomas]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 2005. 43(10): p. 667-71.
108. Dyrskjot, L., et al., Expression of MAGE-A3, NY-ESO-1, LAGE-1 and PRAME in urothelial carcinoma. *Br J Cancer*, 2012. 107(1): p. 116-22.
109. Lerut, E., et al., Rates of MAGE-A3 and PRAME expressing tumors in FFPE tissue specimens from bladder cancer patients: potential targets for antigen-specific cancer immunotherapeutics. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. 8(8): p. 9522-32.
110. Yin, B., et al., Expression profile of cancer-testis genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Oncol*, 2012. 30(6): p. 886-92.
111. Kerkar, S.P., et al., MAGE-A is More Highly Expressed Than NY-ESO-1 in a Systematic Immunohistochemical Analysis of 3668 Cases. *J Immunother*, 2016. 39(4): p. 181-7.
112. Sharma, P., et al., Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(18): p. 5442-7.
113. Derre, L., et al., Intravesical Bacillus Calmette Guerin combined with a cancer-vaccine increases local T-cell responses in non-muscle-invasive bladder cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2016.
114. Yin, B., et al., MAGE-A3 is highly expressed in a cancer stem cell-like side population of bladder cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. 7(6): p. 2934-41.
115. Jungbluth, A.A., et al., Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues. *Int J Cancer*, 2001. 92(6): p. 856-60.
116. Kurashige, T., et al., Ny-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade. *Cancer Res*, 2001. 61(12): p. 4671-4.
117. Sharma, P., et al., Frequency of NY-ESO-1 and LAGE-1 expression in bladder cancer and evidence of a new NY-ESO-1 T-cell epitope in a patient with bladder cancer. *Cancer Immun*, 2003. 3: p. 19.

118. Kim, K., et al., Histological and immunohistochemical markers for progression prediction in transurethrally resected high-grade non-muscle invasive bladder cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. 8(1): p. 743-50.
119. Sharma, P., et al., Immune responses detected in urothelial carcinoma patients after vaccination with NY-ESO-1 protein plus BCG and GM-CSF. *J Immunother*, 2008. 31(9): p. 849-57.
120. Rodeberg, D.A., et al., Recognition of six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-expressing tumor cells by peptide antigen-induced cytotoxic T lymphocytes. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(12): p. 4545-52.
121. Alves, P.M., et al., STEAP, a prostate tumor antigen, is a target of human CD8+ T cells. *Cancer Immunol Immunother*, 2006. 55(12): p. 1515-23.
122. Challita-Eid, P.M., et al., Monoclonal antibodies to six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-1 inhibit intercellular communication in vitro and growth of human tumor xenografts in vivo. *Cancer Res*, 2007. 67(12): p. 5798-805.
123. Azumi, M., et al., Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate as an immunotherapeutic target for renal cell and bladder cancer. *J Urol*, 2010. 183(5): p. 2036-44.
124. Moreaux, J., et al., STEAP1 is overexpressed in cancers: a promising therapeutic target. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. 429(3-4): p. 148-55.
125. Yamamoto, T., et al., Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-1 plays a role for in vivo tumor growth via intercellular communication. *Exp Cell Res*, 2013. 319(17): p. 2617-26.
126. Bellmunt, J., T. Powles, and N.J. Vogelzang, A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: The future is now. *Cancer Treat Rev*, 2017. 54: p. 58-67.
127. Scheel, A.H., et al., Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas. *Mod Pathol*, 2016. 29(10): p. 1165-72.
128. Ruschoff, J., et al., HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Mod Pathol*, 2012. 25(5): p. 637-50.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt

Prof. Dr. med. Maximilian Burger für die freundliche Überlassung des Themas.

Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald, an dessen Institut der praktische Teil meiner Arbeit erfolgte. Im dortigen immunhistochemischen Labor fanden die Färbungen einschließlich aller Vor- und Nachbereitungen statt. Ebenfalls wurde ein Arbeitsplatz zur Auswertung der Färbemuster zur Verfügung gestellt. Mein Dank gilt ebenfalls den Mitarbeitern des immunhistochemischen Labors, besonders Frau Schaumann und Frau Stempfle, die mit Rat und Tat zur Hilfe standen.

Priv.-Doz. Dr. med. Wolfgang Otto, der mir bei der statistischen Auswertung und beim Korrekturlesen der Arbeit außerordentlich hilfreich war.

meinem Betreuer Priv.-Doz. Dr. med. Hans-Ullrich Völker, der von den ersten Färbungsversuchen bis zur Fertigstellung der Arbeit immer erster Ansprechpartner war. Durch sein Fachwissen und seine positive Einstellung konnte er mich durch manche Tiefen bei der Erstellung der Doktorarbeit geleiten und wieder motivieren.

Prof. Dr. med. Hubert Kübler für die Übernahme des Korreferates.

meinen Freunden für die seelische, motivierende und hilfreiche Unterstützung; hier besonders meinem besten Freund Florian Pfaff.

meiner Familie und ganz besonders meinem Ehemann Dominik; alle zeigten sich immer motivierend, geduldig und verständnisvoll.

**Curriculum Vitae**  
**Klara Braun**  
**geboren am 08.11.1985 in Pirmasens**  
**verheiratet**

**Schulausbildung**

---

1992-1996	Grundschule	Vinningen
1996-2005	Immanuel-Kant-Gymnasium	Pirmasens

**Hochschulausbildung**

---

2009-2011	Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz ( Teilstudienplatz )	Mainz
September 2011	Physikum	
2012-2016	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians- Universität Würzburg	Würzburg
April 2015	2. Staatsexamen	
Mai 2016	3. Staatsexamen	

**Praktische Ausbildung**

---

Famulaturen

August 2012	Urologie, Praxis Dr. med. Horst Brenneis	Pirmasens
September 2012	Allgemeinmedizin, Gemeinschaftspraxis Dr. Scheuer, Dr. Noll, Herr Zinßius	Pirmasens
März 2013	Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Würzburg	Würzburg
August 2014	Anästhesie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Städtisches Krankenhaus Pirmasens gGmbH	Pirmasens

Blockpraktikum

August-Dezember 2014	Chirurgie, Innere Medizin, Pädiatrie und Gynäkologie, Universitätsklinikum Würzburg	Würzburg
	Allgemeinmedizin, Praxis Dr. med. Kromczynski	Zellingen

Praktisches Jahr

Mai 2015-Mai 2016	Innere Medizin, Caritas-Krankenhaus Bad Mergentheim Chirurgie und Urologie, Leopoldina Krankenhaus Schweinfurt	Bad Mergentheim Schweinfurt
-------------------	---	--------------------------------

## Berufsausbildung und Anstellungen

---

2005-2006	FSJ beim Arbeiter-Samariter-Bund, dabei Ausbildung zur Rettungssanitäterin	Pirmasens
2006-2008	Ausbildung zur Rettungsassistentin an der Franz-Anton-Mai-Schule	Mannheim
10/2008-09/2009	Zeitvertrag DRK Rettungsdienst Südpfalz GmbH	Pirmasens
08/2010	Zeitvertrag DRK Rettungsdienst Südpfalz GmbH	Pirmasens
11/2011-03/2012	Zeitvertrag DRK Rettungsdienst Südpfalz GmbH	Pirmasens
01/2013-10/2015	Zeitvertrag Malteser Rettungsdienst gGmbH	Würzburg
2006-2012	Minijob als FahrerIn der Ärztlichen Bereitschaftsdienstzentrale	Pirmasens
09/2016-09/2018	Assistenzärztin in der Klinik für Urologie und Kinderurologie, Städtisches Krankenhaus Pirmasens gGmbH	Pirmasens
Seit 09/2018	Assistenzärztin in der Klinik für Urologie und Kinderurologie, Klinikum Worms gGmbH	Worms

## Doktorarbeit

---

03/2013-01/2018	<i>Bedeutung der immunhistochemischen Expression von MAGE A3, NY-ESO 1 und STEAP-1 beim Harnblasenkarzinom</i> Institut für Pathologie der Universität Würzburg	Würzburg
-----------------	--	----------

Pirmasens, 07.10.2018