

Aus dem Pathologischen Institut
Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Frederick Klauschen

***Immunhistochemische Expressionsanalyse des
Enzyms Carboanhydrase XII zur Evaluation
dessen Potenzials als Biomarker und Zielantigen
in Ovarial- und Harnblasenkarzinomen***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lisa Hiepp

aus
München

Jahr

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: Prof. Dr. Doris Mayr

Mitberichterstatter: PD Dr. Julian Marcon
Prof. Dr. Patrick Bastian

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: PD Dr. Elisa Schmoeckel

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2024

Meinen Eltern und meinem Bruder Max

Inhaltsverzeichnis

1	Themaeinführung	1
1.1	Motivation für die durchgeführte Studie.....	1
1.1.1	Ovariakarzinome.....	1
1.1.2	Harnblasenkarzinome.....	4
1.2	Zellstoffwechsel und Azidose im Tumormikromilieu	7
1.2.1	Veränderter Stoffwechsel im Karzinomgewebe.....	7
1.2.2	Klinische Relevanz der tumorzellulären pH-Regulation	9
1.3	Tumorassoziation des Enzyms CA XII	11
1.3.1	Rolle von CA XII in der Tumorbiologie	12
1.3.2	CA XII als attraktives Zielantigen für die Tumordetektion und -therapie.....	14
1.3.3	Bedarf zusätzlicher Analysen	15
2	Zielsetzung und konkrete Fragestellungen	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Patientenkollektive	18
3.1.1	Karzinomkollektive.....	18
3.1.2	Vergleichskollektive	25
3.2	Untersuchungsmaterial.....	26
3.3	Immunhistochemische Färbung	27
3.3.1	Allgemeine Grundlagen.....	27
3.3.2	Spezielles Vorgehen bei Verwendung des Antikörpers 6A10	30
3.4	Immunhistochemische Auswertung.....	32
3.5	Statistische Auswertung	33
3.6	Index der verwendeten Software, Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	34
4	Ergebnisse	37
4.1	Karzinomkollektive	37
4.1.1	Kollektivübergreifende Beobachtungen zum CA XII-Expressionsprofil... 37	
4.1.2	CA XII-Expression in den Ovariakarzinomen	41
4.1.3	CA XII-Expression in den muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen	51
4.2	Vergleichskollektive	64
4.2.1	CA XII-Expression im ovariellen Vergleichsgewebe.....	64
4.2.2	CA XII-Expression im urothelialen Vergleichsgewebe.....	70
4.3	Gegenüberstellung der Kollektive.....	75
4.3.1	Gynäkologische Kollektive	75
4.3.2	Urologische Kollektive	78

5	Diskussion	81
5.1	Immunhistochemisches CA XII-Expressionsprofil der Karzinome	82
5.2	Fehlende Tumorzellspezifität des Enzyms CA XII	88
5.3	Kontingenzanalysen der CA XII-Expression mit pathologischen und klinischen Charakteristika	90
5.3.1	CA XII-Hochregulation im malignen Gewebe.....	90
5.3.2	Assoziation von CA XII und Tumorbilogie innerhalb der Karzinome	92
5.3.3	Identifizierung von Patientengruppen mit auffälliger CA XII-Expression	96
5.4	Stärken und Limitationen der durchgeführten Studie.....	97
5.5	Ausblick.....	98
6	Zusammenfassung	100

Teilaspekte dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht. Für nähere Angaben sei auf die Publikationsliste (Seite 113) verwiesen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	<i>Karzinogenese im Ovar unter Einfluss der Mikroumgebung</i>	2
Abbildung 2:	<i>Präneoplastische und neoplastische Veränderungen der Harnblase</i>	5
Abbildung 3:	<i>Zentrale pH-Regulationsmechanismen einer Tumorzelle</i>	9
Abbildung 4:	<i>Vereinfachte Darstellung der tumorfördernden pH-Regulation durch Carboanhydrasen</i>	13
Abbildung 5:	<i>Graduierungsstufen der Tumordifferenzierung im Ovarialkarzinomkollektiv</i>	20
Abbildung 6:	<i>Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens der Ovarialkarzinompatientinnen</i>	21
Abbildung 7:	<i>Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens der Ovarialkarzinompatientinnen</i>	21
Abbildung 8:	<i>Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens [A] und des tumorspezifischen Überlebens [B] der Harnblasenkarzinompatienten</i>	24
Abbildung 9:	<i>Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens der Harnblasenkarzinompatienten</i>	24
Abbildung 10:	<i>Prinzip der immunhistochemischen Methode</i>	28
Abbildung 11:	<i>Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in einem Ovarialkarzinom</i>	37
Abbildung 12:	<i>Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in einem Harnblasenkarzinom [A] und einem Ovarialkarzinom [B]</i>	38
Abbildung 13:	<i>Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in zwei Harnblasenkarzinomen [A, C] und einem Ovarialkarzinom [B]</i>	39
Abbildung 14:	<i>Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in Harnblasen-[A] und Ovarialkarzinomzellen [B]</i>	40
Abbildung 15:	<i>Carboanhydrase XII-Expression im Ovarialkarzinomkollektiv</i>	41
Abbildung 16:	<i>Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII im Tumorgewebe einer Ovarialkarzinompatientin</i>	42
Abbildung 17:	<i>Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in verschiedenen histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms</i>	44
Abbildung 18:	<i>Kaplan-Meier-Kurven des rezidivfreien Überlebens für die stratifizierten Ovarialkarzinome (n = 75) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expression</i>	48
Abbildung 19:	<i>Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens für die stratifizierten Ovarialkarzinome (n = 80) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expression</i>	50
Abbildung 20:	<i>Carboanhydrase XII-Expression im Harnblasenkarzinomkollektiv</i>	51
Abbildung 21:	<i>Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII im Tumorgewebe eines Harnblasenkarzinompatienten</i>	52
Abbildung 22:	<i>Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in einem muskelinvasiven Urothelkarzinom mit plattenepithelialer Differenzierung</i>	54
Abbildung 23:	<i>Kaplan-Meier-Kurven des rezidivfreien Überlebens für die stratifizierten Urothelkarzinome in UICC-Tumorstadium III (n = 47) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expression</i>	58

Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurven des rezidivfreien Überlebens für die stratifizierten Urothelkarzinome in UICC-Tumorstadium IV (n = 40) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expression	59
Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurven des tumorspezifischen Überlebens für die stratifizierten Urothelkarzinome in UICC-Tumorstadium III (n = 54) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expression	60
Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens für die stratifizierten Urothelkarzinome in UICC-Tumorstadium IV (n = 64) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expression	61
Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurven des tumorspezifischen Überlebens für die stratifizierten Urothelkarzinome in UICC-Tumorstadium IV (n = 64) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expression	62
Abbildung 28: Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der ovariellen Borderlinetumoren.....	64
Abbildung 29: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in ovariellen Borderlinetumoren.....	65
Abbildung 30: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in einem ovariellen Borderlinetumor	66
Abbildung 31: Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der nicht-neoplastischen Ovarien	67
Abbildung 32: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in nicht-neoplastischen Epithelzellen des Ovars.....	69
Abbildung 33: Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der urothelialen in-situ-Karzinome.....	70
Abbildung 34: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in einem urothelialen in-situ-Karzinom.....	71
Abbildung 35: Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der nicht-neoplastischen Urothelien.....	72
Abbildung 36: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in nicht-neoplastischen Urothelzellen	73
Abbildung 37: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII im Harnblasengewebe	74
Abbildung 38: Gegenüberstellung der Carboanhydrase XII-Expression in den gynäkologischen Kollektiven.....	76
Abbildung 39: Gegenüberstellung der Carboanhydrase XII-Expression in den gemäß der Karzinogenese stratifizierten gynäkologischen Kollektiven	77
Abbildung 40: Gegenüberstellung der Carboanhydrase XII-Expression in den urologischen Kollektiven	78
Abbildung 41: Gegenüberstellung der Carboanhydrase XII-Expression in den gemäß der Karzinogenese stratifizierten urologischen Kollektiven	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Charakteristika der verwertbaren Ovarialkarzinomfälle.....	19
Tabelle 2:	Altersverteilung im Ovarialkarzinomkollektiv.....	20
Tabelle 3:	Charakteristika der verwertbaren Harnblasenkarzinomfälle.....	23
Tabelle 4:	Altersverteilung im Harnblasenkarzinomkollektiv.....	23
Tabelle 5:	Angaben zum verwendeten anti-Carboanhydrase XII-Primärantikörper.....	30
Tabelle 6:	Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele.....	32
Tabelle 7:	Carboanhydrase XII-Expression im Ovarialkarzinomkollektiv.....	42
Tabelle 8:	Kontingenz der Merkmalsausprägungen von Tumorgraduierung (G) und Carboanhydrase XII-Expression im Ovarialkarzinomkollektiv.....	43
Tabelle 9:	Kontingenz der Merkmalsausprägungen von Tumorgraduierung (G) und Carboanhydrase XII-Expression innerhalb der FIGO III-Ovarialkarzinome.....	43
Tabelle 10:	Kontingenz der Merkmalsausprägungen von Tumorhistologie und Carboanhydrase XII-Expression im Ovarialkarzinomkollektiv.....	45
Tabelle 11:	Kontingenz der Merkmalsausprägungen von FIGO-Tumorstadium [A] beziehungsweise von den einzelnen Komponenten der TNM-Klassifikation [B-D] und Carboanhydrase XII-Expression innerhalb der high-grade serösen Ovarialkarzinome.....	46
Tabelle 12:	Rezidivfreie 1-Jahres- und 5-Jahres-Überlebensraten für die stratifizierten Ovarialkarzinome (n = 75) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expressionsstufen.....	49
Tabelle 13:	1-Jahres- und 5-Jahres-Gesamtüberlebensraten für die stratifizierten Ovarialkarzinome (n = 80) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expressionsstufen.....	49
Tabelle 14:	Carboanhydrase XII-Expression im Harnblasenkarzinomkollektiv.....	52
Tabelle 15:	Kontingenz der Merkmalsausprägungen von Tumorgraduierung (G) und Carboanhydrase XII-Expression im Harnblasenkarzinomkollektiv.....	53
Tabelle 16:	Kontingenz der Merkmalsausprägungen von Tumorentität und Carboanhydrase XII-Expression im Harnblasenkarzinomkollektiv.....	53
Tabelle 17:	Kontingenz von glandulärer Differenzierung und Carboanhydrase XII-Expressionsstufe innerhalb der muskelinvasiven Urothelkarzinome.....	54
Tabelle 18:	Kontingenz von plattenepithelialer Differenzierung und Carboanhydrase XII-Expressionsstufe innerhalb der muskelinvasiven Urothelkarzinome.....	55
Tabelle 19:	Kontingenz der Merkmalsausprägungen von UICC-Tumorstadium [A] beziehungsweise von den einzelnen Komponenten der TNM-Klassifikation [B-D] sowie der zusätzlichen Deskriptoren L, V und Pn [E-G] und Carboanhydrase XII-Expression innerhalb der muskelinvasiven Urothelkarzinome.....	56
Tabelle 20:	Rezidivfreie 1-Jahres- und 5-Jahres-Überlebensraten für die stratifizierten Urothelkarzinome in UICC-Tumorstadium III (n = 47) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expressionsstufen.....	58
Tabelle 21:	1-Jahres- und 5-Jahres-Gesamtüberlebensraten für die stratifizierten Urothelkarzinome in UICC-Tumorstadium III (n = 54) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expressionsstufen.....	60

Tabelle 22:	<i>1-Jahres- und 5-Jahres-Gesamtüberlebensraten für die stratifizierten Urothelkarzinome in UICC-Tumorstadium IV (n = 64) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expressionsstufen.....</i>	<i>63</i>
Tabelle 23:	<i>Tumorspezifische 1-Jahres- und 5-Jahres-Überlebensraten für die stratifizierten Urothelkarzinome in UICC-Tumorstadium IV (n = 64) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expressionsstufen.....</i>	<i>63</i>
Tabelle 24:	<i>Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der ovariellen Borderlinetumoren.....</i>	<i>65</i>
Tabelle 25:	<i>Kontingenz der Merkmalsausprägungen von Tumorhistologie und Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der ovariellen Borderlinetumoren.....</i>	<i>66</i>
Tabelle 26:	<i>Kontingenz der Merkmalsausprägungen von FIGO-Tumorstadium und Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der ovariellen Borderlinetumoren.....</i>	<i>67</i>
Tabelle 27:	<i>Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der nicht-neoplastischen Ovarien</i>	<i>68</i>
Tabelle 28:	<i>Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der urothelialen in-situ-Karzinome.....</i>	<i>71</i>
Tabelle 29:	<i>Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der nicht-neoplastischen Urothelien.....</i>	<i>73</i>
Tabelle 30:	<i>Gegenüberstellung der Carboanhydrase XII-Expression in den gynäkologischen Kollektiven.....</i>	<i>75</i>
Tabelle 31:	<i>Gegenüberstellung der Carboanhydrase XII-Expression in den urologischen Kollektiven</i>	<i>78</i>

Abkürzungsverzeichnis

ADC	Antikörper-Wirkstoff-Konjugat
CA	Carboanhydrase
CAFs	krebsassoziierte Fibroblasten
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ER	Östrogenrezeptor
EVs	extrazelluläre Vesikel
FFHT	Fisher-Freeman-Halton-Test
FFPE	formalinfixiert und in Paraffin eingebettet
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
FYT	Fisher-Yates-Test
HGSOC	<i>high-grade</i> seröses Ovarialkarzinom
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HMGU	Helmholtz Zentrum München
HRP	Meerrettichperoxidase
IRS	Immunreaktiver Score
kR	korrigiertes Residuum
LGSOC	<i>low-grade</i> seröses Ovarialkarzinom
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MDR	Resistenz gegenüber mehreren Wirkstoffen
MIUC	muskelinvasives Urothelkarzinom
<i>n</i>	Anzahl, Stichprobengröße
<i>p</i>	statistische Überschreitungswahrscheinlichkeit
P-GP	P-Glykoprotein
PP	Prozentsatz positiver Zellen
SD	Standardabweichung
SI	Färbeintensität
TMA	<i>Tissue-Microarray</i>
TNM	<i>Tumor-Node-Metastasis</i> -Klassifikation
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
V	Cramér's V, statistische Effektstärke
WHO	Weltgesundheitsorganisation
χ^2	Chi-Quadrat-Test
Σ	Summe, gesamt

1 Themaeführung

1.1 Motivation für die durchgeführte Studie

Rechnerisch erkrankt in Deutschland etwa jeder zweite Einwohner im Laufe seines Lebens mindestens einmal an Krebs [1]. Für die betroffene Person bedeutet dies häufig eine erhebliche Beeinträchtigung der Lebensqualität und Verkürzung der Lebenszeit. Zudem können sich durch die Krankheitslast des Einzelnen beträchtliche Herausforderungen für dessen direktes Umfeld und letztlich auch für die Gesellschaft ergeben [2]. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit steigt mit zunehmendem Alter an. Es ist der wichtigste, nicht vermeidbare Risikofaktor für die Krebsentstehung. In Anbetracht der demographischen Entwicklung ist eine steigende Inzidenz zu beobachten [1, 3].

Gleichzeitig sorgt der rasante medizinische Fortschritt für eine stetige Weiterentwicklung von Strategien zur Vorbeugung, Früherkennung, Diagnostik und Therapie der bösartigen Gewebeneubildungen (malignen Neoplasien) [3, 4]. Für einige Tumorentitäten konnte die Zahl der Langzeitüberlebenden (sog. *Cancer Survivors*) bereits deutlich angehoben werden [3]. Auch durch den Einsatz molekulargenetischer Methoden lassen sich die Entitäten zunehmend charakterisieren und in Subtypen unterteilen. Angestrebt wird eine individualisierte Medizin. Das verbesserte Verständnis von biologischen Prozessen und tumorzellulären Besonderheiten ermöglicht zudem zielgerichtete Therapieansätze [4].

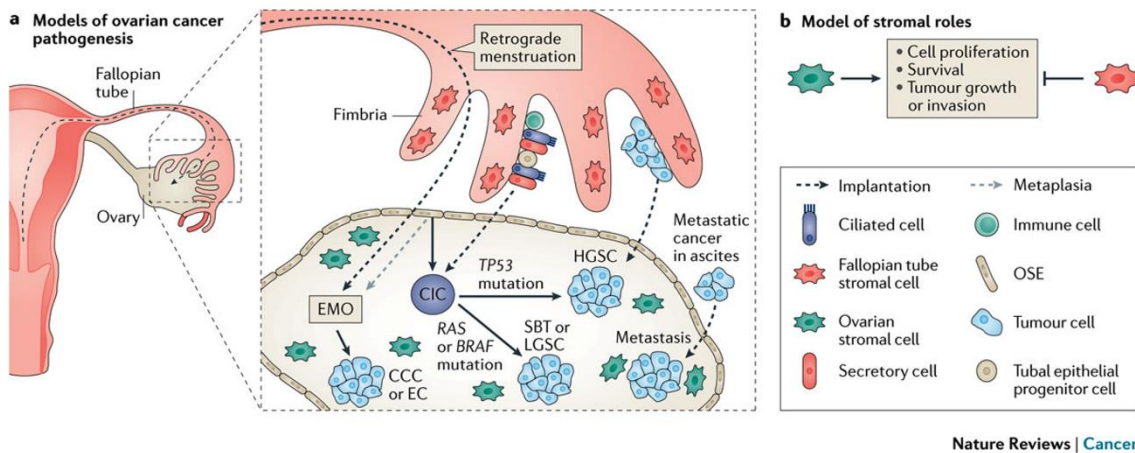
Sowohl die Neoplasien des Eierstocks (Ovar) als auch die der Harnblase sind äußerst heterogene Tumorentitäten [5, 6]. Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind in erster Linie die malignen, vom Deck- oder Grenzgewebe (Epithel) ausgehenden Ovarialkarzinome und muskelinvasiven Harnblasenkarzinome. Für diese biologisch meist hochaggressiven Tumoren besteht weiterhin ein großer Bedarf an diagnostischen, prognostischen und prädiktiven Biomarkern sowie zusätzlichen Behandlungsoptionen [7-12].

Die nachfolgenden beiden Unterkapitel sollen einen groben Überblick über die Erkrankungen und die Herausforderungen im klinischen Management geben. Für weiterführende Informationen sei auf die entsprechende Fachliteratur verwiesen.

1.1.1 Ovarialkarzinome

Eierstockkrebs war im Jahr 2020 das dritthäufigste gynäkologische Malignom (7.180 Neuerkrankungen) und die fünfthäufigste krebsassoziierte Todesursache (5.265 Sterbefälle) von Frauen in Deutschland [1]. Weltweit lag die geschätzte Zahl der Neuerkrankungen für dasselbe Jahr bei 314.000 und die der Sterbefälle bei 207.300 [13].

Der prozentuale Anteil der epithelialen Neoplasien an allen malignen Ovarialtumoren beträgt etwa 90 % [10]. Histopathologisch werden 5 große Gruppen unterschieden: *high-grade* seröse, *low-grade* seröse, endometrioide, klarzellige und muzinöse Adenokarzinome. Diese histologischen Subtypen variieren teils erheblich in ihrer Pathogenese, der Molekulargenetik und folglich auch dem klinischen Verlauf [5, 14]. Der häufigste Subtyp ist das *high-grade* seröse Ovarialkarzinom (HGSOC), welches zugleich eine besonders aggressive Tumorbilogie aufweist [10]. Diese Karzinome scheinen größtenteils aus neoplastisch transformierten Epithelzellen des Eileiters (Tuba uterina) zu entstehen, die sich entweder noch vollständig differenziert oder bereits dedifferenziert auf der Oberfläche des Ovars absiedeln (Abbildung 1). Allerdings entsteht wohl auch ein Teil der HGSOCs direkt aus dem ovariellen Oberflächenepithel beziehungsweise aus dessen Einschluss (sog. Inklusionszyste) [15].



Nature Reviews | Cancer

Abbildung 1: Karzinogenese im Ovar unter Einfluss der Mikroumgebung. Das ovarielle Stroma stimuliert offenbar neoplastische Vorläuferläsionen, sodass sich hier im Gegensatz zur Tuba uterina große Karzinome entwickeln können. [a] Die meisten *high-grade* serösen Karzinome (HGSC) scheinen aus dem tubaren Epithel der Fimbrien zu entstehen. Diese Zellen können sich in verschiedenen Differenzierungsstadien auf der ovariellen Oberfläche absiedeln. Wie auch das nicht-neoplastische Oberflächenepithel des Ovars (OSE) werden sie häufig invaginiert und Teil einer Inklusionszyste (CIC). CICs können auch Vorläufer für seröse Borderlinetumoren (SBT) und *low-grade* seröse Karzinome (LGSC) sein. Diese Neoplasien weisen jedoch eine andere charakteristische Molekulargenetik auf. Klarzellige Karzinome (CCC) und endometrioide Karzinome (EC) sind in vielen Fällen mit einer Endometriose (EMO) assoziiert, die durch retrograde Menstruation oder auch durch eine Metaplasie des OSE bedingt sein kann. (Gestrichelte Linien stehen für Prozesse oder zelluläre Ursprünge, durchgezogene Linien für Progression.) [b] Es wird angenommen, dass die ovariellen Stromazellen einen fördernden Effekt auf Zellproliferation sowie -überleben haben und hierdurch Tumorwachstum oder -invasion begünstigen. Die tubaren Stromazellen scheinen die Karzinogenese dagegen zu hemmen [15]. (Unverändert reproduziert mit Genehmigung von Springer Nature)

Das *low-grade* seröse Ovarialkarzinom (LGSOC) ist eine eigenständige Entität. Nur selten gehen diese Karzinome in ein HGSOC über. Ebenso wie die muzinösen Karzinome entstehen die LGSOCs in der Regel schrittweise über die Zwischenstufe der

sogenannten Borderlinetumoren [14, 15]. Letztere seien aufgrund der Relevanz für die vorliegende Arbeit ebenfalls kurz angesprochen. Es handelt sich hierbei um atypische Epithelproliferationen, deren Dignität zwischen den gutartigen (benignen) Adenomen und den malignen Karzinomen liegt. Ein wesentliches Charakteristikum der ovariellen Borderlinetumoren ist das Fehlen einer destruktiven Stromainvasion, wodurch sie für gewöhnlich eine sehr gute Prognose aufweisen. Dennoch besteht ein gewisses Ausbreitungs- und Progressionspotenzial. Neben den serösen und den muzinösen Borderlinetumoren existieren noch weitere histologische Subtypen, die allerdings sehr selten sind [5, 14]. Die endometrioiden und die klarzelligen Ovarialkarzinome entstehen offenbar zum Teil aus einer atypischen Endometriose [15].

Die verhältnismäßig schlechten Überlebensaussichten der Ovarialkarzinompatientinnen begründen sich maßgeblich im häufig fortgeschrittenen Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung [1]. Klinisch wird dieses nach dem System der *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique* (FIGO) klassifiziert. Die gynäkologischen FIGO-Stadien sind konkordant mit dem international anerkannten Klassifikationssystem der *Union for International Cancer Control* (UICC), welche die TNM-Kategorien (T: Ausbreitung des Primärtumors, N: Lymphknotenstatus, M: Fernmetastasen) für alle malignen Tumoren definiert [16]. Ein wichtiger Grund für die späte Diagnose ist das Fehlen von spezifischen Frühsymptomen. Die Lokalisation der Ovarien erleichtert eine Tumorzellausbreitung in der gesamten Bauchhöhle (intraperitoneale Metastasierung), zunächst ohne Kompression von benachbarten Strukturen. Im Verlauf kann es zu einer deutlichen Bauchumfangsvermehrung kommen, meist bedingt durch sogenanntes Bauchwasser (Aszites). Die Tumorzellen verbreiten sich häufig auch über die Lymphgefäße. Eine Fernmetastasierung ist eher selten [10, 16].

Die Therapie richtet sich zu großen Teilen nach der Ausbreitungsdiagnostik (*Staging*). Von enormer Bedeutung ist in der Mehrzahl der Fälle zunächst eine ausgedehnte Operation zur Evaluation und Reduktion der Tumormasse. Hierdurch entstehen für die Patientinnen jedoch häufig schwerwiegende Komorbiditäten [7, 10]. Die anschließende, meist platinhaltige Chemotherapie soll verbliebene Tumorzellen idealerweise eliminieren und so die Erkrankung heilen. Allerdings sprechen einige Ovarialkarzinome nur unzureichend auf die Systemtherapie an. Ein großes Problem stellt die Entwicklung einer Platinresistenz dar. Selbst bei gutem Ansprechen auf die Erstlinien-Chemotherapie erleiden etwa 80 % der Patientinnen mit initial fortgeschrittenem Tumorstadium ein Rezidiv, welches häufig nicht mehr kurativ behandelt werden kann [7, 10, 16]. Neben den überwiegend konventionellen, wenig individualisierten Therapiemethoden stehen aktuell auch einzelne zielgerichtete Therapien zur Verfügung. Die progressions- und rezidivfreie Zeit wird hierdurch häufig etwas verlängert. So kann bei fortgeschrittenen

Karzinomen zum Beispiel eine Bevacizumab-Antikörpertherapie zur Hemmung der Gefäßneubildung (Angiogenese) eingesetzt werden oder auch eine Therapie mit PARP-Inhibitoren, die bestimmte DNA-Reparaturmechanismen hemmen [7].

Im klinischen Alltag finden zudem bereits verschiedene Tumormarker Anwendung, wie etwa das Mucin 16 (CA 125). Diese Marker weisen häufig eine eingeschränkte Sensitivität und Spezifität auf und dienen insbesondere als Verlaufsparemeter [9]. Zur Prognoseabschätzung und Therapieplanung werden noch vorwiegend die gängigen klinisch-pathologischen Parameter wie der tumorzelluläre Differenzierungsgrad (*Grading*) verwendet. Therapierelevant ist aber beispielsweise auch der Nachweis einer sogenannten homologen Rekombinations-Defizienz (HRD) beziehungsweise einer häufig ursächlichen BRCA-Mutation. Diese zellulären Veränderungen qualifizieren die Patientin besonders für den Einsatz von PARP-Inhibitoren [7]. Weitere prognostische und prädiktive Biomarker werden dringend benötigt, um der Heterogenität der Ovarialkarzinome Rechnung zu tragen [9].

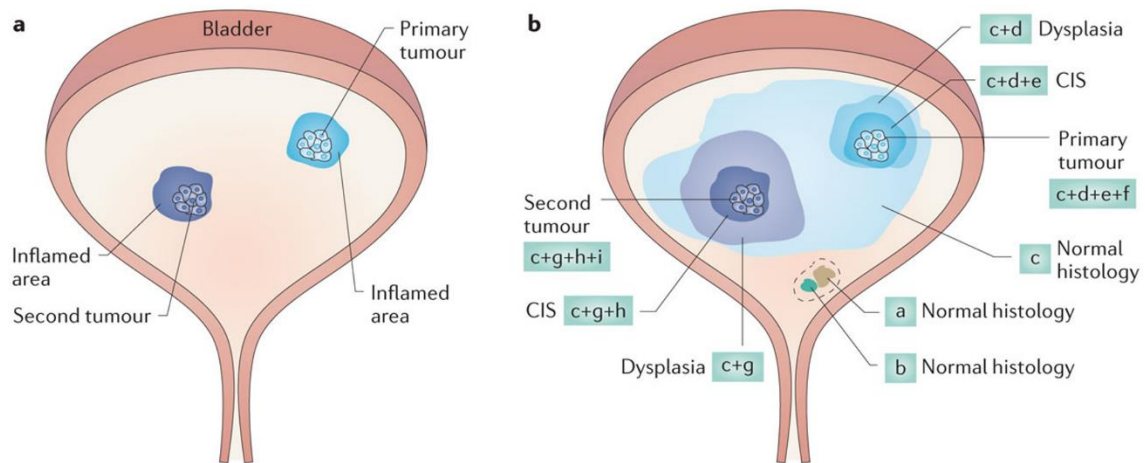
1.1.2 Harnblasenkarzinome

Beinahe alle Harnblasentumoren gehen aus dem spezialisierten Epithel des Harntraktes (Urothel) hervor. Ein großer Anteil dieser Neoplasien wird erfreulicherweise in einem nicht-invasiven Stadium erstdiagnostiziert. Oberflächliche Tumoren lassen sich in vielen Fällen unkompliziert therapieren, wobei die hohe Rezidivneigung eine regelmäßige Nachsorge erforderlich macht. Ein besonders hohes Progressions- und Rezidivrisiko weisen die sogenannten nicht-invasiven papillären *high-grade* Karzinome und vor allem die flachen, *high-grade* differenzierten *in-situ*-Karzinome auf [6, 8].

Von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden diese klinisch hochrelevanten Tumorstadien nicht als maligne Neoplasien kodiert [6]. In den epidemiologischen Daten zum Harnblasenkrebs finden sie daher häufig keine Berücksichtigung [8]. Bereits bei isolierter Betrachtung der invasiven Tumoren war das Harnblasenkarzinom im Jahr 2020 die am vierthäufigsten diagnostizierte Krebserkrankung von Männern in Deutschland. 27 % der 17.130 neu erkrankten Personen waren weiblich. Im selben Jahr wurden insgesamt 5.877 assoziierte Sterbefälle registriert [1]. Die für das Jahr 2020 geschätzte Zahl der weltweiten Neuerkrankungen betrug 573.300, die der Sterbefälle 212.500 [13].

Von großer klinischer Bedeutung ist die Differenzierung zwischen nicht-muskelinvasiven und muskelinvasiven Karzinomen [8]. Der Fokus liegt in dieser Arbeit auf den muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen. Diese sind genetisch ausgesprochen instabil und zeigen eine entsprechend aggressive Tumorbiologie mit rascher Progression und häufiger Metastasierung. Diese erfolgt sowohl lymphogen als auch hämatogen [6, 11].

Histopathologisch weisen hierzulande mehr als 90 % der Harnblasenkarzinome eine urotheliale Differenzierung auf. Die muskelinvasiven Urothelkarzinome (MIUCs) zeigen ein breites morphologisches Spektrum. Auch intratumoral finden sich typischerweise abweichende Differenzierungsmuster sowie histologische Subtypen nebeneinander [6, 12]. Die Karzinome treten sehr häufig multifokal, synchron und metachron auf. Im Sinne einer sogenannten Feldkanzerisierung beziehungsweise durch intraepitheliale oder intraluminal Verbreitung der Zellen kann der gesamte Harntrakt von präneoplastischen und neoplastischen Veränderungen betroffen sein [11, 12] (Abbildung 2).



Nature Reviews | Cancer

Abbildung 2: Präneoplastische und neoplastische Veränderungen der Harnblase. [a] Makroskopisch sichtbar ist meist nur ein Tumor mit begleitender Entzündung. Diese kann mikroskopisch bereits einem in-situ-Karzinom entsprechen. Im Verlauf tritt eine entsprechende Konstellation häufig erneut auf. [b] Molekulare Alterationen finden sich bereits in histologisch unauffälligem Urothel. Innerhalb eines solchen Feldes 'c' kann ein Subklon mit den Alterationen 'c+d' zu einer zellulären, makroskopisch unauffälligen Dysplasie führen. Das in-situ-Karzinom als direkter Vorläufer des invasiven Harnblasenkarzinoms ('c+d+e+f') kann innerhalb der Dysplasie entstehen und enthält folglich die Alterationen 'c+d+e'. Weitere Karzinome mit Ursprung im Feld 'c' können im Verlauf klinisch apparent werden. Die zusätzlichen Alterationen ('g', 'h', 'i') weichen typischerweise von denen des Primärtumors ab. Auch innerhalb anderer Felder ('a', 'b') können sich teils nach Jahren Karzinome entwickeln, welche somit grundlegend andere Alterationen aufweisen. Gemäß des Stammzellkonzeptes können die Felder 'a' und 'b' jedoch klonal verwandt sein (gestrichelte Linie) [11]. (Reproduziert mit Genehmigung von Springer Nature)

Die Harnblasenspiegelung (Zystoskopie) ist von zentraler diagnostischer Bedeutung. Insbesondere flache Läsionen sind makroskopisch häufig nur schwer abgrenzbar. Bei Anwendung der sogenannten photodynamischen Diagnostik kann deren Detektionsrate erhöht werden [8]. Nicht-invasive Methoden konnten die Zystoskopie bislang nicht adäquat ersetzen. Urin-basierte Biomarker werden jedoch bereits unterstützend zur Tumordetektion eingesetzt [8, 11]. Ein Vorteil der Urindiagnostik ist dabei auch die

mögliche Erfassung von neoplastischen Veränderungen der oberen Harnwege sowie die verbesserte Abbildung der tumorzellulären Heterogenität [12].

Der enorme Erkenntniszuwachs der letzten Jahre, insbesondere die molekulare Vielfalt des Harnblasenkarzinoms betreffend, kann im klinischen Alltag derzeit noch nicht zufriedenstellend berücksichtigt werden [8, 12, 17].

Der Goldstandard zur Therapie des muskelinvasiven Karzinoms ist weiterhin die sogenannte radikale Zystektomie. Hierbei wird die Harnblase mit umliegendem Gewebe inklusive Anteile der inneren Geschlechtsorgane sowie Lymphknoten operativ entfernt und eine alternative Harnableitung etabliert. Bei fehlender Fernmetastasierung ist der Ansatz kurativ. Die Operation ist jedoch mit einer hohen Frühkomplikationsrate sowie häufig mit langfristigen körperlichen und psychischen Komorbiditäten assoziiert [8].

In ausgewählten Fällen ist ein primär organerhaltendes Vorgehen mit lokaler Resektion und anschließender Radiochemotherapie in kurativer Intention möglich [8, 12].

Lokalrezidive und Fernmetastasen können auch nach radikaler Zystektomie auftreten. Vor allem bei organüberschreitenden Tumoren oder befallenen Lymphknoten besteht daher zusätzlich die Indikation zur Systemtherapie. Diese kann bereits präoperativ erfolgen. Der Einsatz einer teils stark belastenden Chemotherapie muss interdisziplinär abgewogen werden, zumal bei Weitem nicht alle Patienten im Sinne einer Verlängerung des Gesamtüberlebens profitieren. Der aktuelle Standard ist eine cisplatinhaltige Kombinations-Chemotherapie [8]. Routinemäßig eingesetzte Biomarker zur Prädiktion des Therapieansprechens existieren gegenwärtig nicht. Bislang sind für das Harnblasenkarzinom zudem vergleichsweise wenige zielgerichtete Therapien etabliert. Ein großer Fortschritt war die Zulassung der sogenannten Immun-Checkpoint-Inhibitoren. Voraussetzung für den Einsatz dieser Antikörper in der Erstlinientherapie ist hierzulande die tumorzelluläre Expression von PD-L1. Für bereits metastasierte Patienten hat die medikamentöse Tumorthherapie einen besonders hohen Stellenwert [8, 17].

Es besteht ein großer Bedarf nach weiteren prädiktiven Biomarkern. Ebenso bedeutsam ist die Etablierung neuer prognostischer Marker, um der enormen Heterogenität der Harnblasenkarzinome zukünftig besser gerecht zu werden [17]. Zentral ist hierbei vor allem die Abschätzung des Rezidivrisikos. Die regelmäßigen Nachsorgeuntersuchungen tragen ebenfalls ein gewisses Komplikationsrisiko und können die Lebensqualität der Betroffenen deutlich beeinträchtigen. Darüber hinaus stellen sie eine immense Belastung für das Gesundheitssystem dar. Gerechnet von der Erstdiagnose bis zum Tod des Patienten gilt das Harnblasenkarzinom als die teuerste Tumorentität. Zugleich ist sie in der Forschung stark unterrepräsentiert [8, 11].

1.2 Zellstoffwechsel und Azidose im Tumormikromilieu

Das Karzinomgewebe kann als äußerst komplexes und dynamisches Ökosystem betrachtet werden. Im Jahr 2000 definierten die Autoren Hanahan und Weinberg stark vereinfachte Kennzeichen, die malignes Gewebe von nicht-neoplastischem Gewebe unterscheiden. Mittlerweile enthält deren Schema 14 Kategorien [18].

Die zugrundeliegenden Prozesse bedingen sich gegenseitig und sind noch unzureichend verstanden. Gemäß dem Konzept der klonalen Evolution skizzieren sie jedoch die Mechanismen, die für das Überleben bestimmter Tumorzellklone unter dem starken Selektionsdruck im Tumormikromilieu entscheidend sind. Ein fundamentales Merkmal von neoplastischen Zellen ist dabei die genomische Instabilität [19, 20].

Die differenzierten Epithelzellen des gesunden Gewebes fügen sich über Zellkontakte in einen polar organisierten Zellverband ein und erfüllen spezifische Funktionen für den Organismus. Durch das streng regulierte Verhältnis von Zellteilung, Differenzierung und Apoptose wird die Zellzahl im Gewebe auf einem zweckdienlichen Niveau gehalten [21-23]. Im Laufe der malignen Transformation akkumulieren in den Tumorzellen viele Tausende Mutationen, wobei die meisten als sogenannte *passenger*-Mutationen zu keinem Selektionsvorteil für die betroffene Zelle führen. Dagegen lösen *driver*-Mutationen in Schlüsselgenen von regulatorischen Signalwegen phänotypische Veränderungen aus und führen zu einer fortschreitenden Dedifferenzierung [18, 24, 25]. Unterschieden wird dabei die Aktivierung wachstumsfördernder Gene (Onkogene) und die Inaktivierung wachstumshemmender Gene (Tumorsuppressorgene) [24]. Auch epigenetische Alterationen bedingen eine veränderte Genexpression und können einen Wachstumsvorteil für die Tumorzelle bedeuten [18, 22, 26].

1.2.1 Veränderter Stoffwechsel im Karzinomgewebe

Die Fähigkeit zur autonomen, unkontrollierten Proliferation bedingt eine Steigerung des tumorzellulären Stoffwechsels (Metabolismus). Durch die erhöhte Teilungsrate entsteht im neoplastischen Gewebe jedoch ein Missverhältnis von Zellzahl und Gefäßversorgung (Vaskularisation). Dies führt zu einem verminderten Sauerstoff- und Nährstoffangebot. Zudem werden Metabolite nicht mehr suffizient abtransportiert [21, 23, 27].

Die Restriktion von Sauerstoff wird dabei als Erstes kritisch für den Erhalt der Zellfunktion. Unter hypoxischen Bedingungen kann die Energiegewinnung nicht mehr über die hocheffiziente oxidative Phosphorylierung erfolgen. Stattdessen wird der Energieträger Adenosintriphosphat in deutlich geringerer Menge durch anaerobe Glykolyse erzeugt, wobei das durch den Glukoseabbau anfallende Pyruvat zu Laktat reduziert wird (Milchsäuregärung) [23, 28].

In den 1920er Jahren beobachtete Otto Warburg, dass Tumorzellen häufig auch bei ausreichender Oxygenierung eine erhöhte Glykolyserate aufweisen (sog. aerobe Glykolyse). Dieses auch als Warburg-Effekt bezeichnete Phänomen lässt sich dadurch erklären, dass die Glykolyse trotz der zunächst geringeren Energieeffizienz Selektionsvorteile mit sich bringt. So bleibt die Zellproliferation beispielsweise auch bei schwankender Sauerstoffkonzentration möglich. Darüber hinaus können anfallende Metabolite zur Aufrechterhaltung von anabolen Prozessen weiterverwertet werden. Aufgrund dieser und weiterer Vorteile für das Zellwachstum ist die gesteigerte Glykolyserate mit einer schlechten Prognose assoziiert [23, 28-31].

Sowohl bei Hypoxie als auch bei Normoxie wird die Umstellung auf Glykolyse vordergründig durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 vermittelt, der die Genexpression der notwendigen Enzyme steigert [28, 30]. Um die geringere Effizienz der Glykolyse auszugleichen, werden zudem vermehrt Glukosetransporter in die Zellmembran eingebaut. Im Rahmen der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) kann die hohe Glukoseaufnahme von aggressiven Tumorzellen diagnostisch genutzt werden [21, 30-32].

Auch andere Substrate werden von Tumorzellen in erhöhter Menge aufgenommen. Zu nennen ist hier vor allem Glutamin, das der Zelle Kohlenstoff und Stickstoff für die Biosynthese zur Verfügung stellt und wichtig für die Aufnahme von essenziellen Aminosäuren ist. Aktiv sind in Tumorzellen zudem die metabolischen Wege zur *de-novo*-Synthese von Fettsäuren sowie weitere Prozesse, die zur Aufrechterhaltung der zellulären Struktur und Funktion beitragen [29, 31].

Der Zellmetabolismus wird im Tumorgewebe somit gravierend umprogrammiert. Nicht in allen Zellen finden die Prozesse jedoch im gleichen Ausmaß statt. Die metabolische Heterogenität erklärt sich durch die zahlreichen möglichen Einflussfaktoren. So kann die metabolische Umprogrammierung beispielsweise auch durch Entzündungsprozesse, oxidativen Stress und durch Alterationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen ausgelöst werden. Teils wirken diese Stimulatoren ebenfalls über HIF-1 [23, 28, 30, 33]. Subpopulationen von Tumorzellen nutzen weiterhin bevorzugt die oxidative Phosphorylierung zur Deckung ihres Energiebedarfs. Anstatt einer Konkurrenz um die verfügbaren Substrate besteht zwischen den Zellen im Tumorgewebe häufig eine metabolische Symbiose. Unter anderem wird das Laktat aus glykolytischen Tumorzellen von oxidativen Tumorzellen aufgenommen und über den Citratzyklus verwertet [21, 33]. Zudem stehen das Tumorparenchym und das Tumorstroma in engem wechselseitigem Austausch. Im Laufe der malignen Transformation können Tumorzellen beispielsweise umliegende Fibroblasten durch Signale verändern und in sogenannte krebsassoziierte Fibroblasten (CAFs) umwandeln. Diese fördern über verschiedene Mechanismen die Tumorprogression. Der Metabolismus von CAFs wird dabei ebenfalls umprogrammiert.

Sie produzieren mittels aerober Glykolyse energiereiche Metabolite wie Pyruvat und Laktat, welche anschließend sezerniert und in den Metabolismus von Tumorzellen eingeschleust werden (sog. umgekehrter Warburg-Effekt [34]) [33, 35].

1.2.2 Klinische Relevanz der tumorzellulären pH-Regulation

Insbesondere durch den gesteigerten Energiemetabolismus mit teils deutlich erhöhter Glykolyserate akkumulieren in den Tumorzellen Protonen, die zu einem schrittweisen Absinken des pH-Wertes führen [36, 37]. Viele zelluläre Prozesse, wie auch die Erzeugung von Energie selbst, sind jedoch stark pH-abhängig. Eine intrazelluläre Azidose kann die Zellfunktion massiv beeinträchtigen und letztlich zum Zelltod führen. Zudem inhibiert die Akkumulation von Laktat in glykolytischen Zellen den Energiemetabolismus [37].

Die vermehrte Expression von pH-regulierenden Enzymen und Transportproteinen ermöglicht Tumorzellen das Überleben und die Aufrechterhaltung der Proliferationsrate. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die zentralen Regulationsmechanismen [36].

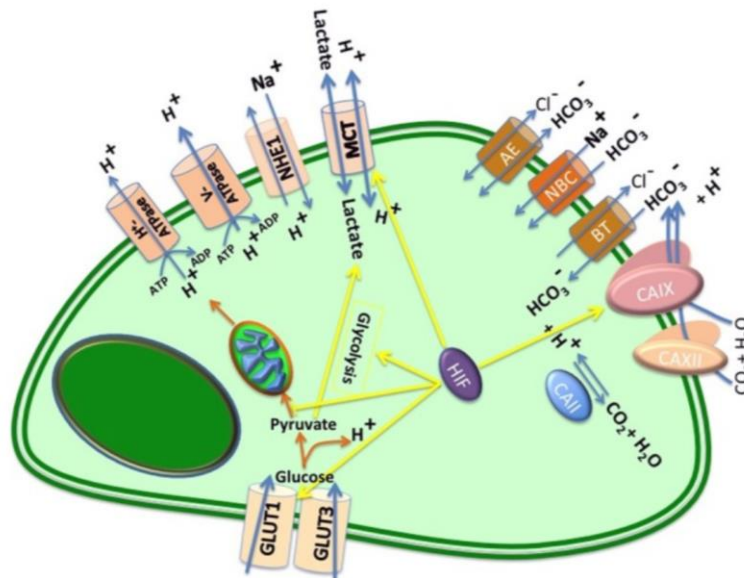


Abbildung 3: Zentrale pH-Regulationsmechanismen einer Tumorzelle. Glukose wird über spezifische Transporter (GLUT) in die Zelle aufgenommen und zu Pyruvat metabolisiert, um 2 Einheiten des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) zu generieren. Unter aeroben Bedingungen kann Pyruvat in den Mitochondrien bis zur oxidativen Phosphorylierung metabolisiert werden, wodurch die Bildung von etwa 36 weiteren Einheiten ATP möglich ist. Im Rahmen der anaeroben Glykolyse wird Pyruvat dagegen zu Laktat reduziert. Durch beide Prozesse, insbesondere aber bei gesteigerter Glykolyserate, akkumulieren intrazellulär Protonen (H⁺). Um den pH-Wert zu stabilisieren, werden diese mithilfe von Bikarbonat-Ionen (HCO₃⁻) abgepuffert oder über verschiedene Mechanismen nach extrazellulär verlagert. Zentral beteiligt sind: Carboanhydrase-Isoenzym II, IX und XII (CA II, CA IX und CA XII), Bikarbonat-Transporter (BT), Natrium-Bikarbonat-Kotransporter (NBC), Anionen-Austauscher (AE), Monocarboxylat-Transporter (MCT), Natrium-Protonen-Austauscher (NHE) und ATP-abhängige Protonenpumpen (V-ATPase/H⁺-ATPase). Der Transkriptionsfaktor HIF induziert die Expression von wichtigen Komponenten der Glykolyse und der zellulären pH-Regulation [36]

Zu diesen Mechanismen zählt auch das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Enzym Carboanhydrase XII (CA XII) [38-40], welches im nachfolgenden Kapitel thematisiert wird (Kapitel 1.3).

Durch das Ausschleusen von sauren Metaboliten und den Import von Ionen zur Pufferung halten Tumorzellen das intrazelluläre Milieu leicht alkalisch, wohingegen sich extrazellulär eine Azidose ausbildet. Hierdurch entsteht eine ökologische Nische, die insbesondere für nicht-neoplastische Zellen toxisch ist und zu einem Selektionsvorteil für die besser adaptierten Tumorzellen führt. So ist zunächst eine lokale Ausbreitung, später ein invasives Wachstum und die metastatische Dissemination der Tumorzellen möglich [28, 41, 42].

Der starke Selektionsdruck im azidotischen Milieu fördert die genomische Instabilität [37]. Neben der erhöhten Genexpression von pH-Regulationsmechanismen begründet sich der Überlebensvorteil der Tumorzellen damit auch in bestimmten genomischen Alterationen, die zu einer Resistenz gegen die Azidose-induzierte Apoptose führen [28, 37]. Die Adaptation der Tumorzellen erfolgt zudem über chronische Autophagie, einen gesteigerten lysosomalen Umsatz und deren subzelluläre Umverteilung sowie über die Bildung von Adiposomen [43, 44].

Ein weiterer Effekt der Tumorzidose ist die vermehrte Freisetzung von extrazellulären Vesikeln (EVs), die vielfältig zur Tumorausbreitung beitragen [43, 45].

Von großer Bedeutung ist darüber hinaus die Förderung der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT). Dabei verlieren die Zellen epitheliale Merkmale wie die Ausbildung bestimmter Zellkontakte und die apiko-basale Polarität. Stattdessen erlangen sie andere Fähigkeiten wie die Produktion von proteolytischen Enzymen zum Abbau der extrazellulären Matrix. Auch der niedrige pH-Wert selbst erleichtert die Degradation der Matrix durch Aktivierung der Enzyme [41, 46]. Die Tumorzellen können sich somit aus dem Zellverband lösen und in günstigere Umgebungsbedingungen migrieren. Als zentrales Prinzip der Tumorzellinvasion und -dissemination ist die EMT entscheidend für die schlechte Prognose maligner Tumoren [22].

Auch Krebsstammzellen profitieren von der Tumorzidose [21, 37]. Zusätzlich bedingt die veränderte Säure-Basen-Homöostase ein immunsuppressives Milieu sowie eine zunehmende Radio- und Chemoresistenz [40, 43, 44, 47].

Insgesamt fördert ein niedriger extrazellulärer pH-Wert im Tumorgewebe also die evolutionäre Selektion aggressiver Tumorzellklone und folglich die Tumorprogression. Dennoch wäre eine zu starke Azidose selbst für neoplastische Zellen kontraproduktiv. Das azidotische Tumormikromilieu stimuliert jedoch auch die Angiogenese. Hierdurch können Metabolite besser abtransportiert werden. Bei starker Azidose wird der Tumormetabolismus außerdem vermehrt auf oxidative Energiegewinnung umgestellt, wodurch

sich die intrazelluläre Azidose abschwächt [37, 43]. Zudem können Tumorzellen anhand der exprimierten Regulationsenzyme vermutlich auch den extrazellulären pH-Wert abpuffern und diesen auf einem für sie förderlichen Niveau stabilisieren [48, 49].

1.3 Tumorassoziation des Enzyms CA XII

Die Familie der humanen Carboanhydrasen (CAs) umfasst 12 katalytisch aktive Zink-Metalloenzyme. Diese beschleunigen die reversible Hydratation von Kohlendioxid zu Kohlensäure, die anschließend in ein Bikarbonat-Ion und ein Proton zerfällt. Die vollständige Reaktionsgleichung lautet daher: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$.

Diese Reaktion ist von großer Bedeutung für zahlreiche physiologische Prozesse. Neben der pH-Regulation sind die CAs beispielsweise am Ionentransport, dem Gasaustausch, der Flüssigkeitsresorption und -sekretion, der Knochenresorption, der Kalzifikation sowie der Urea-, Lipo- und Glukoneogenese beteiligt. Gemäß ihrer charakteristischen subzellulären Lokalisation können die CAs in zytoplasmatische (CA I, CA II, CA III, CA VII, CA XIII), membranständige (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV), mitochondriale (CA VA, CA VB) und ein sekretorisches (CA VI) Isoenzym unterteilt werden. Zudem unterscheiden sich die einzelnen Enzyme hinsichtlich der Verteilung im Gewebe beziehungsweise der Expressionshäufigkeit in bestimmten Zelltypen und somit in der Funktion für den Organismus. Insbesondere für CA II, CA IX und CA XII konnte bereits eine tumorbiologische Relevanz aufgezeigt werden [48, 50-52].

Das Enzym CA XII galt vom Zeitpunkt seiner Entdeckung an als tumorassoziiert. Im Jahr 1998 berichteten zwei Arbeitsgruppen beinahe zeitgleich von dessen Identifizierung in klarzelligem Nierenzellkarzinomen [38, 39]. Seither wurde CA XII in zahlreichen weiteren Tumorentitäten nachgewiesen. Das Enzym spielt darüber hinaus für verschiedene nicht-neoplastische Erkrankungen eine Rolle und wird auch im gesunden Normalgewebe häufig exprimiert. Für nähere Informationen sei auf den Übersichtsartikel der Autoren Abdul Waheed und William Sly verwiesen [53].

Das für CA XII kodierende Gen trägt die Bezeichnung CA 12 und ist auf Chromosom 15 lokalisiert (15q22) [38]. Es sind 3 Transkripte bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen. Die jeweiligen Varianten des Enzyms unterscheiden sich möglicherweise etwas in ihrer Lokalisation und Funktion [54, 55]. Bei voller Länge besteht CA XII aus 354 Aminosäuren. Die Proteinsequenz gliedert sich in ein N-terminales Signalpeptid, eine katalytische Ektodomäne, eine Transmembrandomäne und eine C-terminale intrazelluläre Domäne [38]. Das native Protein kann als Homodimer vorliegen [56]. Eine übersichtliche Darstellung der posttranslationalen Modifikationen ist in der Arbeit von Anna Di Fiore und ihren Kollegen zu finden [57]. Zu betonen ist dabei die Bedeutung der

intrazellulären Domäne. Diese kann beispielsweise durch verschiedene Kinasen phosphoryliert werden [38] und vermutlich auch über eine veränderte Proteinstruktur die Funktion des Enzyms regulieren. Insbesondere bezüglich der Beteiligung von CA XII an Prozessen innerhalb der Zelle ist noch unzureichend bekannt. Es kann jedoch angenommen werden, dass die intrazelluläre Domäne wichtige Bindungsstellen für die Interaktion mit Partnerproteinen enthält [56-58].

Die Expression von CA XII kann konstitutiv aufgrund der spezifischen Zellfunktion erfolgen [53, 59-61] und bei erhöhtem Bedarf durch veränderte Umgebungsbedingungen hochreguliert werden. So wurde beispielsweise die vermehrte Enzyminduktion unter Hypoxie berichtet [62-65]. Wenngleich der genaue Zusammenhang noch nicht hinreichend untersucht ist, scheint der Transkriptionsfaktor HIF-1 dabei eine wichtige Rolle zu spielen [66-68]. Dieser kann wiederum durch zahlreiche Faktoren beeinflusst werden. Bereits angesprochen wurde die zentrale Rolle von HIF-1 bei der metabolischen Umstellung auf eine vermehrte Nutzung der Glykolyse, sowohl bei Hypoxie als auch bei Normoxie. In diesem Rahmen bereitet HIF-1 die Zelle auch auf die drohende Azidose vor und erweitert die pH-Regulationsmechanismen [28], etwa durch Hochregulation von CA XII [30, 40]. Zudem sei erwähnt, dass CA XII in Zellen mit defizientem Von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) konstitutiv überexprimiert wird. In diesen Zellen ist HIF-1 dauerhaft aktiviert [62]. Auch verschiedene Wachstumsfaktoren können die CA XII-Expression offenbar über HIF-1 regulieren [69]. An der Induktion von CA XII sind jedoch auch andere Mechanismen beteiligt. Ning *et al.* berichteten beispielsweise einen synergistischen Effekt von HIF-1 und autokrinen Zytokinen auf die CA XII-Expression in glykolytischen Stromazellen des Tumormikromilieus [67]. Die Transkription von CA 12 wird darüber hinaus durch den Östrogenrezeptor alpha (ER α) stimuliert, der an hormonresponsive *Enhancer* des Gens binden kann [70, 71]. Porras *et al.* beobachteten in ER-positiven Mammakarzinomen die ergänzende Regulation durch den Transkriptionsfaktor GATA3. Der Faktor FOXA1 könnte ebenfalls eine Rolle spielen [71]. Bekannt ist auch, dass das Aktivatorprotein 2 γ (AP-2 γ) direkt an den Promotor von CA 12 bindet und dessen Transkription zusätzlich indirekt über die Hochregulation des ER α sowie andere assoziierte Transkriptionsfaktoren reguliert [72]. CA 12 scheint außerdem durch den nukleären Hormonrezeptor FXR beeinflusst zu werden [73].

1.3.1 Rolle von CA XII in der Tumorbilogie

Bei Überexpression von CA XII erhalten Tumorzellen Selektionsvorteile. Das Enzym ist maßgeblich beteiligt an der intrazellulären Alkalisierung sowie an der Ausbildung und Aufrechterhaltung einer tumorfördernden Azidose im Mikromilieu [36, 48]. Abbildung 4 stellt den zugrundeliegenden Mechanismus in vereinfachter Form dar.

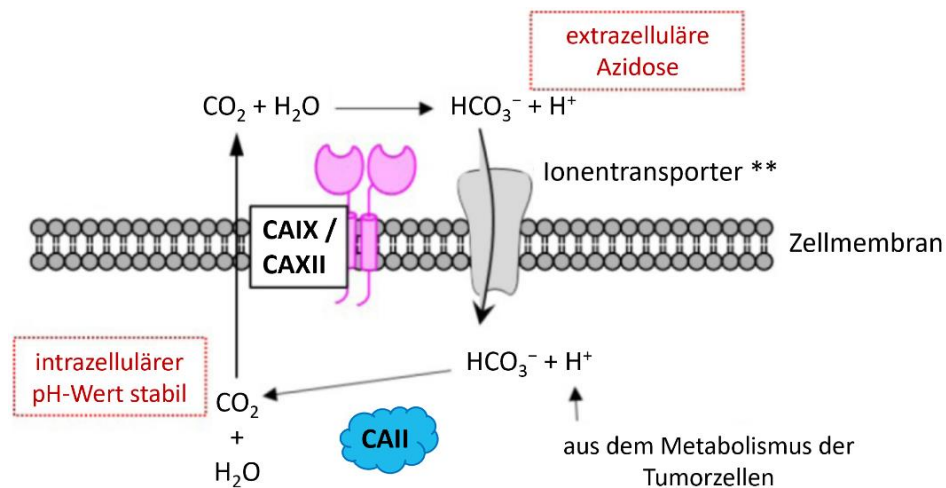


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der tumorfördernden pH-Regulation durch Carboanhydrasen (CAs). Die membranständigen Isoenzyme CA IX und CA XII bilden gemeinsam mit dem zytosmatischen Isoenzym CA II und verschiedenen Membranproteinen ein Metabolon zur Pufferung von azidotisch wirkenden Protonen (H^+) aus dem Tumormetabolismus mit Bikarbonat-Ionen (HCO_3^-). Somit können sie die Tumorprogression durch Stabilisierung des intrazellulären pH-Wertes und zugleich durch einen Beitrag zur extrazellulären Azidose fördern. (** Der abgebildete Ionentransporter steht stellvertretend für verschiedene mögliche Proteine). Modifiziert nach [74]

Als Transmembranprotein mit extrazellulär lokalisierter Enzymdomäne kann CA XII das im Mikromilieu vorhandene Kohlendioxid hydratisieren und somit basisch wirkende Bikarbonat-Ionen bereitstellen. Diese können durch entsprechende Transporter in die Zelle aufgenommen werden (siehe Abbildung 3 in Kapitel 1.2.2). Das zytosmatische Isoenzym CA II kann die Bikarbonat-Ionen nun verwenden, um die im Metabolismus produzierten Protonen abzuf puffern. Hierbei entstehen wiederum Kohlendioxid und Wasser. Beide Moleküle können gemeinsam über sogenannte Aquaporine ausgeschleust werden. Bei entsprechendem Konzentrationsgefälle kann Kohlendioxid zudem frei über die Plasmamembran diffundieren [36].

Kohlendioxid fällt auch durch andere Reaktionen an, beispielsweise im teils hochaktiven Citratzyklus der Tumorzellen, und besitzt ebenfalls ein gewisses Potenzial zur Senkung des intrazellulären pH-Wertes [49]. Die Transmembran-CAs erleichtern die Abgabe von Kohlendioxid, indem sie einen nach extrazellulär gerichteten Gradienten aufrechterhalten und möglicherweise auch direkt mit Aquaporinen interagieren [49, 68]. Außerhalb der Zelle wird es entweder zum Gasaustausch in eine Kapillare abgegeben oder erneut von den CAs hydratisiert. Im zweiten Fall entsteht neben dem Bikarbonat-Ion auch ein Proton. Dieses kann extrazellulär verbleiben und den pH-Wert dort stärker senken als ein Kohlendioxid-Molekül. Auch bei oxidativen Zellen trägt CA XII damit vermutlich entscheidend zur extrazellulären Azidose bei [49]. Das erneut internalisierte Bikarbonat-Ion sorgt wiederum dafür, dass die Tumorzelle im zunehmend azidotischen Milieu besser überleben kann [36].

Die tumorbiologische Bedeutung von CA XII wird bei experimenteller Unterdrückung der Genexpression oder auch bei Inhibition der Enzymfunktion ersichtlich.

So konnte in verschiedenen Studien bereits eine Reduktion der Tumorzellproliferation sowie eine Induktion der tumorzellulären Apoptose beziehungsweise der Ferroptose gezeigt werden [68, 75-77]. Hsieh *et al.* berichteten zudem ein eingeschränktes Migrations- und Invasionspotenzial von Mammakarzinomzellen bei Blockierung der CA 12-Expression [78]. Das Enzym scheint eine wichtige Rolle im p38 MAPK-Signalweg zu spielen und die Aktivität von Metalloproteinasen zu beeinflussen [67, 78, 79]. Bekannt ist auch die Beteiligung von CA XII am Hedgehog-Signalweg. Durch direkte oder indirekte CA XII-Inhibition ließ sich bei Giuntini *et al.* die Ausbreitung von Melanomzellen reduzieren [80]. Li *et al.* konnten zeigen, dass der EMT-Aktivator ZEB1 bei Blockierung von CA XII in seiner Funktion gehemmt ist und beobachteten eine geringere Invasion von Glioblastomzellen [81].

Darüber hinaus beeinflusst CA XII maßgeblich die Resistenz von neoplastischen Zellen gegenüber verschiedenen Therapien. Von großer Bedeutung ist hierbei nicht nur die Azidose im Extrazellularraum [40, 43, 47]. Kopecka *et al.* beobachteten auf Tumorzellen die Koexpression von CA XII mit dem P-Glykoprotein (P-GP), welches ein zentraler MDR (*multidrug resistance*)-Transporter ist. Durch physische Interaktion unterstützt CA XII die Aktivität des P-GP und damit das Ausschleusen von bestimmten zytotoxischen Substanzen. Für das Isoenzym CA IX scheint dieser Zusammenhang hingegen nicht zu gelten [66, 82].

Eine hohe CA XII-Expression findet sich auch auf manchen Krebsstammzellen, die nicht nur entscheidend für die Tumorprogression, sondern auch für die Rezidiventstehung sein können [37, 81, 83].

1.3.2 CA XII als attraktives Zielantigen für die Tumordetektion und -therapie

Als Oberflächenantigen, das von vielen neoplastischen Zellen überexprimiert wird [38, 54, 75, 84-86] und deren malignes Potenzial fördert, ist CA XII ein attraktives Molekül für die zielgerichtete Tumorthherapie. CA XII-Inhibitoren werden daher intensiv erforscht. Zu den aussichtsreichen Kandidaten zählen neben niedermolekularen Wirkstoffen [52, 87] aufgrund ihrer meist höheren Spezifität auch monoklonale Antikörper [83, 88, 89].

Der erste biologische und hoch effiziente CA XII-Inhibitor war der Antikörper 6A10 [83]. Er ist in der Lage, die extrazelluläre Enzymdomäne vitaler Zellen spezifisch zu binden und zu blockieren. Im Xenograft-Mausmodell ließ sich sowohl ein reduziertes Tumorzellwachstum [65, 76] als auch eine erhöhte Chemosensitivität mit reduzierter Anzahl von Metastasen [82] nachweisen. Für den klinischen Einsatz wurde der Antikörper 6A10

bereits weiterentwickelt. Das entsprechende Fab-Fragment (Fab6A10) zeichnet sich unter anderem durch eine verbesserte Gewebegängigkeit aus [90].

Die spezifische Detektion von CA XII kann darüber hinaus genutzt werden, um weitere Therapeutika direkt zu den Tumorzellen zu transportieren. Hierfür lassen sich Antikörper beziehungsweise ihre Fab-Fragmente mit verschiedenen Substanzen koppeln (sog. Antikörper-Wirkstoff-Konjugate, ADCs), wodurch idealerweise die Wirksamkeit verbessert und Nebenwirkungen reduziert werden können [91]. Die Kopplung von Fluorophoren oder anderen diagnostischen Stoffen ist ebenfalls möglich [92]. Auch für den Antikörper 6A10 beziehungsweise das Fab6A10 wurden verschiedene Immunkonjugate zur *in-vivo*-Diagnostik sowie zur therapeutischen Anwendung untersucht [65, 91, 93, 94]. Die intrakavitäre Radioimmuntherapie mit Lutetium-177-markiertem Fab6A10 konnte bereits im Rahmen einer Pilotstudie an einzelnen Glioblastompatienten getestet werden. Die Therapie scheint gut verträglich zu sein. Eine klinische Phase-I-Studie ist im Mai 2022 angelaufen [95].

Monoklonale anti-CA XII-Antikörper können sich auch für die *in-vitro*-Diagnostik eignen. Kobayashi *et al.* entwickelten beispielsweise einen entsprechenden Antikörper als serodiagnostischen Marker für Lungenkarzinome [96].

Im Helmholtz Zentrum München (HMGU) wurde der Antikörper 6A10 mit dem Fluorophor Alexa647 markiert und in Vorarbeit für die vorliegende Arbeit verwendet, um Aszites-Proben von Ovarialkarzinompatientinnen durchflusszytometrisch zu untersuchen. In allen 22 Fällen wiesen die enthaltenen Tumorzellen eine bemerkenswerte CA XII-Oberflächenexpression auf. In 2 zusätzlich analysierten Proben von Patientinnen mit ovariellen Borderlinetumoren fand sich dagegen keine deutliche CA XII-Expression [97]. Der Antikörper 6A10 erschien daher als potenziell nützliche neue Option für die Diagnostik und Therapie von Ovarialkarzinomen.

1.3.3 Bedarf zusätzlicher Analysen

Trotz der tumorbiologischen Relevanz des Enzyms CA XII und den vielversprechenden Ergebnissen bei CA XII-Inhibition fokussierten sich bisherige Studien meist auf das Isoenzym CA IX. Dies ist vordergründig der Tatsache geschuldet, dass CA XII häufiger von nicht-neoplastischen Zellen exprimiert wird als CA IX [48, 51]. So lagen auch für das Ovarial- und Harnblasenkarzinom vor allem Daten zu CA IX vor [98-103].

Allerdings scheint CA XII für manche Tumorentitäten von größerer Bedeutung zu sein [27, 63, 65]. Zudem zeigten bereits mehrere Autoren einen verbesserten Effekt bei kombinierter Inhibition von CA IX und CA XII zur Verhinderung der gegenseitigen Kompensation [47, 68, 76].

In verschiedenen Studien wurde die CA 12-Genexpression im ovariellen und urothelialen Gewebe anhand von molekulargenetischen Methoden bestimmt [38, 39, 63, 104]. Die so detektierte Menge korreliert aufgrund posttranskriptionaler und posttranslationaler Modifikationen jedoch nicht zwingend mit der klinisch relevanten Enzym-Menge [105].

Die bekannten Daten zur immunhistochemischen CA XII-Expression der Gewebe stammen vorwiegend aus zwei älteren Publikationen. Ivanov *et al.* dokumentierten im Jahr 2001 die Expression von CA XII in einigen Geweben, darunter auch die in Ovarialtumoren (Ovarialkarzinome: $n = 16$; Borderlinetumoren: $n = 6$) und Urothelkarzinomen ($n = 14$). In den Entitäten fand sich jeweils eine fokale Expression. Die Auswertung der Expressionshöhe erfolgte semiquantitativ anhand des Prozentsatzes CA XII-positiver Zellen. Es finden sich keine weiteren Angaben zur Kollektivzusammensetzung oder zu durchgeführten Korrelationen. Die Autoren notierten zudem eine fokale Expression im ovariellen Oberflächenepithel sowie im Urothel des Nierenbeckens [63]. Im Jahr 2006 publizierten Hynninen *et al.* eine häufig zitierte Studie zum immunhistochemischen Nachweis von CA IX und CA XII in Ovarialtumoren. Allerdings sind darin nur spärliche Daten zur CA XII-Expression zu finden. Analysiert wurden eine relativ kleine Kohorte von Ovarialkarzinomen ($n = 57$) und einzelne Borderlinetumoren ($n = 6$). In Fällen beider Entitäten fand sich eine deutliche Expression von CA XII. Die Autoren bewerteten die Expressionshöhe nur anhand der Färbeintensität, der Anteil CA XII-positiver Zellen wurde nicht berücksichtigt [101].

Darüber hinaus finden sich auch auf der Seite des *Human Protein Atlas* Angaben zur immunhistochemischen CA XII-Expression in Ovarial- und Urothelkarzinomen sowie im nicht-neoplastischen ovariellen und urothelialen Gewebe. Auch hier wurde nur eine kleine Fallzahl untersucht. Die Expressionshöhe variierte dabei je nach verwendeter Methode. Ovarielle Epithelzellen waren nicht Teil der Analyse [103, 106]. Beschrieben ist zudem eine erhöhte Menge CA XII im Blut von Ovarialkarzinompatientinnen [103].

Insbesondere der prognostische Wert der CA XII-Expression war in den Ovarial- und Harnblasenkarzinomen noch unzureichend untersucht. Während eine hohe Expression für viele Tumorentitäten als prognostisch ungünstig gilt [54, 107, 108], wird für manche Tumorentitäten auch die Assoziation mit einer guten Prognose berichtet [61, 85]. So ist CA XII beispielsweise in Mammakarzinomen, trotz Überexpression und nachgewiesener Förderung der Tumorprogression durch das Enzym [78], mit prognostischen günstigen Parametern wie einem guten tumorzellulären Differenzierungsgrad assoziiert [61]. Diese Beobachtung lässt sich durch die unterschiedlich starken Einflussfaktoren der CA XII-Expression in den einzelnen Entitäten erklären [69, 109]. Die prognostische Aussagekraft des Enzyms ist somit nicht generalisierbar und innerhalb der Tumorentitäten separat zu prüfen.

2 Zielsetzung und konkrete Fragestellungen

Das Enzym CA XII gilt als vielversprechendes Zielmolekül für neue diagnostische und therapeutische Ansätze bei der Behandlung von Tumoren [40, 51, 74].

Der Anspruch dieser Arbeit war es, die Datenbasis zum CA XII-Expressionsprofil von Ovarial- und Harnblasenkarzinomen durch zusätzliche Informationen zu erweitern, um damit zu dringend benötigten Fortschritten im klinischen Management der genannten Entitäten beizutragen. Es wurde insbesondere der diagnostische und prognostische Nutzen von CA XII als Biomarker im Tumorgewebe evaluiert. Dabei kam der spezifische anti-CA XII-Antikörper 6A10 [83] erstmals zur Expressionsanalyse auf formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem (FFPE) Gewebe zum Einsatz. Dieses ist auch in der pathologischen Routinediagnostik von zentraler Bedeutung für die mikroskopische Untersuchung von Präparaten. Als effizienter CA XII-Inhibitor besitzt der verwendete Antikörper zudem das Potenzial, die Tumorprogression zu behindern und die Therapiesensibilität zu erhöhen [65, 82, 95]. Daher könnten die generierten Daten zur Verteilung der CA XII-Expression auch für die therapeutische Anwendung von Relevanz sein.

Konkret sollten folgende Aspekte untersucht und diskutiert werden:

- Lässt sich das Enzym CA XII in den Tumorzellen der untersuchten Ovarialkarzinome und muskelinvasiven Harnblasenkarzinome wie erwartet nachweisen?
- Besteht in den Karzinomen eine Überexpression von CA XII, verglichen mit nicht-invasiven Tumoren und nicht-neoplastischen Epithelien aus Ovar und Harnblase?
- Ist die CA XII-Expression innerhalb der einzelnen Kollektive mit pathologischen und klinischen Parametern assoziiert?
- Hat die CA XII-Expression zum Zeitpunkt der Operation eine prognostische Aussagekraft für die Karzinompatienten?
- Zeigt sich im Hinblick auf die mögliche Verwendung von CA XII als Zielantigen in der individualisierten Therapie eine Patientensubgruppe mit auffälliger Expression?

3 Material und Methoden

Um die Fragestellungen zu untersuchen, wurde eine große Zahl von Ovarialkarzinomen ($n=456$) und muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen ($n=246$) verwendet. Für den Vergleich mit nicht-invasiven Tumoren dienten ovarielle Borderlinetumoren ($n=20$) sowie urotheliale *in-situ*-Karzinome ($n=10$). Als weiteres Vergleichskollektiv wurde nicht-neoplastisches Gewebe aus Ovar ($n=20$) und Harnblase ($n=20$) eingeschlossen.

Alle Gewebeproben wurden nach einem im Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München erarbeiteten Protokoll immunhistochemisch gefärbt. Es folgte die mikroskopische Auswertung der Präparate sowie die statistische Analyse der Daten.

3.1 Patientenkollektive

Für die Fälle der Karzinompatienten konnte auf bestehende Kollektive aus früheren Arbeiten zurückgegriffen werden. Die den Patientenfällen zugehörigen klinisch-pathologischen Daten standen in digitalen Tabellen zur Verfügung. Geeignete Fälle für die Erstellung der Vergleichskollektive wurden aus der Datenbank des Pathologischen Instituts der LMU München selektiert. Die klinisch-pathologischen Daten wurden den in der Computersoftware *PathoPro* (ifms) hinterlegten Befunden entnommen.

3.1.1 Karzinomkollektive

Ovarialkarzinome

Das Ovarialkarzinomkollektiv entstand durch Zusammenschluss zweier Einzelkollektive. Dabei wurden 156 Patientinnen aus den Jahren 1990 bis 2002 und 300 Patientinnen aus den vier kompletten Tumorregister-Jahrgängen zwischen Januar 2003 und Januar 2007 zusammengefasst, um die Fallzahl zu erhöhen.

Bei allen 456 Fällen handelte es sich um erstdiagnostizierte Ovarialkarzinome, die in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe (Campus Innenstadt und Großhadern) der LMU München operativ entfernt wurden. Die Frauen erhielten keine neoadjuvante Chemotherapie.

Das *Typing*, *Grading* und *Staging* der Karzinome war jeweils nach der zum Zeitpunkt der Diagnosestellung gültigen Tumorklassifikation bestimmt worden. Um dem zwischenzeitlichen Erkenntniszuwachs und den entsprechenden Anpassungen der Klassifikationen Rechnung zu tragen, wurde an den Gewebeproben bereits im Rahmen vorausgegangener Studien eine Aktualisierung gemäß WHO 2014 vorgenommen. Durch eine sorgfältige, immunhistochemisch gestützte Reevaluation erfolgte

insbesondere die Aufteilung der serösen Karzinome in die beiden eigenständigen histologischen Subtypen des LGSOC und des HGSOC. Analog zu den endometrioiden Karzinomen waren die muzinösen und die seromuzinösen Karzinome dreistufig graduiert. Die als hochmaligne geltenden undifferenzierten Karzinome wurden ebenso wie die klarzelligen Karzinome als G3-Tumoren klassifiziert. Eine Anpassung der TNM-Klassifikation war retrospektiv nicht sinnvoll möglich.

Von den ursprünglich 456 Patientenfällen konnten nach der Aufbereitung im Labor letztlich noch 392 Fälle (86,0 %) in die Auswertung einbezogen werden. Tabelle 1 gibt einen Überblick über deren Charakteristika. Verantwortlich für den Gewebeverlust waren technische Gründe bei der Herstellung der Präparate oder das Fehlen der jeweils relevanten Zellen in der angeschnittenen Schicht des Paraffinblockes.

Tabelle 1: Charakteristika der verwertbaren Ovarialkarzinomfälle (n = 392) – absolute (n) und relative Häufigkeiten der Kategorien jedes Parameters

Parameter		n	(%)
Histologie	LGSOC	40	(10,2)
	HGSOC	267	(68,1)
	endometrioid	37	(9,4)
	muzinös	17	(4,3)
	seromuzinös	4	(1,0)
	klarzellig	15	(3,8)
	undifferenziert	8	(2,0)
	fehlend	4	(1,0)
Tumorgrad	G1	57	(14,5)
	G2	28	(7,1)
	G3	301	(76,8)
	GX / fehlend	6	(1,5)
FIGO-Tumorstadium	I	56	(14,3)
	II	25	(6,4)
	III	266	(67,9)
	IV	41	(10,5)
	fehlend	4	(1,0)
Ausdehnung des Primärtumors	T1	66	(16,8)
	T2	35	(8,9)
	T3	282	(71,9)
	TX / fehlend	9	(2,3)
Lymphknotenstatus	N0	109	(27,8)
	N1	125	(31,9)
	NX / fehlend	158	(40,3)
Fernmetastasen	M0	13	(3,3)
	M1	41	(10,5)
	MX / fehlend	338	(86,2)

Die Verteilung der Tumorgraduierungsstufen innerhalb der einzelnen histologischen Subtypen ist in Abbildung 5 dargestellt.

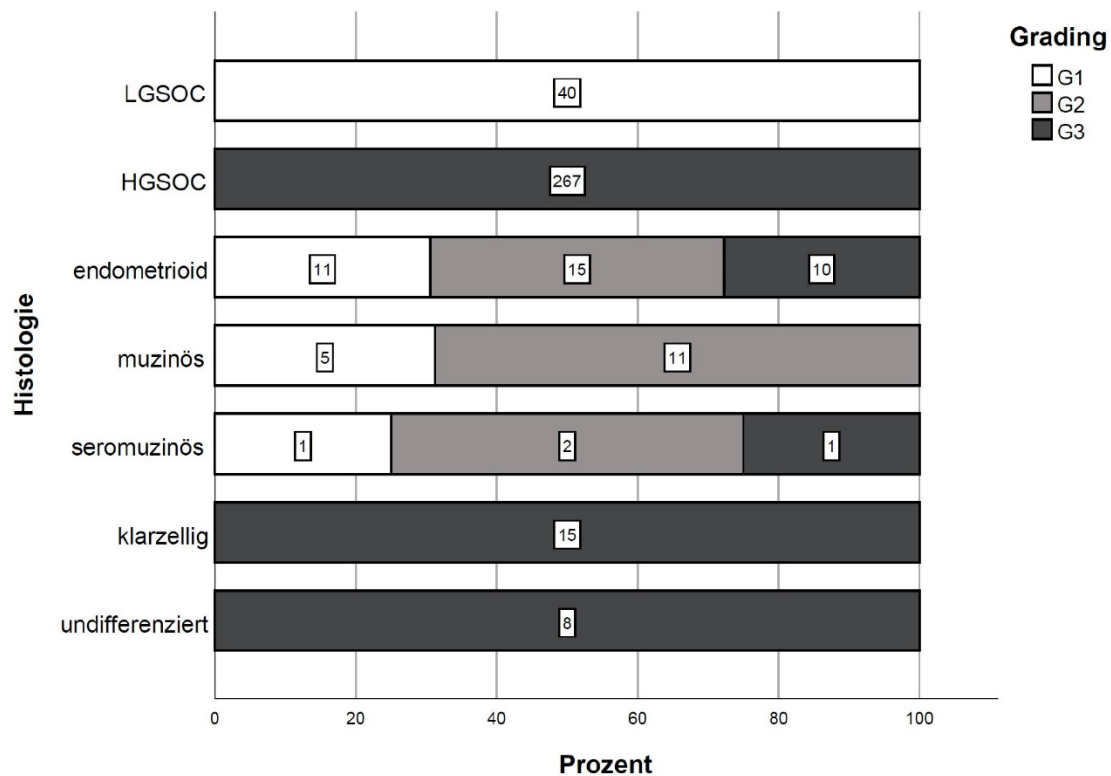


Abbildung 5: Graduierungsstufen der Tumordifferenzierung im Ovarialkarzinomkollektiv – absolute und relative Häufigkeiten innerhalb der histologischen Subtypen

Die Patientinnen der analysierten Ovarialkarzinome waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zwischen 23 und 93 Jahre alt, wobei für 1 Fall (0,3 %) die entsprechenden Daten fehlten. Das Durchschnittsalter betrug 60,33 Jahre ($SD=12,44$), das mediane Alter 62 Jahre. Tabelle 2 zeigt die Häufigkeitsverteilung der gruppierten Altersstufen.

Tabelle 2: Altersverteilung im Ovarialkarzinomkollektiv – absolute (n) und relative Häufigkeiten

Altersgruppen	n	(%)
20-29 Jahre	1	(0,3)
30-39 Jahre	18	(4,6)
40-49 Jahre	60	(15,3)
50-59 Jahre	93	(23,8)
60-69 Jahre	128	(32,7)
70-79 Jahre	73	(18,7)
80-89 Jahre	16	(4,1)
90-99 Jahre	2	(0,5)
Σ	391	(100,0)

390 Fälle (99,5 %) enthielten Daten zum *Follow-up* aus dem Tumorregister München. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung lebten demnach noch 126 Patientinnen (32,1 %), 264 Patientinnen (67,3 %) waren bereits verstorben. Daten zum tumorspezifischen Überleben lagen nur für eines der Teilkollektive vor, sodass die Analysen mit den Angaben zum Gesamtüberleben durchgeführt wurden. Bei einem minimalen Überleben von 0,00 Monaten und einem maximalen Überleben von 230,52 Monaten betrug das mediane Gesamtüberleben 43,56 Monate. Das 5-Jahres-Überleben aller analysierten Fälle lag etwa bei 40 %, das 10-Jahres-Überleben bei etwa 20 % (Abbildung 6).

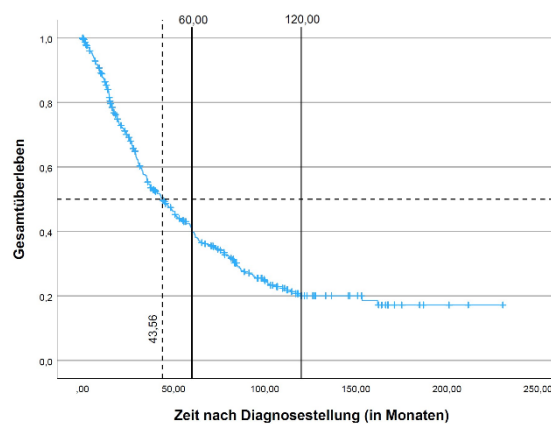


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens der Ovarialkarzinompatientinnen. Zensierte Fälle sind auf der Überlebensfunktion markiert. Dargestellt ist zudem die mediane Überlebenszeit (gestrichelte Linien), das 5-Jahres-Überleben sowie das 10-Jahres-Überleben (durchgezogene Linien)

Informationen zu aufgetretenen Rezidiven lagen ebenfalls nur für ein Teilkollektiv vor. Bei 27 der 136 erfolgreich nachverfolgten Patientinnen (19,9 %) kam es im Beobachtungszeitraum erneut zu einem Ovarialkarzinom. Die rezidivfreie Zeit lag minimal bei 0,00 Monaten und maximal bei 230,52 Monaten (Abbildung 7).

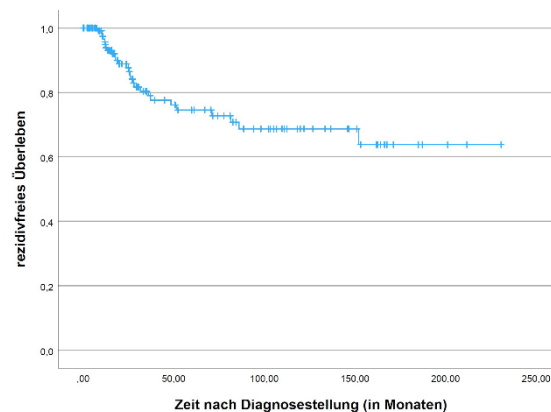


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens der Ovarialkarzinompatientinnen. Zensierte Fälle sind auf der Überlebensfunktion markiert

Muskelinvasive Harnblasenkarzinome

In das Harnblasenkarzinomkollektiv wurden 246 Fälle von Patienten aufgenommen, die sich in den Jahren 2004 bis 2014 in der Urologischen Klinik und Poliklinik der LMU München einer radikalen Zystektomie unterzogen.

An den Zystektomiepräparaten wurde bei allen Patienten ein muskelinvasives Karzinom (\geq pT2) diagnostiziert. Zur genauen Lokalisation innerhalb der ableitenden Harnwege lag in der bestehenden Patiententabelle keine Information vor. Auch wenn einzelne Fälle vermutlich auf Karzinome des angrenzenden Ureters oder der Urethra zurückgehen, wird im Folgenden einfachheitshalber von Harnblasenkarzinomen gesprochen.

Die pathologischen Befunde aller Präparate des Kollektivs wurden gemäß der bis zum Jahr 2016 gültigen WHO-Klassifikation von 2004 erstellt. Aufgrund der darin postulierten Annahme, dass muskelinvasive Karzinome im Grunde immer eine *high-grade* Differenzierung aufweisen [8], war für den Tumorgrad nur die Einteilung in G2 und G3 nach dem dreistufigen System von 1973 aufgeführt. Das *Staging* der Karzinome erfolgte jeweils nach der zum Diagnosezeitpunkt gültigen Klassifikation der UICC.

Nach Gewebeverlust durch den Laborprozess konnten von den ursprünglich 246 Patientenfällen noch 234 Fälle (95,1 %) mit vorliegenden Tumorzellen ausgewertet werden. Die Charakteristika der tatsächlich analysierten Fälle sind in Tabelle 3 zu finden. Das Kollektiv bestand größtenteils aus MIUCs (96,2 %), wobei die histologischen Subtypen in der digitalen Tabelle nicht vermerkt waren. Das Vorliegen einer plattenepithelialen Differenzierung war bei 35 Patientenfällen (15,6 %) bekannt, eine glanduläre Differenzierung bei 14 Fällen (6,2 %).

Von den letztlich in die Analyse einbezogenen Patienten waren 170 männlich (72,6 %) und 64 weiblich (27,4 %). Die Erstdiagnose eines Harnblasentumors erhielten die Patienten meist schon im Vorfeld im Rahmen einer transurethralen Resektion. Für die Zeit vor der radikalen Zystektomie war daher bei 38 Patienten (16,2 %) die Durchführung von mindestens einer Mitomycin-Instillation angegeben, bei 17 Patienten (7,3 %) war mindestens eine BCG-Instillation vermerkt. 6 Patienten (2,6 %) erhielten eine neoadjuvante Chemotherapie.

Zum Zeitpunkt der Operation waren die Patienten zwischen 40 und 82 Jahre alt. Das mittlere Alter lag bei 66,18 Jahren ($SD = 8,46$), der Median des Alters betrug 68 Jahre. Tabelle 4 zeigt die Verteilung der Altersgruppen.

Von den Fällen mit bekannten Daten zu einer oder mehreren postoperativen Therapien unterzogen sich 67 Patienten (34,0 %) einer adjuvanten Chemo- und 57 Patienten (29,8 %) einer adjuvanten Radiotherapie.

Table 3: Charakteristika der verwertbaren Harnblasenkarzinomfälle (n = 234) – absolute (n) und relative Häufigkeiten der Kategorien jedes Parameters

Parameter		n	(%)
Histologie	Urothelkarzinom	225	(96,2)
	Plattenepithelkarzinom	2	(0,9)
	Adenokarzinom	7	(3,0)
Tumorgrad (WHO 1973)	G2	18	(7,7)
	G3	215	(91,9)
	GX / fehlend	1	(0,4)
UICC-Tumorstadium	II	19	(8,1)
	III	95	(40,6)
	IV	120	(51,3)
Ausdehnung des Primärtumors	T2	43	(18,4)
	T3	132	(56,4)
	T4	59	(25,2)
Lymphknotenstatus	N0	116	(49,6)
	N1	98	(41,9)
	NX / fehlend	20	(8,5)
Fernmetastasen	M0	189	(80,8)
	M1	33	(14,1)
	MX	12	(5,1)
Lymphgefäßinvasion	L0	150	(64,1)
	L1	84	(35,9)
Veneninvasion	V0	198	(84,6)
	V1	36	(15,4)
Perineuralscheideninvasion	Pn0	177	(75,6)
	Pn1	56	(23,9)
	PnX / fehlend	1	(0,4)

Table 4: Altersverteilung im Harnblasenkarzinomkollektiv – absolute (n) und relative Häufigkeiten

Altersgruppen	n	(%)
40-49 Jahre	13	(5,6)
50-59 Jahre	31	(13,2)
60-69 Jahre	98	(41,9)
70-79 Jahre	89	(38,0)
80-89 Jahre	3	(1,3)
Σ	234	(100,0)

Bei 227 Fällen (97,0 %) waren die Überlebensdaten vollständig angegeben. Aus diesen Daten ging hervor, dass 109 Patienten (48,0 %) bereits tumorbezogen verstarben. Weitere 42 Patienten (18,5 %) verstarben ohne Tumorbezug. Die übrigen 76 Patienten (33,5 %) waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch am Leben. Minimal konnten die

Patienten 0,16 Monate nachbeobachtet werden, maximal 129,21 Monate. Für das Gesamtüberleben des Kollektivs betrug die mediane Überlebenszeit 23,41 Monate, mit einem 5-Jahres-Überleben von etwa 32 % und einem 10-Jahres-Überleben von etwa 23 % (Abbildung 8 A). Für das tumorspezifische Überleben lag die mediane Überlebenszeit bei 37,97 Monaten, das 5-Jahres-Überleben bei etwa 43 % und das 10-Jahres-Überleben bei etwa 37 % (Abbildung 8 B).

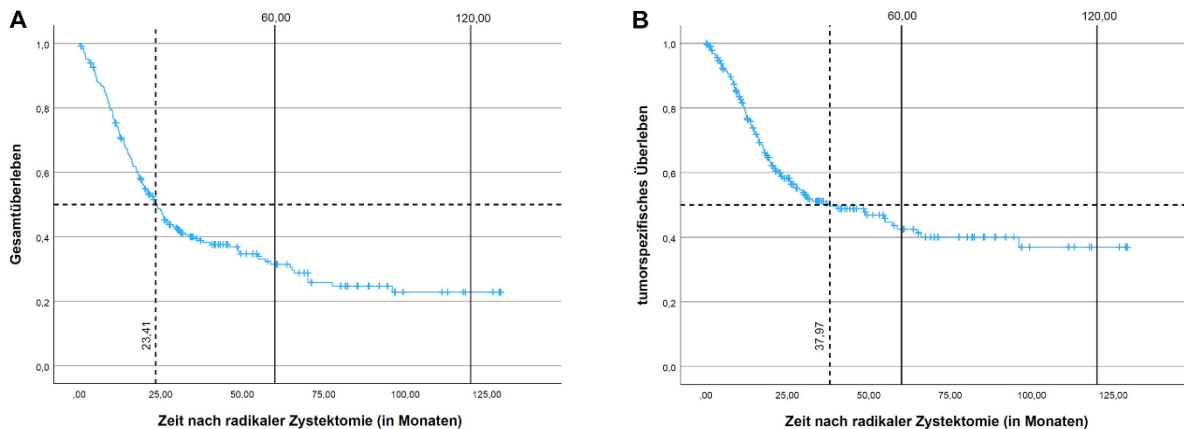


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens [A] und des tumorspezifischen Überlebens [B] der Harnblasenkarzinompatienten. Zensierte Fälle sind auf der Überlebensfunktion markiert. Dargestellt ist jeweils auch die mediane Überlebenszeit (gestrichelte Linien), das 5-Jahres-Überleben sowie das 10-Jahres-Überleben (durchgezogene Linien)

Bis zum Ende der Datenerhebung wurden 130 Tumorrezidive registriert, wobei in 10 Fällen (7,7 %) kein entsprechendes Diagnosedatum bekannt war. Bei einem Minimum von 0,00 Monaten und einem Maximum von 129,20 Monaten betrug das mediane rezidivfreie Überleben 13,15 Monate (Abbildung 9).

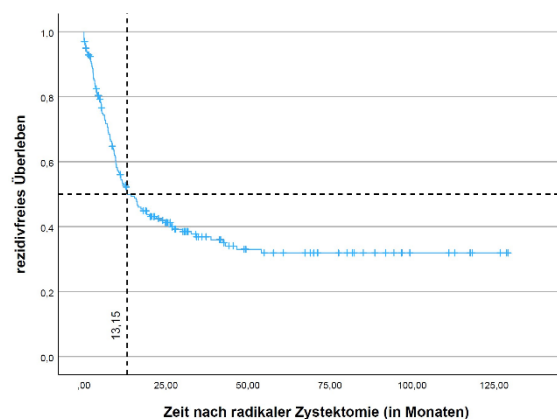


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens der Harnblasenkarzinompatienten. Zensierte Fälle sind auf der Überlebensfunktion markiert. Dargestellt ist zudem die mediane rezidivfreie Überlebenszeit (gestrichelte Linien)

3.1.2 Vergleichskollektive

Ovarielle Borderlinetumoren

Für die Untersuchung von Ovarialtumoren ohne destruktive Stromainvasion wurden 20 asservierte Fälle mit der Diagnose Borderlinetumor aus den Jahren 2003 bis 2019 ausgewählt. Die Frauen wurden in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München (Campus Innenstadt und Großhadern) sowie in einem Fall im MIC-Zentrum München operiert.

Ein Fall konnte aufgrund des Fehlens von Tumorzellen auf dem vorliegenden Gewebe nicht zur Analyse beitragen.

Von den 19 verwertbaren Präparaten war der histologische Subtyp in 14 Fällen serös (73,7 %), in 4 Fällen muzinös (21,1 %) und in 1 Fall seromuzinös (5,3 %). Gemäß der jeweils zum Zeitpunkt der Diagnosestellung gültigen Klassifikation handelte es sich um 17 Tumoren in FIGO-Stadium I (89,5 %) und 2 Tumoren in FIGO-Stadium III (10,5 %).

Die Altersspanne der Patientinnen bei Diagnosestellung reichte von 21 bis 79 Jahren. Das mittlere Alter betrug 55,74 Jahre ($SD = 15,09$), das mediane Alter 52 Jahre.

Nicht-neoplastische Ovarien

Die 20 nicht-neoplastischen Vergleichspräparate stammten von Patientinnen, die sich im Zeitraum 2015 bis 2016 am Campus Innenstadt der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München aufgrund verschiedener Indikationen einer gynäkologischen Operation unterziehen mussten und dabei zu diagnostischen Zwecken adnektomiert wurden. Bei 9 Frauen wurden die Ovarien auf beiden Seiten entfernt, sodass die 20 selektierten Fälle auf 11 Patientinnen zurückgingen.

Letztlich konnten auch hier nur 19 Fälle analysiert werden, da die zu untersuchenden Epithelien bei der Herstellung eines Präparates vollständig abgelöst wurden.

6 der Frauen (54,5 %) erhielten die Diagnose eines Malignoms der Gebärmutter (4 × Zervixkarzinom, 2 × Korpuskarzinom). Die Ovarien waren in allen Fällen tumorfrei. Bei keiner Patientin wurde eine neoadjuvante Tumorthherapie durchgeführt. Die Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Operation zwischen 47 und 79 Jahre alt. Das Durchschnittsalter betrug 61,91 Jahre ($SD = 11,02$), das mediane Alter lag bei 59 Jahren.

Urotheliale *in-situ*-Karzinome und nicht-neoplastische Urothelien

Für die Untersuchung von nicht-invasiven Tumoren wurden 10 Patientenfälle mit urotheliale *in-situ*-Karzinom aufbereitet, wobei auch hier letztlich ein Fall aus der Analyse ausschied. Die 9 Fälle mit beurteilbarer Neoplasie gingen auf 8 Männer (88,9 %)

und 1 Frau (11,1 %) zurück, deren Harnblase mitsamt umliegendem Gewebe entfernt werden musste. Zum Zeitpunkt der Operation waren die Patienten zwischen 51 und 82 Jahre alt, bei einem durchschnittlichen Alter von 72,44 Jahren ($SD=9,85$) und einem medianen Alter von 73 Jahren.

Das auf den Präparaten zusätzlich vorliegende Urothel ohne zytologische Atypien wurde ebenfalls begutachtet und gemeinsam mit 10 weiteren Fällen von nicht-neoplastischem Urothel als Vergleichskollektiv verwendet.

Das Gewebe aller 20 Patienten stammte von Zystektomien, die in den Jahren 2018 und 2019 in der Urologischen Klinik und Poliklinik der LMU München durchgeführt wurden. Bei 10 Patienten (50,0 %) bestand die Vordiagnose eines invasiven Karzinoms, jedoch ohne vitale Tumorresiduen im Zystektomiepräparat. Neben den 9 Fällen (45,0 %) mit der Diagnose eines *in-situ*-Karzinoms, lag bei 12 Patienten (60,0 %) ein begleitendes invasives Karzinom vor (10 × Prostatakarzinom, 1 × Vaginalkarzinom, 1 × Nierenbeckenkarzinom). Bei 7 Patienten (35,0 %) wurde eine stattgehabte Tumortherapie angegeben.

Die 20 Fälle zur Begutachtung von nicht-neoplastischem Urothel gehörten zu 16 männlichen (80,0 %) und 4 weiblichen (20,0 %) Patienten im Alter zwischen 51 und 82 Jahren. Der Altersdurchschnitt lag hier bei 69,70 Jahren ($SD=8,88$) und das mediane Alter bei 71,50 Jahren.

3.2 Untersuchungsmaterial

Das verwendete Gewebe aller Patienten stammte aus dem Bestand des Pathologischen Instituts der LMU München. Es handelte sich um konserviertes Material aus der Routinediagnostik des Instituts, das nach Abschluss aller Untersuchungen im Archiv aufbewahrt wurde. Somit bestand keinerlei Nachteil für die inkludierten Patienten. Die ersten Schritte der Gewebeaufbereitung erfolgten bereits zum jeweiligen Zeitpunkt der operativen Entnahme. Das Ausgangsmaterial für die Forschungsarbeit waren daher FFPE-Blöcke. Zudem waren die für die pathologische Diagnostik angefertigten Objektträger der Präparate in der Übersichtsfärbung verfügbar.

Aufgrund der großen Fallzahl wurden für die Karzinomkollektive im Rahmen vorausgegangener Projekte bereits sogenannte *Tissue-Microarrays* (TMAs) erstellt. Bei dieser Technik werden sorgfältig ausgewählte Gewebezylinder aus den Paraffinblöcken mehrerer Patienten in gestanzte Lücken eines Rezipientenblockes übertragen. Lagepläne gewährleisten die korrekte Zuordnung der Fälle. Die Verwendung von TMAs senkt den Materialverbrauch und bedeutet insbesondere für die Laborprozesse eine große finanzielle und zeitliche Ersparnis [110].

Insgesamt 17 TMA-Paraffinblöcke enthielten das zu untersuchende Gewebe der 456 Ovarialkarzinomfälle, wobei pro Fall zwei beziehungsweise drei Gewebezylinder zu je 1,5 mm Durchmesser gestanzt wurden. In jeden Block war zudem Referenzgewebe aus Tonsille oder Kolon integriert.

Die 246 Harnblasenkarzinomfälle verteilten sich auf 13 TMA-Paraffinblöcke mit 1,0 mm Stanzen. Hier wurden pro Fall drei Gewebezylinder aus dem Haupttumor und drei Zylinder aus dem Bereich der Invasionsfront eingefügt. Auch in diesen Blöcken war Tonsillengewebe als Referenz enthalten.

Die Präparate der Vergleichskollektive wurden als Flächenschnitte verwendet, sodass sich auf jedem Objektträger nur das Material eines Patienten befand.

In Vorbereitung auf die immunhistochemische Färbung wurden von allen Paraffinblöcken sogenannte Leerschnitte angefertigt. Die Blöcke wurden hierzu zunächst für mindestens eine Stunde bei - 20 °C gekühlt, um deren Materialhärte zu steigern. Mithilfe eines Schlittenmikrotoms wurden Gewebescheiben von 3 µm Dicke abgetragen und in ein Kaltwasserbad (4 °C) abgelegt. Anschließend wurden sie zur Streckung des Gewebes in ein Heißwasserbad (45-48 °C) überführt. Faltenfreie Präparate wurden umgehend auf für die Immunhistochemie geeignete Adhäsionsobjektträger aufgezogen. Durch die Verwendung silanisierter Objektträger konnte die Haftung des Gewebes erhöht werden. Nach vertikalem Abtropfen wurden die Leerschnitte schließlich in einem Brutschrank (55 °C) dehydriert.

3.3 Immunhistochemische Färbung

Die Informationen des nachfolgenden Unterkapitels sind einem Lehrbuch der Autorin Gudrun Lang [111] sowie der persönlichen Korrespondenz [110] entnommen.

3.3.1 Allgemeine Grundlagen

Die Immunhistochemie ist eine Methode zur gezielten Untersuchung eines definierten Antigens im Gewebe. Antigene sind Eiweißverbindungen, deren charakteristische Teilabschnitte als Epitope bezeichnet werden. Diese können innerhalb von Zellen, auf deren Oberfläche oder im Extrazellularraum vorliegen. So besitzt etwa CA XII als membranständiges Antigen sowohl extrazellulär als auch intrazellulär liegende Epitope. Jedes Epitop der Antigene kann von einem passenden Antikörper gebunden werden.

Je nach Herstellungsverfahren unterscheidet man zwei immunhistochemisch nutzbare Arten von Antikörpern. Polyklonale Antikörper werden von verschiedenen Plasmazellen eines immunisierten Versuchstieres produziert. Hierdurch entsteht eine Mischung heterogener Antikörpermoleküle mit Bindungsaffinität zu jeweils einem anderem Epitop

des Antigens. Diese Art von Antikörpern wird auch im Rahmen der humanen Immunreaktion gebildet. Gehen die Antikörper aus einem gemeinsamen Zellklon hervor, der durch Fusion einer Plasmazelle mit einer immortalisierten Myelomzelllinie erzeugt wurde (Hybridom-Technik), nennt man sie monoklonal. Sie binden nur ein bestimmtes Epitop. Trotz der aufwändigeren Herstellung sind monoklonale Antikörper aufgrund ihrer höheren Spezifität und der Reproduzierbarkeit zu bevorzugen.

Ferner werden für die Immunhistochemie hauptsächlich Antikörper verwendet, die zur Klasse der Gamma-Immunglobuline (IgG) gehören. Diese Y-förmigen Monomere sind Glykoproteine und enthalten ebenso wie die zellulären Antigene Epitope, wodurch sie selbst als Antigen fungieren und von sogenannten Sekundärantikörper gebunden werden können. Zudem lassen sie sich mit verschiedenen Substanzen konjugieren. Für diagnostische Zwecke handelt es sich dabei vorwiegend um Markermoleküle.

Liegen die Zielantigene im untersuchten Gewebe vor, bilden sich nach Aufbringen des Antiserums Immunkomplexe. Diese können durch Verwendung Enzym-gekoppelter Antikörper sichtbar gemacht werden. Die Enzyme wandeln ein auf die Gewebeschnitte aufgebracht chromogenes Substrat in ein farbiges Endprodukt um, welches mittels Mikroskop am Reaktionsort detektiert werden kann. Ein häufig genutztes Enzym ist die Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP). Das gebräuchlichste Chromogen ist das Diaminobenzidin (DAB), dessen Farbreaktion von der Peroxidase katalysiert wird. Die Antigene werden dabei durch ein unlösliches, bräunliches Präzipitat markiert (Abbildung 10).

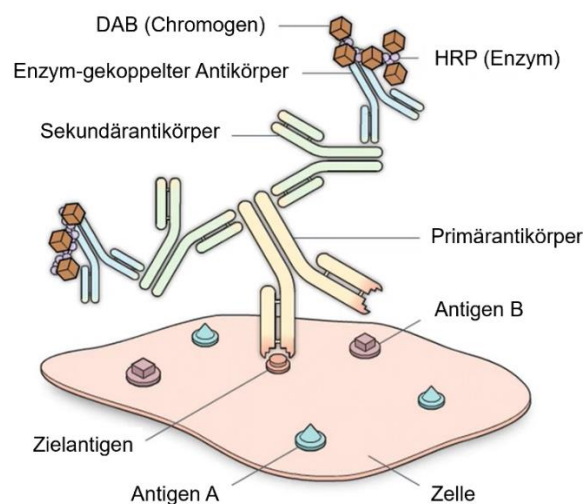


Abbildung 10: Prinzip der immunhistochemischen Methode. Gezeigt ist die Antigenbindung im Rahmen der indirekten Immunhistochemie unter Verwendung eines 2-Schritt-Systems (DAB = Diaminobenzidin, HRP = Meerrettichperoxidase). Modifiziert nach [112] mit Genehmigung von Leica Biosystems

Im Folgenden werden die allgemeinen Schritte zur Herstellung einer immunhistochemischen Färbung skizziert.

Üblicherweise liegen die Präparate zunächst als FFPE-Gewebe vor. Um die Antigene für die Antikörperbindung zugänglich zu machen, muss das Paraffin von den Leerschnitten entfernt werden. Die Objektträger werden hierzu in Xylol geschwenkt und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Zudem müssen die bei der Formalinfixierung zur Verhinderung der Autolyse erzeugten Eiweißvernetzungen und -veränderungen rückgängig gemacht werden. Hierfür kann das Gewebe enzymatisch vorbehandelt werden, häufig mittels Protease- und Trypsinlösungen, wobei die Morphologie dabei leicht Schaden nehmen kann. Verträglicher ist die Applikation von Hitze, während sich die Objektträger in einer Pufferlösung befinden. Nach dieser sogenannten Antigen-demaskierung können die Epitope wieder von den entsprechenden Antikörpern erkannt werden. Allerdings ist vor der Verwendung von HRP-gekoppelten Antikörpern die Hemmung der endogenen Peroxidase notwendig, um unspezifische Hintergrundreaktionen zu verhindern. Hierfür wird meist Wasserstoffperoxid genutzt. Des Weiteren sollten die unspezifischen Bindungsstellen von ähnlich konfigurierten Eiweißmolekülen im Vorfeld durch Anwendung einer Proteinlösung geblockt werden.

Erfolgt die Konjugation der Zielantigene nun bereits mit den Enzym-gekoppelten Antikörpern, spricht man von der direkten Methode der Immunhistochemie. Insbesondere bei spärlicher Antigenexpression ist die Antikörperbindung so jedoch häufig nur schlecht visualisierbar. Zur Verstärkung der Färbeintensität bedient man sich daher meist der indirekten Immunhistochemie. Ein im Gewebe vorliegendes Antigen wird dabei zunächst mit einem unmarkierten Primärantikörper konjugiert. An diesen bindet im zweiten Schritt mindestens ein Sekundärantikörper, der entweder selbst Enzymgekoppelt ist oder als Brückenantikörper für weitere Konjugate dient. Durch die Verwendung mehrstufiger Detektionssysteme potenziert sich die Farbstoffmenge, mit der jedes einzelne Antigen markiert ist. Die Konjugate können zudem aus komplexen Strukturen mit mehreren Enzymen bestehen.

Aufgrund der Relevanz für die vorliegende Arbeit seien an dieser Stelle Polymersysteme erwähnt, welche eine äußerst sensitive und zugleich spezifische Möglichkeit zur Detektion darstellen. Der markierte Antikörper ist dabei mit einem Dextran- oder Polypeptid-Gerüst gekoppelt, an das zahlreiche Enzyme gebunden sind. Ein Beispiel für ein Zwei-Schritt-Polymersystem ist in Abbildung 10 (Seite 28) dargestellt. Das Polymer kann gegebenenfalls weitere Antikörper enthalten.

Im Anschluss an die Immunkomplex-Bildung kann das Gewebe mit dem Chromogen inkubiert werden. Nach erfolgter Enzym-Substrat-Reaktion werden die Objektträger mit Hämatoxylin gegengefärbt, wodurch sich bei der mikroskopischen Auswertung

insbesondere die Zellkerne kontrastreicher darstellen. Zur Konservierung der Präparate wird schließlich ein wässriges Eindeckmedium auf den Objektträger aufgebracht und das Gewebe mit einem dünnen Glasplättchen bedeckt.

Während des Laborprozesses gilt es grundsätzliche Prinzipien zu beachten. So dürfen die entparaffinierten Präparate beispielsweise zu keiner Zeit austrocknen. Zudem muss der pH-Wert des Reaktionsmilieus durch Verwendung von Pufferlösungen stets in einem optimalen Bereich gehalten werden. An definierten Stellen ist darüber hinaus eine gründliche Spülung notwendig, wobei unter Berücksichtigung der speziellen Indikationen Waschpuffer, destilliertes Wasser oder Leistungswasser zum Einsatz kommen. Letzteres ist insbesondere für das sogenannte Bläuen nach der Gegenfärbung mit Hämatoxylin essenziell.

Der genaue Ablauf der immunhistochemischen Färbung variiert je nach untersuchtem Antigen und den verwendeten Reagenzien. Ist die Methode für das zu detektierende Antigen bereits etabliert, kann die Färbung nach den jeweiligen Herstellerangaben vollautomatisch durchgeführt werden.

3.3.2 Spezielles Vorgehen bei Verwendung des Antikörpers 6A10

Der in dieser Arbeit verwendete monoklonale anti-CA XII-Antikörper 6A10 (Tabelle 5) wurde in der *Research Group Therapeutic Antibodies* des HMGU unter der Leitung von Herrn Professor Zeidler entwickelt und von der *Core Facility Monoclonal Antibodies* des HMGU hergestellt. Zum Zeitpunkt der Methodendurchführung befand sich der Antikörper in der präklinischen Validierungsphase. Das für die immunhistochemische Färbung benötigte Reagenz wurde dankenswerterweise vom HMGU zur Verfügung gestellt.

Tabelle 5: Angaben zum verwendeten anti-Carboanhydrase XII-Primärantikörper

Isotyp	Klonalität	Klon	Spezies	Patentnummer
IgG2a kappa	monoklonal	6A10	Ratte	US 9,359,446 B2

Da der Antikörper zuvor noch nie auf Paraffinschnitten eingesetzt worden war, musste im Vorfeld dieser Arbeit von Andrea Sendelhofert und Anja Heier aus dem immunhistochemischen Labor des Pathologischen Instituts der LMU München ein geeignetes Färbeprotokoll erarbeitet werden. Für eine adäquate Färbereaktion wurden die Primärantikörper hoch ankonzentriert verwendet. Deren Detektion erfolgte mit einem Zwei-Schritt-Polymersystem. Durch Positiv- und Negativkontrollen (Systemkontrolle, Isotypkontrolle) wurden Sensitivität und Spezifität der Methode geprüft.

Färbeprotokoll

Die Färbung wurde manuell durchgeführt. Dem nachfolgenden Protokoll ist zu entnehmen, wie mit den Leerschnitten aller Kollektive verfahren wurde:

- | | |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Entparaffinierung und Rehydrierung: | <ul style="list-style-type: none">• Bad in Xylol (2 × 15 min) und absteigender Reihe Ethanol (100 %, 96 %, 70 %; je 5 min in letzter Küvette der jeweiligen Konzentration)• Spülung mit destilliertem Wasser (5 min) |
| Antigendemaskierung: | <ul style="list-style-type: none">• Hitzevorbehandlung in Mikrowelle mit Citratpuffer (pH 6): <i>Target Retrieval Solution</i> (Agilent Technologies, S2369), Verdünnung 1:10 (750 W, 2 × 15 min)• Abkühlphase bei Raumtemperatur (20 min) |
| Spülung und pH-Abgleich: | <ul style="list-style-type: none">• TRIS-Puffer pH 7,5 (2 x 5 min) |
| Blockierung der endogenen Peroxidase: | <ul style="list-style-type: none">• wässriges Wasserstoffperoxid (7,5 %) bei Raumtemperatur (10 min)• fließend wässern mit Leitungswasser (10 min) |
| Spülung und pH-Abgleich: | <ul style="list-style-type: none">• TRIS-Puffer pH 7,5 (2 x 5 min) |
| Blockierung von Proteinen im Gewebe: | <ul style="list-style-type: none">• <i>Protein Block Serum-Free Ready-to-use</i> (Agilent Technologies, X0909) (10 min)• Überstand abkippen |
| Antikörperbindung: | <ul style="list-style-type: none">• Inkubation mit anti-CA XII-Primärantikörpern: Klon 6A10 (Helmholtz Zentrum München) bei Raumtemperatur (60 min), Verdünnung 1:5 mit <i>Antibody Diluent with Background-Reducing Components</i> (Agilent Technologies, S3022)• TRIS-Puffer pH 7,5 mit Brij 35-Lösung (Merck), Verdünnung 1:4 (2 × 5 min)• Detektionssystem: SuperVision 2 Single Species HRP-Polymer Ratte (DCS, PD000POL-R)<ul style="list-style-type: none">- <i>SuperVision 2 Polymer-Enhancer</i> (20 min)- TRIS-Puffer pH 7,5 mit Brij 35-Lösung (Merck), Verdünnung 1:4 (2 × 5 min)- <i>SuperVision 2 Polymer-Reagenz</i> (30 min) |

- Spülung und pH-Abgleich:
 - TRIS-Puffer pH 7,5 mit Brij 35-Lösung (Merck), Verdünnung 1:4 (2 × 5 min)
- Färbung:
 - Chromogen: DAB+ (Agilent Technologies, K3468) mit *DAB+ Chromogen* gelöst in *DAB+ Substrate Buffer* (10 min)
- Spülung:
 - fließend wässern in Leitungswasser (10 min)
- Gegenfärbung:
 - *Hematoxylin Gill's Formula* (Vector) (2 sek)
- Spülung:
 - fließend wässern mit Leitungswasser (10 min)
- Eindeckung:
 - wässriges Eindeckmedium *Aquatex* (Merck); Deckglas 24 × 50 mm (Menzel-Gläser)

3.4 Immunhistochemische Auswertung

Die Beurteilung der CA XII-Expression erfolgte für alle Präparate unter den gleichen Bedingungen an einem Lichtmikroskop (Leica DM2500).

Für die semiquantitative Auswertung der Farbreaktion wurde der Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele [113] verwendet. Hierbei werden der Prozentsatz positiver Zellen (PP) sowie die vorherrschende Färbeintensität (SI) wie in Tabelle 6 dargestellt kodiert. Die Punktzahlen von PP (PP 0–4) und SI (SI 0–3) werden anschließend multipliziert, wodurch sich ein IRS-Wert zwischen 0 und 12 ergibt.

Tabelle 6: Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele [113] – Darstellung der möglichen IRS-Werte sowie der zugrundeliegenden Kodierung für den Prozentsatz positiver Zellen (PP) und die vorherrschenden Färbeintensität (SI). Es gilt: $IRS = PP \times SI$

SI PP	0: keine Färbung	1: schwache Färbung	2: mäßige Färbung	3: starke Färbung
0: keine Färbung	IRS 0	IRS 0	IRS 0	IRS 0
1: < 10 %	IRS 0	IRS 1	IRS 2	IRS 3
2: 10 – 50 %	IRS 0	IRS 2	IRS 4	IRS 6
3: 51 – 80 %	IRS 0	IRS 3	IRS 6	IRS 9
4: > 80 %	IRS 0	IRS 4	IRS 8	IRS 12

Ursprünglich wurde dieses Bewertungssystem für den immunhistochemischen Nachweis des ER in Mammakarzinomen etabliert, jedoch hat sich der IRS auch zur Expressionsanalyse anderer Antigene bewährt.

In der vorliegenden Arbeit sollten detailliertere Informationen zum Expressionsprofil des Enzyms generiert werden. Berücksichtigt wurden alle subzellulären Lokalisationen. Angelehnt an die von den Autoren Remmele und Stegner im Jahr 1987 publizierte

Vereinbarung zum Umfang der Befundmitteilung [113] wurde ergänzend zum IRS der PP in 10 %-Schritten sowie der Prozentsatz der stark positiven Zellen dokumentiert. Zudem wurde das Färbemuster der Zellen und die Heterogenität der Färbung notiert. Zur übersichtlichen Abbildung einer steigenden Expression wurden die IRS-Werte vierstufig gruppiert (IRS 0–2, 3–4, 6–8, 9–12). Um Fälle mit sehr geringer beziehungsweise sehr hoher CA XII-Expression näher zu untersuchen, wurde der IRS als dichotome Variable mit dem Grenzwert (*Cut-off-Wert*) $IRS > 2$ beziehungsweise $IRS > 8$ verwendet. Zusätzlich wurden die zugrundeliegenden PP- und SI-Werte in die Interpretation einbezogen.

Die Fotos der Präparate wurden mithilfe eines elektronischen Mikroskops (Leica DMD108) erstellt.

3.5 Statistische Auswertung

Für die Analyse und Visualisierung der Daten wurde das Statistikprogramm *SPSS* (IBM, Versionen 26 und 29) sowie das Präsentationsprogramm *PowerPoint* (Microsoft) verwendet.

In den jeweiligen Kollektiven erfolgte die Statistik zunächst deskriptiv. Mithilfe von Kontingenztabelle wurde die Verteilung der CA XII-Expressionsparameter zwischen den Ausprägungen der klinisch-pathologischen Merkmale untersucht.

Alle analysierten Stichproben waren aus medizinischer und statistischer Sicht unabhängig. Da für die untersuchten Variablen keine Normalverteilung vorlag, wurde auf nicht-parametrische Methoden zurückgegriffen. Variablen mit weniger als zehn möglichen Merkmalsausprägungen wurden als nominalskaliert betrachtet.

Der Zusammenhang von zwei dichotomen Variablen wurde stets mithilfe des exakten Fisher-Yates-Tests (FYT) untersucht. Für Kontingenztabelle mit mehr als 2×2 Zellen kam der exakte Fisher-Freeman-Halton-Test (FFHT) zur Anwendung, sofern die analysierte Stichprobe weniger als 20 Fälle enthielt oder die erwartete Häufigkeit in mindestens einer Zelle unter 5 lag. Bei größeren Stichproben mit einer minimalen erwarteten Häufigkeit von 5 wurde der Pearson-Chi-Quadrat-Test (χ^2) verwendet, wobei Stichprobengrößen zwischen 20 und 60 der Yates-Korrektur unterlagen.

Statistische Omnibus-Tests wurden nur für Kontingenztabelle mit maximal 4×4 Zellen durchgeführt.

Aufgrund des hypothesengenerierenden Charakters bei einer Vielzahl von Tests wurde in der vorliegenden Arbeit bei einer lokalen Überschreitungswahrscheinlichkeit (p) $< 0,05$ von statistisch auffälligen Ergebnissen gesprochen. Getestet wurde stets zweiseitig.

Cramér's V (V) diene zur Quantifizierung der Effektstärke und wurde ungeachtet des p -Wertes berechnet. Bei möglichen Werten zwischen 0 und 1 gilt $V=0,1$ als schwacher, $V=0,3$ als mittlerer und $V=0,5$ als starker Zusammenhang.

Zur weiterführenden Analyse bei statistischer Auffälligkeit im Omnibus-Test sowie allgemein zur besseren Einordnung der beobachteten Zellenhäufigkeiten wurde für jede Tabellenzelle das korrigierte Residuum (kR) mit ausgegeben. Negative Werte weisen dabei auf eine schwächere, positive Werte auf eine stärkere Zellenbesetzung hin, als man im Falle statistischer Unabhängigkeit zwischen der Zeilen- und Spaltenvariable erwarten würde. Die korrigierten Residuen berücksichtigen den Stichprobenumfang und können als z -Werte interpretiert werden. Bei einem lokalen $p < 0,05$ gelten sie ab dem Betragswert $|1,96|$ als statistisch auffällig.

Für die Überlebensanalysen wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt. Unterschiede des Kurvenverlaufs wurden mittels Log-rank-Test untersucht, der wiederum einer Chi-Quadrat-Verteilung (χ^2) folgt. 95 %-Konfidenzintervalle wurden verwendet, um spezifische Endpunkte zu vergleichen [114].

3.6 Index der verwendeten Software, Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

In der linken Spalte der nachfolgenden Auflistung sind die Bezeichnungen der verwendeten Produkte zu finden. Rechts ist der jeweilige Hersteller beziehungsweise Vertrieb angegeben.

Software

- Leica DMD108 Leica Microsystems (Wetzlar, DE)
- Literaturverwaltungsprogramm, EndNote™ Clarivate Analytics (London, UK)
- PathoPro ifms (Saarbrücken, DE)
- Präsentationsprogramm, Microsoft PowerPoint Microsoft (Redmond, US)
- SPSS Statistics IBM (New York, US)
- Textverarbeitungsprogramm, Microsoft Word Microsoft (Redmond, US)

Geräte

- Brutschrank Memmert (Schwabach, DE)
- Digitales Mikroskop, Leica DMD108 Leica Microsystems (Wetzlar, DE)

Material und Methoden

- Gefrierschrank Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)
- Kühlschrank AEG (Nürnberg, DE),
GRAM (Vojens, DK)
- Lichtmikroskop, Leica DM2500 Leica Microsystems (Wetzlar, DE)
- Magnetrührer, IKAMAG® RCT IKA (Staufen, DE)
- Mikrowelle Miele (Gütersloh, DE)
- pH-Meter WTW (Weilheim, DE)
- Pipetten, Eppendorf Research® Eppendorf (Hamburg, DE)
- Reagenzglasschüttler, Vortex Genie 2™ Bender & Hobein (Zürich, CH)
- Schlittenmikrotom pfm medical (Köln, DE)
- Tischabzug Köttermann (Uetze, DE)
- Waage Sartorius (Göttingen, DE)
- Wasserbad MEDAX Nagel (Kiel, DE)

Verbrauchsmaterialien

- Adhäsionsobjektträger, Q Path® VWR International (Radnor, US)
- Adhäsionsobjektträger, TOMO® Engelbrecht (Edermünde, DE)
- Deckgläser (24 × 50 mm) Menzel-Gläser (Braunschweig, DE)
- Eindeckmedium, Aquatex® Merck (Darmstadt, DE)
- Eppendorfgefäße (1,5 ml; 5 ml; 2 ml) Eppendorf (Hamburg, DE)
- Färbegestell, DURAN® DWK Life Sciences (Wertheim, DE)
- Färbekammern mit Deckel Bestand des Pathologischen Instituts
der LMU München
- Färbekästen mit Deckel Carl Roth (Karlsruhe, DE)
- Färbetrog mit Einsatz Kartell Labware (Noviglio, IT)
- Filterpapier Bestand des Pathologischen Instituts
der LMU München
- Glasküvetten Bestand des Pathologischen Instituts
der LMU München
- Messzylinder, DURAN® (250 ml) DWK Life Sciences (Wertheim, DE)
- Messzylinder, SIMAX® (250 ml) Kavalierglass (Sázava, CZ)
- Pipettenspitzen, epT.I.P.S.® Standard
(100 µl, 1000 µl, 5000 µl) Eppendorf (Hamburg, DE)

Chemikalien

- Antibody Diluent with Background-
Reducing Components, S3022 Agilent Technologies (Santa Clara, US)
- Anti-CA XII-Antikörper, Klon 6A10 HMGU (Neuherberg, DE)

- Aqua dest. (destilliertes Wasser) Apotheke Innenstadt LMU (München, DE)
- Brij® 35-Lösung Merck (Darmstadt, DE)
- DAB+ Chromogen, K3468 Agilent Technologies (Santa Clara, US)
- DAB+ Substrate Buffer, K3468 Agilent Technologies (Santa Clara, US)
- Ethanol (100 %; 96 %; 70 %) Apotheke Innenstadt LMU (München, DE)
- Hematoxylin Gill's Formula, H3401 Vector Laboratories (Newark, US)
- Protein Block Serum-Free Ready-to-use, X0909 Agilent Technologies (Santa Clara, US)
- SuperVision 2 Enhancer (Ratte) DCS (Hamburg, DE)
- SuperVision 2 Polymer – HRP (Ratte) DCS (Hamburg, DE)
- Target Retrieval Solution, S2369 Agilent Technologies (Santa Clara, US)
- Wasserstoffperoxid (30 %) Carl Roth (Karlsruhe, DE)
- Xylol Apotheke Innenstadt LMU (München, DE)
- 0,05 M TRIS-Puffer pH 7,5
 - 34,25 g Trizma®-Hydrochlorid Merck (Darmstadt, DE)
 - 43,90 g Sodium Chloride Merck (Darmstadt, DE)
 - 4,50 g Trizma®-Base Merck (Darmstadt, DE)
 - 5,00 L Aqua dest. Apotheke Innenstadt LMU (München, DE)

4 Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung aufgeführt. Nach Beschreibung der Färbung erfolgt die Darstellung der Resultate aus der statistischen Datenanalyse. Im Unterkapitel 4.3 werden schließlich die Kollektive hinsichtlich der Höhe ihrer CA XII-Expression verglichen.

Die histopathologischen und klinischen Charakteristika der analysierten Fälle sind in Kapitel 3.1 bei den jeweiligen Patientenkollektiven zu finden.

Es sei an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, dass Teilaspekte der Arbeit bereits veröffentlicht wurden (siehe Publikationsliste, Seite 113).

4.1 Karzinomkollektive

4.1.1 Kollektivübergreifende Beobachtungen zum CA XII-Expressionsprofil

In beiden Karzinomkollektiven wies meist ein Großteil der vorliegenden Tumorzellen eine deutliche Immunfärbung auf (Abbildung 11).

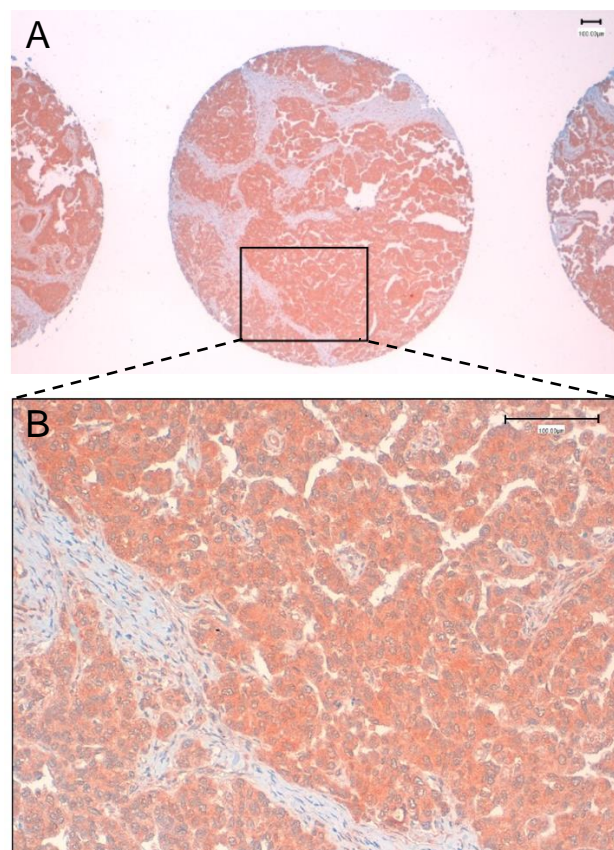


Abbildung 11: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in einem Ovarialkarzinom. Vorliegende Gewebestanzungen einer Patientin [A] (40-fach vergrößert) und Detailaufnahme [B] (200-fach vergrößert), Maßstabsleiste: 100 µm

Dabei zeigten die positiven Zellen in beinahe allen Präparaten ein zytoplasmatisches Signal. Insbesondere bei schwächerer beziehungsweise unvollständiger Zytoplasmafärbung war in vielen Fällen eine zusätzliche membranöse Expression erkennbar (Abbildung 12 A). Teils fand sich diese jedoch nur in einzelnen Zellen oder bei Variation der Schnittebene durch Fokussierung am Lichtmikroskop. Eine ausschließliche Membranfärbung aller positiver Tumorzellen lag in keinem Karzinom vor. Mitunter entstand der Eindruck eines perinukleär betonten Immunsignals. Der Zellkern erschien häufig ebenfalls gefärbt (Abbildung 12 B). Eine vorwiegend nukleäre Färbung wurde sehr selten beobachtet.

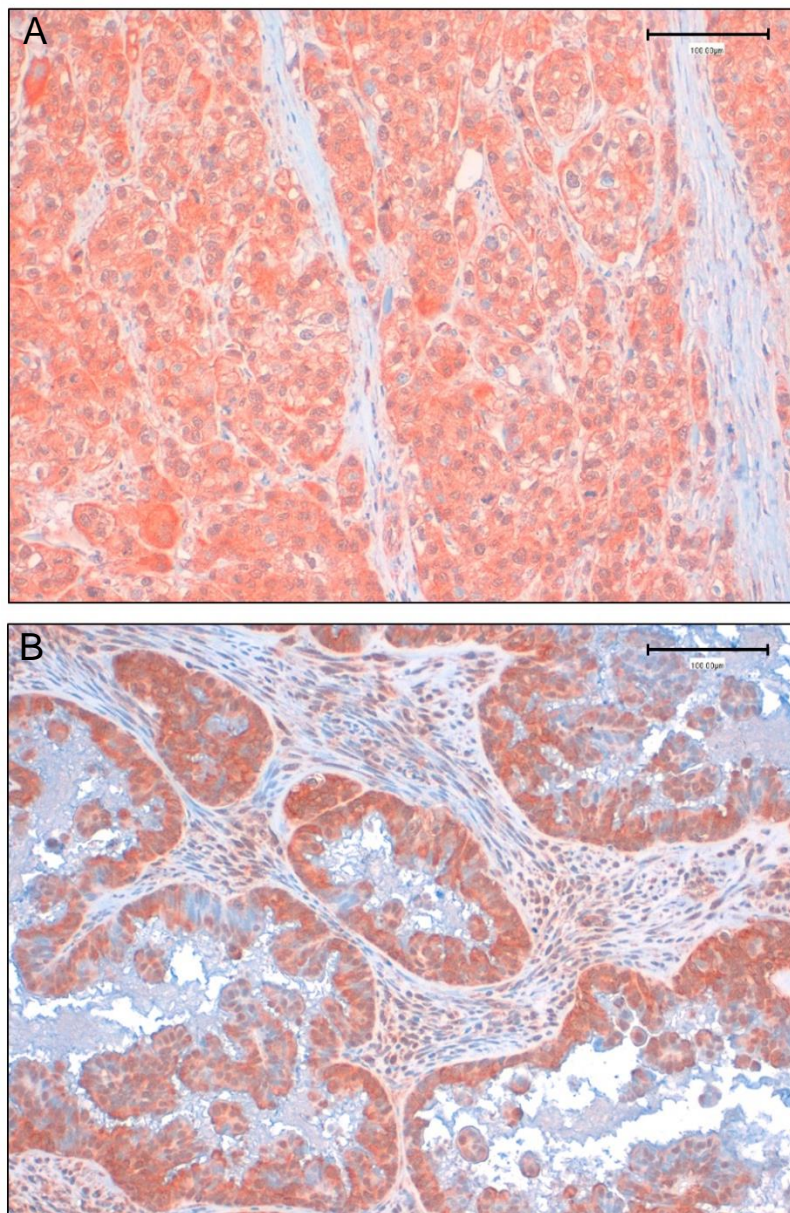


Abbildung 12: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in einem Harnblasenkarzinom [A] und einem Ovarialkarzinom [B] (je 200-fach vergrößert), Maßstabsleiste: 100 µm

Die meist prominente Zytoplasmafärbung erschwerte die Detektion und Quantifizierung der membranösen sowie der nukleären Expression. Eine getrennte Auswertung der subzellulären Lokalisationen konnte daher nicht zuverlässig durchgeführt werden.

Das gleichzeitige Vorliegen verschiedener Färbemuster und -intensitäten führte zu teils deutlich heterogenen Präparaten. Dagegen wiesen andere Karzinome ausgesprochen gleichmäßig gefärbte Tumorzellen auf (Abbildung 13). Zum Teil fanden sich auch einzelne Zellen mit abweichender Färbung in sonst homogenem Tumorgewebe.

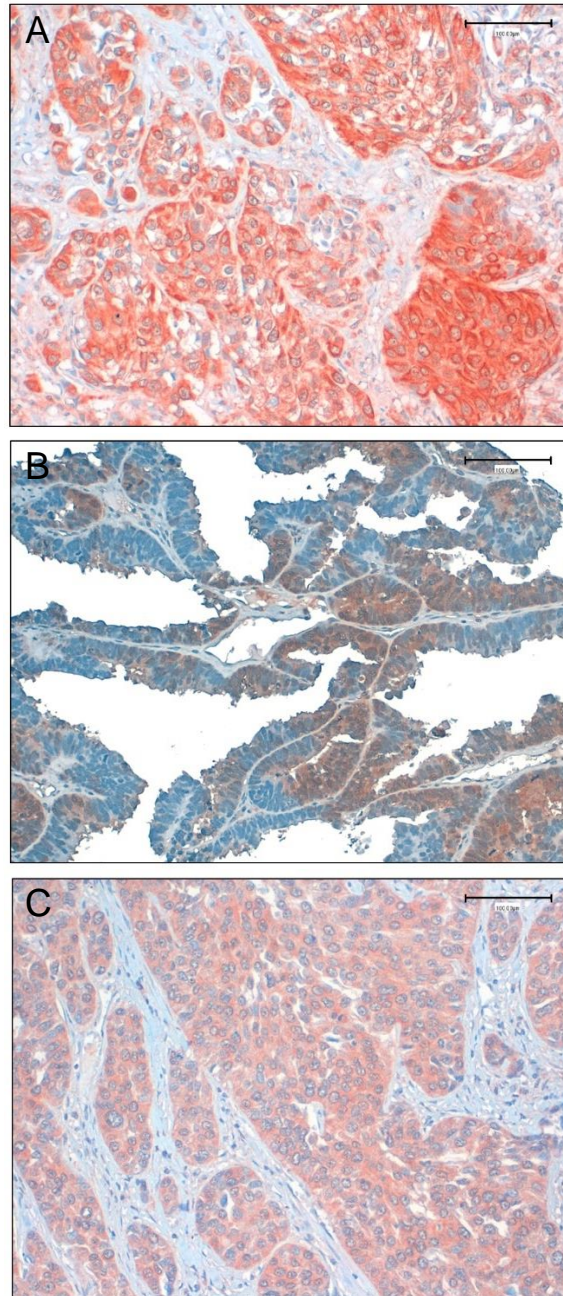


Abbildung 13: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in zwei Harnblasenkarzinomen [A, C] und einem Ovarialkarzinom [B] (je 200-fach vergrößert), Maßstabsleiste: 100 μ m

Augenscheinlich bestand in den Präparaten keine Abhängigkeit der Färbung vom Ausmaß der Gewebehypoxie. So hatte der Abstand zu Blutgefäßen keinen erkennbaren Einfluss auf die Färbung der Zellen. Ebenso waren die an eine Nekrose angrenzenden Tumorzellen im Allgemeinen nicht anders gefärbt als die weiter entfernt liegenden Zellen.

Die Tumorzellen hoben sich aufgrund ihrer Färbung in den allermeisten Fällen vom angrenzenden Stroma ab. In manchen Präparaten waren auch Stromakomponenten gefärbt (Abbildung 12 B sowie Abbildung 14 A und C). Hierzu zählten beispielsweise Immunzellen wie Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen. Teils fand sich eine diffuse Färbung von Fibroblasten, glatten Muskelzellen (Gefäßwand, Detrusormuskulatur) und peripheren Nervenfasern. Gefärbt waren auch Perikaryen von Ganglienzellen sowie Verkalkungen, wie sie unter anderem in Ovarialkarzinomen in Form von sogenannten Psammomkörpern vorkommen können (Abbildung 14 B). Ansammlungen von Farbstoff fanden sich zudem intraluminal und im Bereich von Extravasaten. Erythrozyten blieben dabei stets ungefärbt (Abbildung 14 C). Ausgespart blieben beispielsweise auch Muzine und Glykogenvakuolen.

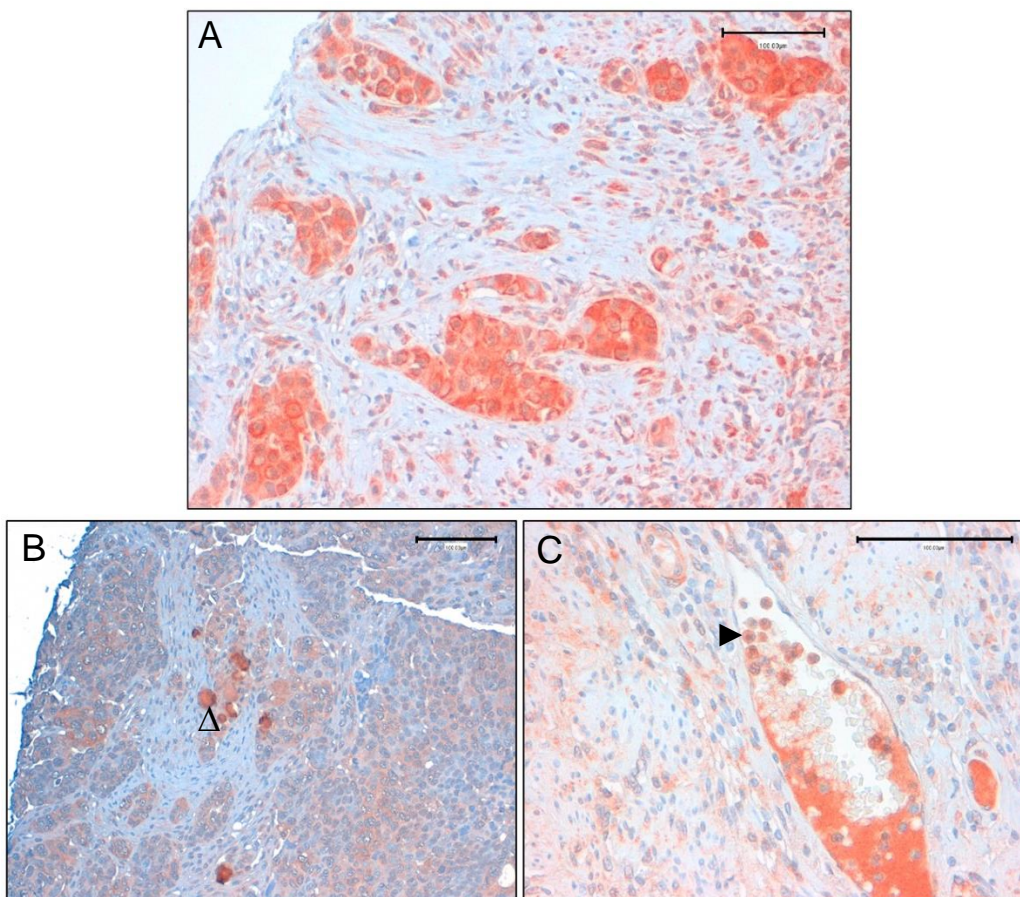


Abbildung 14: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in Harnblasen- [A] und Ovarialkarzinomzellen [B]. Zusätzliche Anfärbung von Stromakomponenten ([A] 200-fach vergrößert, [C] 400-fach vergrößert), Psammomkörpern (Δ) [B] (200-fach vergrößert) und intraluminal lokalisierten neutrophilen Granulozyten (▶) [C], Maßstabsleiste: 100 µm

4.1.2 CA XII-Expression in den Ovarialkarzinomen

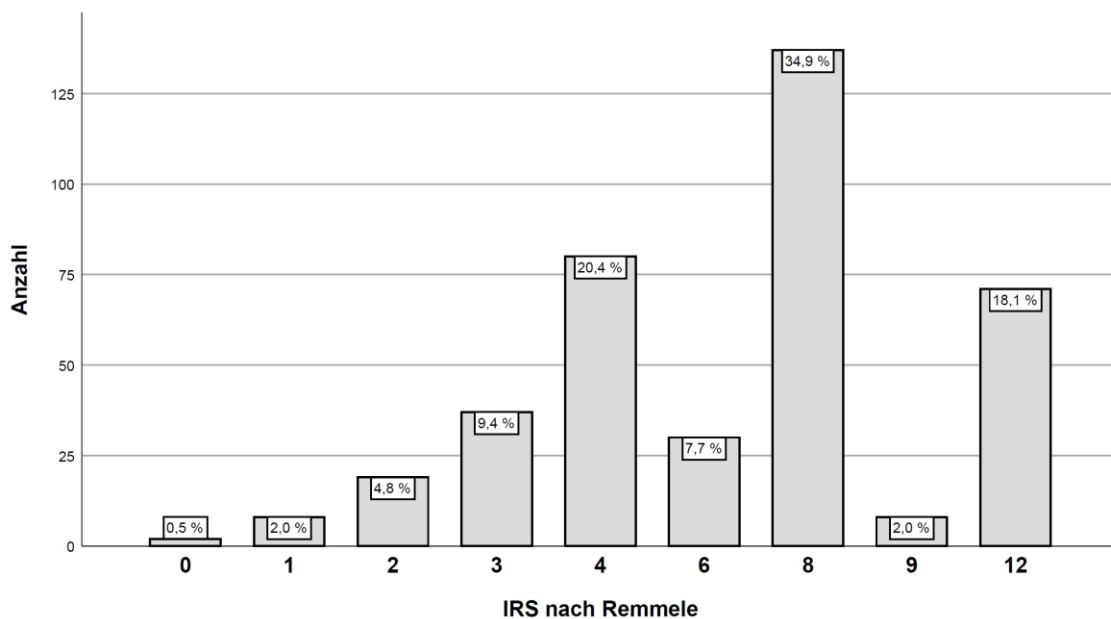
Deskriptive Statistik

Abbildung 15: Carboanhydrase XII-Expression im Ovarialkarzinomkollektiv ($n = 392$) – absolute und relative Häufigkeiten der Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

Abbildung 15 veranschaulicht die Verteilung der IRS-Werte im Ovarialkarzinomkollektiv. Bei 390 (99,5 %) der 392 auswertbaren Fälle zeigte sich eine Färbung der Tumorzellen. Meist (72,2 %) waren mehr als 80 % der vorliegenden Zellen gefärbt (Tabelle 7 A). Die vorherrschende Färbeintensität wurde am häufigsten (44,1 %) als mäßig stark bewertet (Tabelle 7 B). Modus und Median lagen bei IRS 8. Alle Werte des IRS von 0 bis 12 waren im Kollektiv vertreten. Nur ein kleiner Teil (7,4 %) der Präparate wies einen IRS ≤ 2 auf (29 von 392 Fällen). Ein IRS > 8 wurde bei 79 Karzinomen (20,2 %) beobachtet. In 272 Fällen (69,4 %) waren stark gefärbte Tumorzellen vorhanden. Diese traten meist (52,6 %) fokal in zusammengenommen weniger als 10 % der Zellen auf.

Bei 220 Fällen (56,1 %) zeigten die aus dem gleichen Karzinom stammenden Gewebeproben eine ähnliche Färbung. Die TMAs von 127 Fällen (32,4 %) waren dagegen auffallend unterschiedlich gefärbt (Abbildung 16). 45 Fälle (11,5 %) wiesen zu wenig Gewebe für einen Vergleich auf.

Innerhalb der einzelnen TMAs fand sich bei 208 Fällen (53,1 %) eine gleichmäßige Färbung, wohingegen in 175 Fällen (44,6 %) eine heterogene Färbung der Tumorzellen auffiel. 9 Fälle (2,3 %) waren diesbezüglich nicht auswertbar.

Tabelle 7: Carboanhydrase XII-Expression im Ovarialkarzinomkollektiv – absolute (*n*) und relative Häufigkeiten für den Anteil der gefärbten Zellen [**A**] und die vorherrschende Färbeintensität [**B**], kodiert nach Remmele

A				B			
Prozentsatz positiver Zellen		<i>n</i>	(%)	vorherrschende Färbeintensität		<i>n</i>	(%)
PP 0	0 %	2	(0,5)	SI 0	keine Färbung	2	(0,5)
PP 1	1-9 %	10	(2,6)	SI 1	schwach	137	(34,9)
PP 2	10-20 %	8	(2,0)	SI 2	mäßig	173	(44,1)
	21-30 %	2	(0,5)	SI 3	stark	80	(20,4)
	31-40 %	2	(0,5)				
	41-50 %	11	(2,8)				
PP 3	51-60 %	20	(5,1)	Σ		392	(100,0)
	61-70 %	15	(3,8)				
	71-80 %	39	(9,9)				
PP 4	81-90 %	96	(24,5)				
	91-100 %	187	(47,7)				
Σ		392	(100,0)				

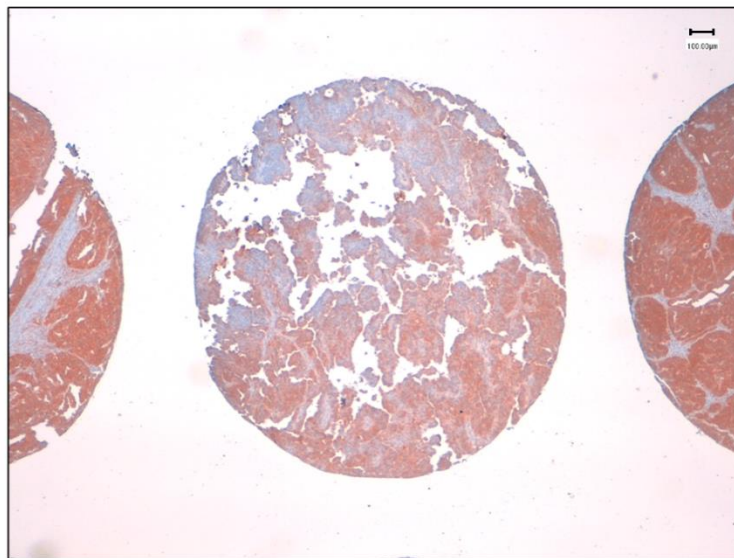


Abbildung 16: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII im Tumorgewebe einer Ovarialkarzinompatientin. Heterogenität der Immunfärbung zwischen den vorliegenden Gewebestanzungen eines Falles (40-fach vergrößert), Maßstabsleiste: 100 µm

Kontingenzanalysen

Die Hypothese eines Zusammenhanges zwischen der CA XII-Expression und der Tumoraggressivität wurde zunächst am Gesamtkollektiv (*n* = 392) getestet.

In Tabelle 8 ist die Verteilung der gruppierten IRS-Werte in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades dargestellt (FFHT = 14,149; *p* = 0,023; *V* = 0,127).

Tabelle 8: Kontingenz der Merkmalsausprägungen von Tumorgraduierung (G) und Carboanhydrase XII-Expression im Ovarialkarzinomkollektiv (n = 392) – absolute (n) und relative Häufigkeiten für die gruppierten Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

		IRS 0-2	IRS 3-4	IRS 6-8	IRS 9-12	Σ
G1	n	6	18	30	3	57
	(%)	(10,5)	(31,6)	(52,6)	(5,3)	(100,0)
G2	n	2	9	14	3	28
	(%)	(7,1)	(32,1)	(50,0)	(10,7)	(100,0)
G3	n	21	89	120	71	301
	(%)	(7,0)	(29,6)	(39,9)	(23,6)	(100,0)

Ein hoher Anteil positiver Tumorzellen (PP 4) fand sich prozentual häufiger in geringer differenzierten Ovarialkarzinomen (G1: 63,2 %; G2: 71,4 %; G3: 73,8 %). Eine geringere Differenzierung ging zudem mit einem höheren Prozentsatz an vorherrschend starker Färbung einher (G1: 5,3 %; G2: 10,7 %; G3: 23,9 %). In keinem der 57 gut differenzierten Karzinome (0,0 %) wurde die CA XII-Expression mit dem Höchstwert IRS 12 bewertet. Dagegen zeigten 66 der 301 gering differenzierten Karzinome (21,9 %) einen IRS 12. Infolgedessen war die Gruppe IRS 9–12 bei den G3-Karzinomen statistisch überrepräsentiert (kR: +3,4) und die Verteilung für den *Cut-off* IRS > 8 auffallend unterschiedlich ($\chi^2(2, n = 386) = 11,690$; $p = 0,003$; $V = 0,174$). Dies traf auch bei Stratifizierung nach FIGO III (häufigstes Tumorstadium mit $n = 265$) zu (FFHT = 7,922; $p = 0,015$; $V = 0,166$) (Tabelle 9). Der Effekt wurde als schwach quantifiziert und durch den Expressionsunterschied zwischen den G1- und den G3-Karzinomen hervorgerufen. Für den *Cut-off* IRS > 2 zeigte sich kein statistisch auffälliger Unterschied zwischen den *Grading*-Kategorien (FFHT = 1,104; $p = 0,596$; $V = 0,048$).

Tabelle 9: Kontingenz der Merkmalsausprägungen von Tumorgraduierung (G) und Carboanhydrase XII-Expression innerhalb der FIGO III-Ovarialkarzinome (n = 265) – absolute (n) und relative Häufigkeiten für den *Cut-off*-Wert 8 des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

		IRS ≤ 8	IRS > 8	Σ
G1	n	27	1	28
	(%)	(96,4)	(3,6)	(100,0)
G2	n	8	1	9
	(%)	(88,9)	(11,1)	(100,0)
G3	n	171	57	228
	(%)	(75,0)	(25,0)	(100,0)

Abbildung 17 zeigt beispielhaft die Expression von CA XII in verschiedenen histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms.

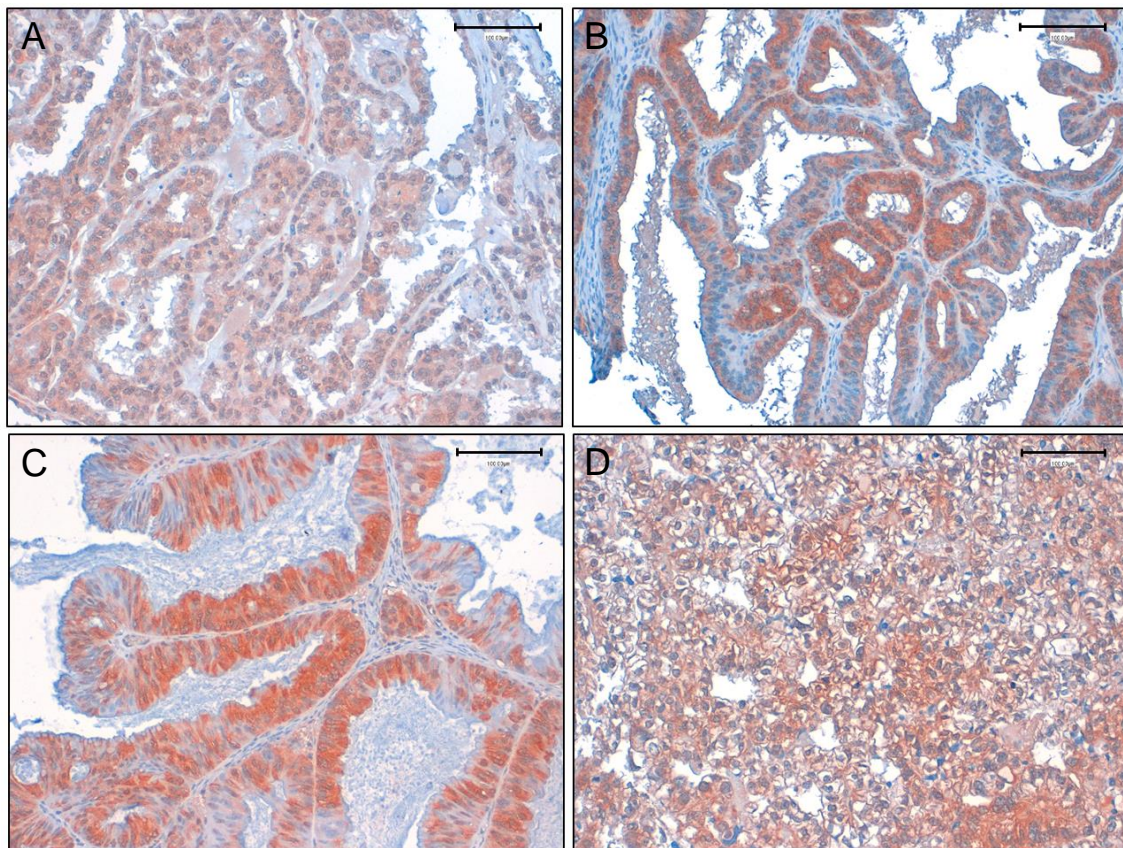


Abbildung 17: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in verschiedenen histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms. Low-grade seröses [A], endometrioides [B], muzinöses [C] und klarzelliges [D] Karzinom (je 200-fach vergrößert), Maßstabsleiste: 100 μ m

Von allen im Kollektiv vertretenen histologischen Subtypen lagen Präparate mit deutlicher CA XII-Expression vor. Die gruppierten IRS-Werte sind in Tabelle 10 aufgeführt. Es sei hierbei auf die in Kapitel 3.1.1 gezeigte Abbildung 5 zur Tumordgraduierung innerhalb der einzelnen Subtypen hingewiesen. Die seromuzinösen Karzinome und die muzinösen Karzinome enthielten tendenziell mehr ungefärbte Tumorzellen (PP \leq 3: 75,0 % und 41,2 %) und zeigten prozentual häufiger (75,0 % und 47,1 %) eine vorherrschend schwache Färbeintensität als die übrigen Ovarialkarzinome. Bei allen klarzelligen Karzinomen (100,0 %) lag der Anteil positiver Tumorzellen über 80 % (kR: + 2,5). Die relative Häufigkeit einer vorherrschend starken Färbeintensität war bei den undifferenzierten Karzinomen (25,0 %) und den HGSOCS (24,7 %) am größten (kR: + 0,3 beziehungsweise + 3,4).

Der Vergleich der beiden histologischen Subtypen mit seröser Zellmorphologie ergab, entsprechend der beschriebenen Assoziation zwischen CA XII-Expression und Tumordgrad, eine unterschiedliche Verteilung der gruppierten IRS-Werte (FFHT = 11,678; $p=0,007$; $V=0,190$). Sehr hohe Werte fanden sich bei den HGSOCS statistisch auffallend häufiger als bei den LGSOCs (FYT für den *Cut-off* IRS > 8: $p=0,004$;

V=0,158). Eine sehr niedrige Expression war dagegen in beiden Subtypen ähnlich häufig (FYT für den *Cut-off* IRS > 2: $p > 0,999$; V=0,028).

Tabelle 10: Kontingenz der Merkmalsausprägungen von Tumorhistologie und Carboanhydrase XII-Expression im Ovarialkarzinomkollektiv (n = 388) – absolute (n) und relative Häufigkeiten für die gruppierten Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

		IRS 0-2	IRS 3-4	IRS 6-8	IRS 9-12	Σ
LGSOC	n	2	11	25	2	40
	(%)	(5,0)	(27,5)	(62,5)	(5,0)	(100,0)
HGSOC	n	19	80	103	65	267
	(%)	(7,1)	(30,0)	(38,6)	(24,3)	(100,0)
endometrioid	n	2	11	21	3	37
	(%)	(5,4)	(29,7)	(56,8)	(8,1)	(100,0)
muzinös	n	4	6	4	3	17
	(%)	(23,5)	(35,3)	(23,5)	(17,6)	(100,0)
seromuzinös	n	1	2	1	0	4
	(%)	(25,0)	(50,0)	(25,0)	(0,0)	(100,0)
klarzellig	n	0	5	8	2	15
	(%)	(0,0)	(33,3)	(53,3)	(13,3)	(100,0)
undifferenziert	n	1	1	4	2	8
	(%)	(12,5)	(12,5)	(50,0)	(25,0)	(100,0)

Um konfundierende Faktoren zu reduzieren, wurde die Assoziation der CA XII-Expression mit weiteren klinischen-pathologischen Parametern im Folgenden an der Subgruppe der HGSOCs (n=267) untersucht. In der rechten Spalte der jeweiligen Kontingenztabelle ist die Häufigkeit der Merkmalsausprägungen im stratifizierten Kollektiv angegeben (Tabelle 11 A-D).

Tabelle 11 A zeigt die Verteilung der gruppierten IRS-Werte innerhalb der FIGO-Tumorstadien (FFHT = 13,542; $p = 0,102$; V = 0,131). Bei den FIGO I-Karzinomen war der prozentuale Anteil einer sehr hohen Expression (IRS 9–12) mit 42,9 % am größten. In 13 der 14 Karzinome (92,9 %) waren über 80 % der Tumorzellen gefärbt (kR: + 1,8). 2 Fälle (14,3 %) wiesen eine vorherrschend schwache Färbeintensität auf (kR: - 1,6). Demgegenüber waren 17 von 29 FIGO IV-Karzinomen (58,6 %) vorherrschend schwach gefärbt (kR: + 2,9). Ein IRS 12 fand sich hier nur in 2 Fällen (6,9 %). Allerdings lag keine stetige Änderung der CA XII-Expression zwischen den Tumorstadien vor. Die prozentuale Häufigkeit sehr niedriger IRS-Werte war bei FIGO II am größten (kR: + 1,2) (*Cut-off* IRS > 2: FFHT = 2,877; $p = 0,313$; V = 0,105). Für die sehr hohen Werte zeigte sich die deutlichste Abweichung des korrigierten Residuums bei FIGO IV (kR: - 2,3) (*Cut-off* IRS > 8: FFHT = 8,479; $p = 0,031$; V = 0,177).

Tabelle 11: Kontingenz der Merkmalsausprägungen von FIGO-Tumorstadium [A] beziehungsweise von den einzelnen Komponenten der TNM-Klassifikation [B-D] und Carboanhydrase XII-Expression innerhalb der high-grade serösen Ovarialkarzinome – absolute (*n*) und relative Häufigkeiten für die gruppierten Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

			IRS 0-2	IRS 3-4	IRS 6-8	IRS 9-12	Σ	
A	FIGO-Stadium	I	<i>n</i> (%)	0 (0,0)	2 (14,3)	6 (42,9)	6 (42,9)	14 (100,0)
		II	<i>n</i> (%)	2 (15,4)	4 (30,8)	5 (38,5)	2 (15,4)	13 (100,0)
		III	<i>n</i> (%)	14 (6,7)	60 (28,7)	81 (38,8)	54 (25,8)	209 (100,0)
		IV	<i>n</i> (%)	3 (10,3)	14 (48,3)	10 (34,5)	2 (6,9)	29 (100,0)
		Σ						265
B	Ausdehnung des Primärtumors	T1	<i>n</i> (%)	0 (0,0)	5 (26,3)	8 (42,1)	6 (31,6)	19 (100,0)
		T2	<i>n</i> (%)	2 (11,1)	6 (33,3)	8 (44,4)	2 (11,1)	18 (100,0)
		T3	<i>n</i> (%)	17 (7,5)	69 (30,5)	85 (37,6)	55 (24,3)	226 (100,0)
		Σ						263
C	Lymphknoten-status	N0	<i>n</i> (%)	6 (9,0)	18 (26,9)	24 (35,8)	19 (28,4)	67 (100,0)
		N1	<i>n</i> (%)	7 (8,0)	24 (27,6)	36 (41,4)	20 (23,0)	87 (100,0)
		NX / fehlend	<i>n</i> (%)	6 (5,3)	38 (33,6)	43 (38,1)	26 (23,0)	113 (100,0)
		Σ						267
D	Fernmetastasen	M0	<i>n</i> (%)	0 (0,0)	2 (28,6)	3 (42,9)	2 (28,6)	7 (100,0)
		M1	<i>n</i> (%)	3 (10,3)	14 (48,3)	10 (34,5)	2 (6,9)	29 (100,0)
		MX / fehlend	<i>n</i> (%)	16 (6,9)	64 (27,7)	90 (39,0)	61 (26,4)	231 (100,0)
		Σ						267

Ergänzend wurden die einzelnen Komponenten der TNM-Klassifikation analysiert. Sowohl eine vorherrschend starke Färbintensität als auch ein hoher Anteil CA XII-positiver Tumorzellen (PP 4) traten prozentual häufiger bei den T1-Karzinomen auf (kR: +0,8 beziehungsweise +1,2). Die IRS-Werte 0–2 waren in der T1-Kategorie unterrepräsentiert, während in der T2-Kategorie die Werte 9–12 unterrepräsentiert waren (kR: je - 1,3) (gruppiertes IRS: FFHT = 3,792; $p = 0,698$; $V = 0,086$) (Tabelle 11 B).

Weder für den *Cut-off* IRS > 2 (FFHT = 1,662; $p = 0,374$; $V = 0,085$) noch für den *Cut-off* IRS > 8 (FFHT = 2,193; $p = 0,349$; $V = 0,093$) zeigte sich ein statistisch auffälliger Expressionsunterschied.

Bezüglich des Lymphknotenstatus wurde ebenfalls keine statistisch auffällige Verteilung der gruppierten IRS-Werte beobachtet (FHT = 2,854; $p = 0,835$; $V = 0,072$) (Tabelle 11 C). Tabelle 11 D zeigt die Häufigkeitsverteilung der gruppierten IRS-Werte bezüglich des Vorliegens von Fernmetastasen (FFHT = 9,110; $p = 0,122$; $V = 0,129$). Ein IRS 9–12 fand sich prozentual etwas häufiger bei N0- und bei M0-Karzinomen (kR: + 0,9 beziehungsweise + 0,3). Zwischen dem Lymphknotenstatus und den *Cut-off*-Werten IRS > 2 (FFHT = 1,156; $p = 0,596$; $V = 0,062$) und IRS > 8 ($\chi^2(2, n = 267) = 0,782$; $p = 0,676$; $V = 0,054$) sowie zwischen dem Vorliegen von Fernmetastasen und dem *Cut-off* IRS > 2 (FFHT = 0,755; $p = 0,676$; $V = 0,061$) wurde kein statistisch auffälliger Zusammenhang gefunden. Für den *Cut-off* IRS > 8 fiel bei der M-Klassifikation ein CA XII-Expressionsunterschied auf (FFHT = 6,028; $p = 0,043$; $V = 0,142$), wobei sehr hohe IRS-Werte in den Fällen mit bekannten Fernmetastasen unterrepräsentiert waren (kR: - 2,3). Im Einzelvergleich von den als M0 und den als M1 klassifizierten Karzinomen ergab sich ebenfalls eine schwache Effektstärke (FYT: $p = 0,163$; $V = 0,273$). Es sei allerdings darauf hingewiesen, dass nur in wenigen Fällen eine eindeutige Angabe möglich war (M0: $n = 7$; M1: $n = 29$).

Im stratifizierten Kollektiv der HGSOCS betrug das mediane Alter 63,33 Jahre. Karzinome von Patientinnen, deren Alter bei Diagnosestellung unter dem Median lag, wiesen etwas häufiger eine gesteigerte CA XII-Expression auf. Die Expressionsunterschiede waren weder für den gruppierten IRS ($\chi^2(3, n = 266) = 2,445$; $p = 0,485$; $V = 0,096$) noch für die *Cut-off*-Werte IRS > 2 (FYT: $p > 0,999$; $V = 0,015$) und IRS > 8 (FYT: $p = 0,568$; $V = 0,044$) statistisch auffällig. Die Kontingenztafeln der gruppierten Altersstufen zeigten keine stetige Veränderung der Färbeparameter. Die höchste CA XII-Expression wurde bei der Altersgruppe 40–49 Jahre beobachtet. In 32 dieser 37 Karzinome (86,5 %) fand sich ein hoher Anteil positiver Zellen (PP 4). Die vorherrschende Färbeintensität wurde nur in 6 Fällen (16,2 %) als schwach bewertet.

Kaplan-Meier-Analysen

Für 75 HGSOCS konnte das rezidivfreie Überleben untersucht werden. Bei allen 15 Fällen mit bekanntem Tumorrezidiv im Beobachtungszeitraum wiesen die vorliegenden Präparate einen hohen Anteil positiver Tumorzellen (PP 4) auf. Darüber hinaus war ein größerer Prozentsatz dieser Karzinome vorherrschend stark gefärbt. In Abbildung 18 A ist der Verlauf der Kaplan-Meier-Kurven für die gruppierten IRS-Werte dargestellt (Log-

rank-Test: $\chi^2(2, n=75) = 2,054; p = 0,358$. Die rezidivfreien 1-Jahres- und 5-Jahres-Überlebensraten sind in Tabelle 12 zu finden. Eine sehr hohe CA XII-Expression zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (*Cut-off* IRS > 8) ging tendenziell mit einer kürzeren rezidivfreien Zeit einher (Log-rank-Test: $\chi^2(1, n=75) = 1,977; p = 0,160$) (Abbildung 18 B).

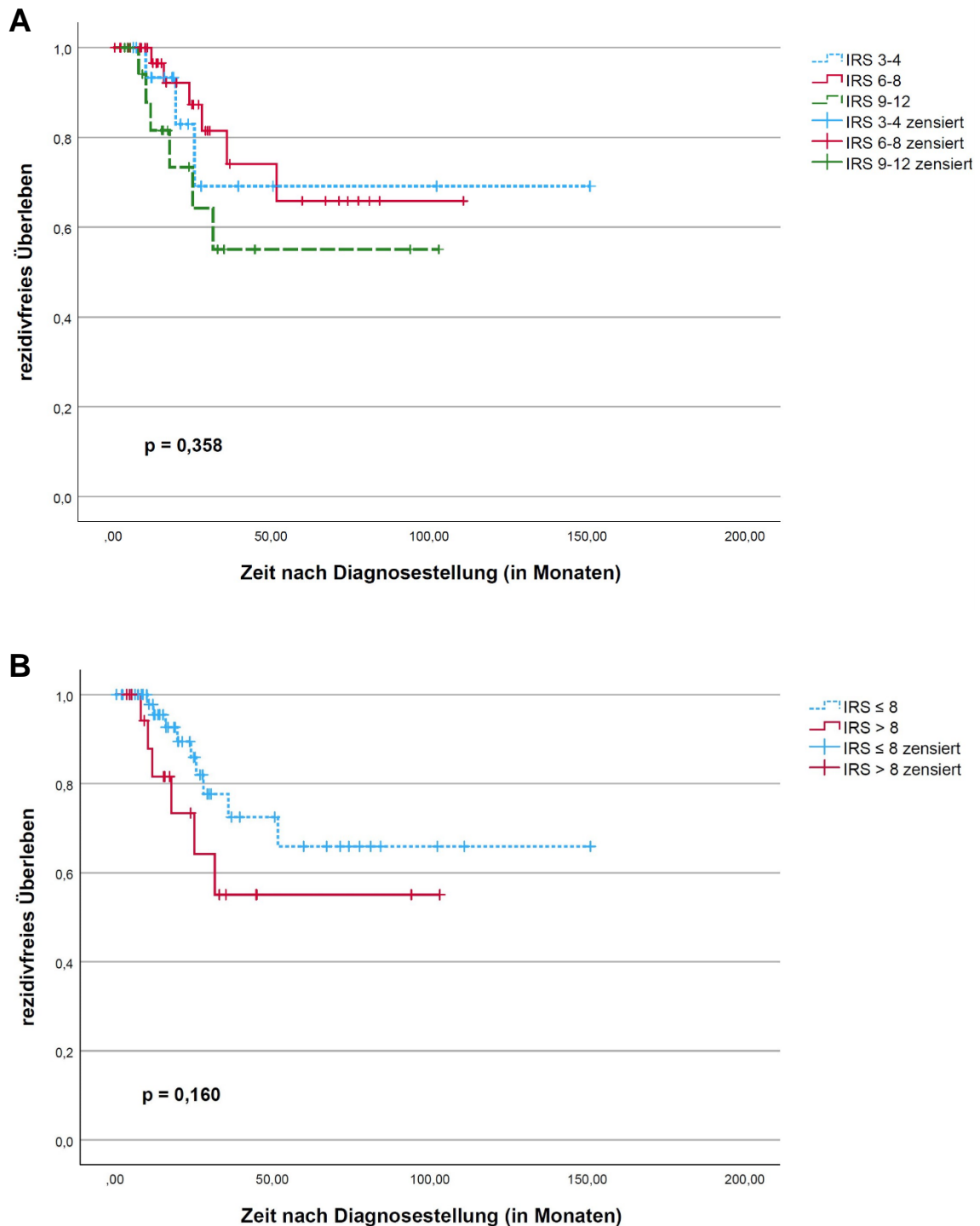


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurven des rezidivfreien Überlebens für die stratifizierte Ovarialkarzinome ($n = 75$) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expression – gruppierte Werte [A] und Cut-off-Wert 8 [B] des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

Tabelle 12: Rezidivfreie 1-Jahres- und 5-Jahres-Überlebensraten für die stratifizierte Ovarialkarzinome ($n = 75$) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expressionsstufen – gruppierte Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

	rezidivfreies 1-Jahres-Überleben (95 %-Konfidenzintervall)	rezidivfreies 5-Jahres-Überleben (95 %-Konfidenzintervall)
IRS 3-4	93,3 % (81,6 – 100,0 %)	69,1 % (44,1 – 100,0 %)
IRS 6-8	100,0 % (100,0 – 100,0 %)	65,9 % (45,9 – 94,7 %)
IRS 9-12	81,6 % (64,8 – 100,0 %)	55,1 % (33,3 – 91,3 %)

Für die Analyse des Gesamtüberlebens konnte aufgrund der größeren Anzahl dokumentierter Fälle eine zusätzliche Stratifizierung von konfundierenden Prognosefaktoren vorgenommen werden. Berücksichtigt wurden neben dem histologischen Subtyp und dem Differenzierungsgrad auch das Tumorstadium und das Alter der Patientinnen zum Diagnosezeitpunkt, wobei jeweils die häufigste Merkmalsausprägung einbezogen wurde. Somit erfolgte die Analyse an HGSOCS, welche bei 60–69 Jahre alten Patientinnen in FIGO-Stadium III diagnostiziert wurden ($n = 80$).

Die Überlebenskurven der gruppierten IRS-Werte verliefen ohne klare Abstufung und statistisch auffällige Unterschiede (Log-rank-Test: $\chi^2(3, n = 80) = 4,177$; $p = 0,243$). Tabelle 13 zeigt die 1-Jahres- und 5-Jahres-Überlebensraten der einzelnen Gruppen. In Abbildung 19 A und B sind die Überlebenskurven für den *Cut-off* IRS > 2 und IRS > 8 veranschaulicht. Bei sehr niedriger CA XII-Expression im untersuchten Operationspräparat ($n = 7$) zeigte sich im Verlauf eine Tendenz zu einem besseren Gesamtüberleben (Log-rank-Test: $\chi^2(1, n = 80) = 2,381$; $p = 0,123$). Demgegenüber war eine sehr hohe CA XII-Expression ($n = 20$) im vorliegenden Kollektiv eher mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (Log-rank-Test: $\chi^2(1, n = 80) = 2,133$; $p = 0,144$).

Tabelle 13: 1-Jahres- und 5-Jahres-Gesamtüberlebensraten für die stratifizierte Ovarialkarzinome ($n = 80$) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expressionsstufen – gruppierte Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

	1-Jahres-Überleben (95 %-Konfidenzintervall)	5-Jahres-Überleben (95 %-Konfidenzintervall)
IRS 0-2	85,7 % (63,4 – 100,0 %)	42,9 % (18,3 – 100,0 %)
IRS 3-4	95,2 % (86,6 – 100,0 %)	24,0 % (9,9 – 58,0 %)
IRS 6-8	86,3 % (74,6 – 99,8 %)	38,8 % (24,1 – 62,4 %)
IRS 9-12	75,0 % (58,2 – 96,6 %)	25,0 % (11,7 – 53,5 %)

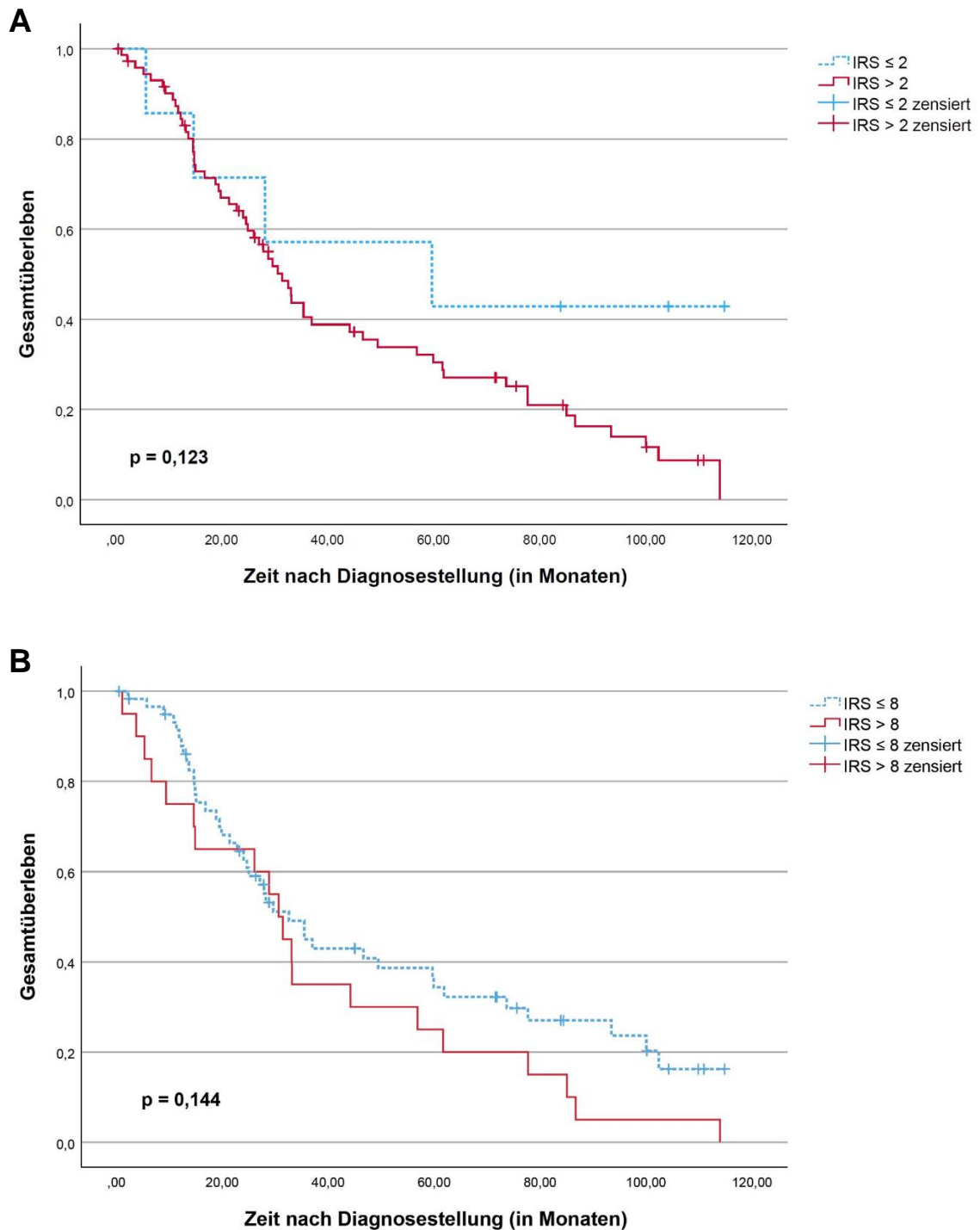


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens für die stratifizierten Ovarialkarzinome ($n = 80$) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expression – Cut-off-Wert 2 [A] und Cut-off-Wert 8 [B] des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

Auch bei Erhöhung der Fallzahl durch Einschluss aller HGSOCs in FIGO-Stadium III unabhängig der Altersgruppe, zeigte sich der beschriebene Trend (Log-rank-Test für Cut-off IRS > 2: $\chi^2(1, n = 207) = 0,962$; $p = 0,327$; Log-rank-Test für Cut-off IRS > 8: $\chi^2(1, n = 207) = 1,306$; $p = 0,253$).

4.1.3 CA XII-Expression in den muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen

Deskriptive Statistik

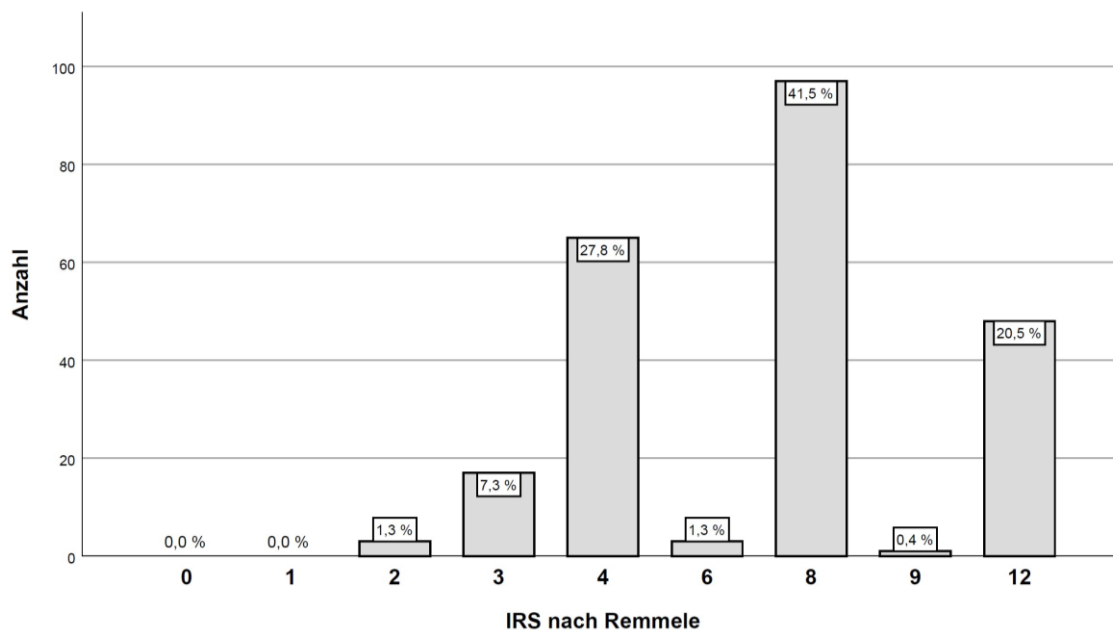


Abbildung 20: Carboanhydrase XII-Expression im Harnblasenkarzinomkollektiv ($n = 234$) – absolute und relative Häufigkeiten der Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

Alle 234 muskelinvasiven Harnblasenkarzinome (100,0 %) zeigten eine Färbung von Tumorzellen. In der großen Mehrheit der Fälle (89,3 %) waren über 80 % der Zellen gefärbt (Tabelle 14 A). Die vorherrschende Färbeintensität war meist (43,2 %) mäßig stark (Tabelle 14 B). Der modale und der mediane IRS hatten den Wert 8. Im Kollektiv waren alle IRS-Werte zwischen 2 und 12 vertreten (Abbildung 20), wobei der minimale Wert IRS 2 nur in 3 Fällen (1,3 %) beobachtet wurde. Ein IRS > 8 trat bei 49 Präparaten (20,9 %) auf.

In 166 Karzinomen (70,9 %) fanden sich Areale mit starker Färbeintensität. Insgesamt machten diese meist (44,6 %) unter 10 % der Tumorzellen aus.

Bei 135 Fällen (57,7 %) variierte die Färbung zwischen den zu einem Karzinom gehörenden TMAs. In 97 Fällen (41,5 %) wiesen die Gewebeproben eine ähnliche Färbung auf. 2 Fälle (0,9 %) waren diesbezüglich nicht beurteilbar.

Für 185 Karzinome (79,1 %) konnte ausreichend Gewebe aus dem Haupttumor und der Invasionsfront miteinander verglichen werden. 84,3 % dieser Fälle zeigten zwischen den beiden Bereichen keinen eindeutigen Unterschied der Färbung (Abbildung 21). In 17 Fällen (9,2 %) war der Haupttumor die stärker gefärbte Region, in 12 Fällen (6,5 %) die Invasionsfront.

Ergebnisse

Eine heterogene Färbung innerhalb der einzelnen TMAs fand sich bei 122 Fällen (52,1 %) des Kollektivs, während sich die Tumorzellen in den TMAs von 112 Fällen (47,9 %) gleichmäßig anfärbten.

Tabelle 14: Carboanhydrase XII-Expression im Harnblasenkarzinomkollektiv – absolute (*n*) und relative Häufigkeiten für den Anteil der gefärbten Zellen [A] und die vorherrschende Färbeintensität [B], kodiert nach Remmele

A				B			
Prozentsatz positiver Zellen		<i>n</i>	(%)	vorherrschende Färbeintensität		<i>n</i>	(%)
PP 0	0 %	0	(0,0)	SI 0	keine Färbung	0	(0,0)
PP 1	1-9 %	0	(0,0)	SI 1	schwach	84	(35,9)
PP 2	10-20 %	0	(0,0)	SI 2	mäßig	101	(43,2)
	21-30 %	0	(0,0)	SI 3	stark	49	(20,9)
	31-40 %	0	(0,0)		Σ	234	(100,0)
	41-50 %	4	(1,7)				
PP 3	51-60 %	2	(0,9)				
PP 3	61-70 %	4	(1,7)				
	71-80 %	15	(6,4)				
	PP 4	81-90 %	35	(15,0)			
PP 4	91-100 %	174	(74,4)				
	Σ	234	(100,0)				

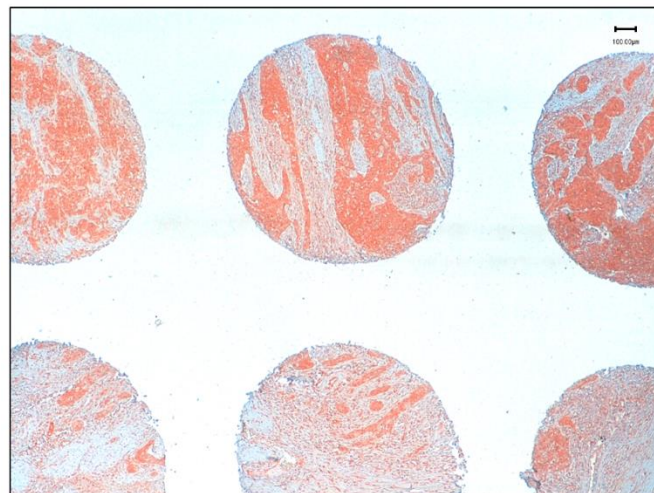


Abbildung 21: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII im Tumorgewebe eines Harnblasenkarzinompatienten. Gewebestücken aus dem Haupttumor (obere Reihe) und aus dem Bereich der Invasionsfront (untere Reihe) (40-fach vergrößert), Maßstabsleiste: 100 µm

Kontingenzanalysen

Bei den analysierten Harnblasenkarzinomen handelte es sich ausschließlich um *high-grade* Tumoren. Leitliniengerecht waren diese weiter in G2 und G3 unterteilt [8]. An

dieser Stelle sei erwähnt, dass die G2-Karzinome des Kollektivs in der Kaplan-Meier-Analyse ein tendenziell schlechteres tumorspezifisches Überleben zeigten (Log-rank-Test: $\chi^2(1, n=230) = 0,869$; $p = 0,351$). Die Häufigkeitsverteilung der gruppierten IRS-Werte innerhalb der beiden Graduierungsstufen (FFHT = 5,931; $p = 0,102$; $V = 0,154$) ist in Tabelle 15 dargestellt. Es fiel auf, dass bei den G2-Karzinomen ($n = 18$) prozentual häufiger eine vorherrschend mäßige oder starke Färbeintensität dokumentiert wurde (kR: + 1,1 beziehungsweise + 1,3) und der Anteil CA XII-positiver Tumorzellen im Verhältnis etwas öfter mit PP 4 bewertet wurde (kR: + 0,7) als bei den G3-Karzinomen ($n = 215$). Weder für den *Cut-off* IRS > 2 (FYT: $p > 0,999$; $V = 0,033$) noch für IRS > 8 (FYT: $p = 0,225$; $V = 0,087$) zeigte sich ein statistisch auffälliger Zusammenhang.

Tabelle 15: Kontingenz der Merkmalsausprägungen von Tumorgraduierung (G) und Carboanhydrase XII-Expression im Harnblasenkarzinomkollektiv ($n = 233$) – absolute (n) und relative Häufigkeiten für die gruppierten Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

		IRS 0-2	IRS 3-4	IRS 6-8	IRS 9-12	Σ
G2	n	0	2	10	6	18
	(%)	(0,0)	(11,1)	(55,6)	(33,3)	(100,0)
G3	n	3	79	90	43	215
	(%)	(1,4)	(36,7)	(41,9)	(20,0)	(100,0)

Zwischen den drei Tumorentitäten des Kollektivs konnte kein statistisch auffälliger Expressionsunterschied festgestellt werden (gruppiertes IRS: FFHT = 5,066; $p = 0,772$; $V = 0,065$). Verglichen mit den Urothelkarzinomen war die CA XII-Expression in den 7 primären Adenokarzinomen etwas zugunsten der sehr hohen IRS-Werte verschoben (Tabelle 16). Allerdings blieben tendenziell mehr Tumorzellen ungefärbt als in den anderen Entitäten (kR für PP 4: - 1,6). Die niedrige Fallzahl der reinen Plattenepithelkarzinome ($n = 2$) erlaubte keine gewichtige Aussage. In beiden untersuchten Fällen waren knapp 100 % der Tumorzellen gefärbt.

Tabelle 16: Kontingenz der Merkmalsausprägungen von Tumorentität und Carboanhydrase XII-Expression im Harnblasenkarzinomkollektiv ($n = 234$) – absolute (n) und relative Häufigkeiten für die gruppierten Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

		IRS 0-2	IRS 3-4	IRS 6-8	IRS 9-12	Σ
Urothelkarzinom	n	3	80	96	46	225
	(%)	(1,3)	(35,6)	(42,7)	(20,4)	(100,0)
Adenokarzinom	n	0	2	3	2	7
	(%)	(0,0)	(28,6)	(42,9)	(28,6)	(100,0)
Plattenepithelkarzinom	n	0	0	1	1	2
	(%)	(0,0)	(0,0)	(50,0)	(50,0)	(100,0)

Die Assoziation der CA XII-Expression mit histopathologischen und klinischen Parametern wurde im Weiteren nur an den MIUCs ($n = 225$) untersucht. In der rechten Spalte der Kontingenztabellen ist jeweils die Häufigkeit der Merkmalsausprägungen des analysierten Parameters im stratifizierten Kollektiv angegeben (Tabelle 17 – Tabelle 19).

Bei den 14 MIUCs mit dem Vermerk einer glandulären Differenzierung im pathologischen Befund war die dokumentierte CA XII-Expression des vorliegenden Gewebes tendenziell niedriger (gruppiertes IRS: FFHT = 3,301; $p = 0,361$; $V = 0,127$) (Tabelle 17), insbesondere bedingt durch das häufigere Vorliegen einer schwachen Färbeintensität (kR: + 1,7). Für die Cut-off-Werte IRS > 2 (FYT: $p > 0,999$; $V = 0,030$) und IRS > 8 (FYT: $p = 0,311$; $V = 0,085$) war der Expressionsunterschied nicht statistisch auffällig.

Tabelle 17: Kontingenz von glandulärer Differenzierung und Carboanhydrase XII-Expressionsstufe innerhalb der muskelinvasiven Urothelkarzinome ($n = 225$) – absolute (n) und relative Häufigkeiten für die gruppierten Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

		IRS 0-2	IRS 3-4	IRS 6-8	IRS 9-12	Σ
keine glanduläre Differenzierung	n	3	72	91	45	211
	(%)	(1,4)	(34,1)	(43,1)	(21,3)	(100,0)
glanduläre Differenzierung	n	0	8	5	1	14
	(%)	(0,0)	(57,1)	(35,7)	(7,1)	(100,0)

Bei der mikroskopischen Auswertung der Präparate entstand teilweise der Eindruck einer vermehrten Färbung in Bereichen mit plattenepithelialer Differenzierung (Abbildung 22).

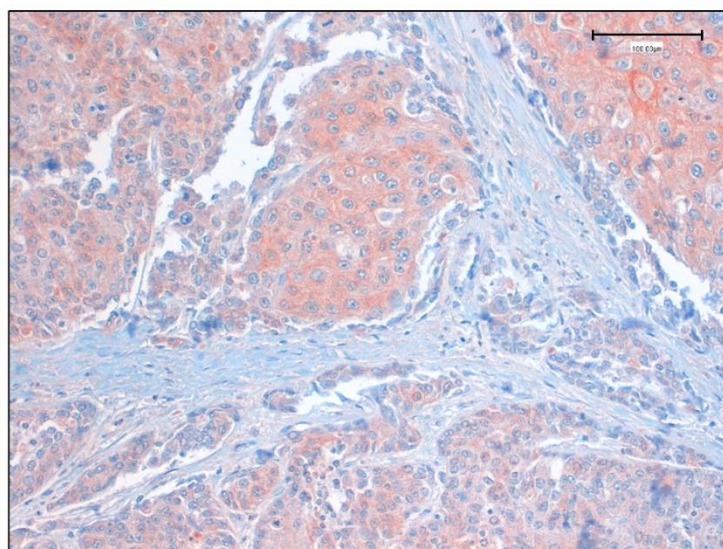


Abbildung 22: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in einem muskelinvasiven Urothelkarzinom mit plattenepithelialer Differenzierung (200-fach vergrößert), Maßstabsleiste: 100 μm

In der Kontingenzanalyse zeigten MIUCs mit einer entsprechenden Angabe im pathologischen Befund ($n=35$) ebenfalls häufiger eine starke CA XII-Expression. Der Unterschied der gruppierten IRS-Werte war statistisch auffällig (FFHT = 8,509; $p=0,027$; $V=0,212$) (Tabelle 18). Für den *Cut-off* IRS > 2 war die Expression ähnlich verteilt (FYT: $p>0,999$; $V=0,050$), wohingegen die Häufigkeit der sehr hohen IRS-Werte auffallend unterschiedlich war (FYT für den *Cut-off* IRS > 8: $p=0,005$; $V=0,208$). 14 der 35 Fälle mit plattenepithelialer Differenzierung (40,0 %) wiesen den Höchstwert IRS 12 auf (kR: + 7,0).

Tabelle 18: Kontingenz von plattenepithelialer Differenzierung und Carboanhydrase XII-Expressionsstufe innerhalb der muskelinvasiven Urothelkarzinome ($n=225$) – absolute (n) und relative Häufigkeiten für die gruppierten Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

		IRS 0-2	IRS 3-4	IRS 6-8	IRS 9-12	Σ
keine plattenepitheliale Differenzierung	n	3	71	84	32	190
	(%)	(1,6)	(37,4)	(44,2)	(16,8)	(100,0)
plattenepitheliale Differenzierung	n	0	9	12	14	35
	(%)	(0,0)	(25,7)	(34,3)	(40,0)	(100,0)

In Tabelle 19 A ist die Häufigkeitsverteilung der gruppierten IRS-Werte für die UICC-Tumorstadien dargestellt (FFHT = 4,805; $p=0,563$; $V=0,112$). Im untersuchten Kollektiv zeigten alle 19 Stadium II-Karzinome (100,0 %) einen hohen Anteil CA XII-positiver Tumorzellen (PP 4) (kR: + 1,5). Diese waren etwas seltener schwach (kR: - 0,5), jedoch auch seltener stark (kR: - 1,1) gefärbt als in den UICC-Stadien III und IV. Die 3 Fälle mit IRS 2 wurden bei Stadium IV-Karzinomen beobachtet (kR: + 1,5) (*Cut-off* IRS > 2: FFHT = 2,305; $p=0,429$; $V=0,115$). Für den *Cut-off* IRS > 8 war die CA XII-Expression nicht auffallend unterschiedlich (FFHT = 1,102; $p=0,596$; $V=0,076$).

Die Komponenten der zugrundeliegenden TNM-Klassifikation wurden zudem separat untersucht. Die gruppierten IRS-Werte sind in Tabelle 19 B–D zu finden (T: FFHT = 4,204; $p=0,632$; $V=0,097$, N: FFHT = 4,800; $p=0,566$; $V=0,101$, M: FFHT = 5,690; $p=0,433$; $V=0,107$). Auch die Deskriptoren für eine Tumorzellinvasion in Lymphgefäße (FFHT = 3,269; $p=0,331$; $V=0,129$), Venen (FFHT = 2,511; $p=0,423$; $V=0,115$) und Perineuralscheiden (FFHT = 9,348; $p=0,167$; $V=0,128$) sind dort aufgeführt (Tabelle 19 E–G).

Zusammenfassend lässt sich berichten, dass am vorliegenden Kollektiv keiner der Parameter in einem mittleren oder starken Zusammenhang mit der CA XII-Expression stand. Schwankungen der relativen Häufigkeiten betrafen bei den Invasionsparametern insbesondere die schwache und mäßige Färbeintensität. Aus den Beobachtungen ließ sich jedoch keine gleichgerichtete Tendenz ableiten.

Tabelle 19: Kontingenz der Merkmalsausprägungen von UICC-Tumorstadium [A] beziehungsweise von den einzelnen Komponenten der TNM-Klassifikation [B-D] sowie der zusätzlichen Deskriptoren L, V und Pn [E-G] und Carboanhydrase XII-Expression innerhalb der muskelinvasiven Urothelkarzinome (n = 225) – absolute (n) und relative Häufigkeiten für die gruppierten Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

			IRS 0-2	IRS 3-4	IRS 6-8	IRS 9-12	Σ	
A	UICC-Stadium	II	n (%)	0 (0,0)	6 (31,6)	11 (57,9)	2 (10,5)	19 (100,0)
		III	n (%)	0 (0,0)	32 (34,8)	41 (44,6)	19 (20,7)	92 (100,0)
		IV	n (%)	3 (2,6)	42 (36,8)	44 (38,6)	25 (21,9)	114 (100,0)
B	Ausdehnung des Primärtumors	T2	n (%)	0 (0,0)	11 (25,6)	23 (53,5)	9 (20,9)	43 (100,0)
		T3	n (%)	2 (1,6)	45 (36,3)	52 (41,9)	25 (20,2)	124 (100,0)
		T4	n (%)	1 (1,7)	24 (41,4)	21 (36,2)	12 (20,7)	58 (100,0)
C	Lymphknoten-status	N0	n (%)	1 (0,9)	40 (35,7)	53 (47,3)	18 (16,1)	112 (100,0)
		N1	n (%)	2 (2,1)	32 (34,0)	37 (39,4)	23 (24,5)	94 (100,0)
		NX / fehlend	n (%)	0 (0,0)	8 (42,1)	6 (31,6)	5 (26,3)	19 (100,0)
D	Fernmetastasen	M0	n (%)	2 (1,1)	62 (33,9)	80 (43,7)	39 (21,3)	183 (100,0)
		M1	n (%)	1 (3,3)	14 (46,7)	9 (30,0)	6 (20,0)	30 (100,0)
		MX / fehlend	n (%)	0 (0,0)	4 (33,3)	7 (58,3)	1 (8,3)	12 (100,0)
E	Lymphgefäß-invasion	L0	n (%)	3 (2,1)	46 (31,9)	65 (45,1)	30 (20,8)	144 (100,0)
		L1	n (%)	0 (0,0)	34 (42,0)	31 (38,3)	16 (19,8)	81 (100,0)
F	Venen-invasion	V0	n (%)	3 (1,6)	71 (37,4)	77 (40,5)	39 (20,5)	190 (100,0)
		V1	n (%)	0 (0,0)	9 (25,7)	19 (54,3)	7 (20,0)	35 (100,0)
G	Perineuralscheiden-invasion	Pn0	n (%)	2 (1,2)	57 (33,3)	79 (46,2)	33 (19,3)	171 (100,0)
		Pn1	n (%)	1 (1,9)	23 (43,4)	17 (32,1)	12 (22,6)	53 (100,0)
		PnX / fehlend	n (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)

Bei Fällen von präoperativ vorbehandelten Patienten wurde keine Auffälligkeit der CA XII-Expression festgestellt. Der zeitliche Abstand zwischen Vortherapie und Zystektomie konnte hierbei nicht berücksichtigt werden.

Das mediane Patientenalter zum Zeitpunkt der Zystektomie betrug für die MIUCs 68,02 Jahre. In der jüngeren Subgruppe des Kollektivs fand sich etwas häufiger eine niedrige CA XII-Expression (gruppierte IRS-Werte: FFHT = 6,017; $p = 0,093$; $V = 0,169$), inklusive der 3 Fälle mit IRS 2 (FYT für den *Cut-off* IRS > 2: $p = 0,247$; $V = 0,117$). Eine vorherrschend starke Färbeintensität und damit sehr hohe IRS-Werte fanden sich etwas häufiger in Präparaten von Patienten, deren Alter über dem Median lag (FYT für den *Cut-off* IRS > 8: $p = 0,620$; $V = 0,044$). Die Analyse der einzelnen Altersgruppen ergab keine klare Abstufung der Expression. Bei den 12 Patienten zwischen 40 und 49 Jahren war die Kategorie IRS 0–2 mit einem korrigierten Residuum von + 4,8 überrepräsentiert. Die relative Häufigkeit für einen hohen Anteil CA XII-positiver Zellen (PP 4) war bei den 84 Patienten zwischen 70 und 79 Jahren mit 95,2 % am größten (kR: + 2,1). Gleichzeitig wurde in dieser Altersgruppe mit 28,6 % der niedrigste Prozentsatz einer vorherrschend schwachen Färbeintensität beobachtet (kR: - 1,9).

Präparate von Frauen zeigten etwas häufiger niedrige IRS-Werte (kR für IRS 3–4: + 1,7) (gruppiertes IRS: FFHT = 3,380; $p = 0,306$; $V = 0,134$). Die 3 Fälle mit IRS 2 wurden allerdings bei Männern beobachtet (FYT: $p = 0,571$; $V = 0,069$). Ein IRS > 8 fand sich bei 9 von 58 Präparaten (15,5 %) weiblicher Patienten und bei 37 von 167 Präparaten (22,2 %) männlicher Patienten (FYT: $p = 0,346$; $V = 0,072$). Verantwortlich zeigten sich Unterschiede der Färbeintensität.

Kaplan-Meier-Analysen

Die Analyse des rezidivfreien Überlebens erfolgte an MIUCs mit Tumorgrad 3. Als bedeutendste Prognosefaktoren nach radikaler Zystektomie gelten die Ausdehnung des Primärtumors und der Lymphknotenstatus [8]. Somit wurde initial nach UICC-Stadium III stratifiziert, da dieses in der zum Diagnosezeitpunkt gültigen Klassifikation nur die Kategorien T3a bis T4a beinhaltet, jeweils mit N0 und M0. Ausschlusskriterien waren eine neoadjuvante Chemotherapie, eine Nachbeobachtungszeit von weniger als 91 Tagen sowie tumorpositive Resektionsränder im Zystektomiepräparat (R1 / R2). Des Weiteren wurden Fälle mit der Angabe einer plattenepithelialen Differenzierung ausgeschlossen, da diese im vorliegenden Kollektiv mit der CA XII-Expression assoziiert war und mit einer schlechteren Prognose einherging.

In Abbildung 23 ist das rezidivfreie Überleben für die gruppierten IRS-Werte der 47 eingeschlossenen Fälle dargestellt. Der Log-rank-Test ergab, dass die Überlebenskurven statistisch nicht auffallend unterschiedlich verliefen ($\chi^2(2, n=47)=2,881$; $p=0,237$). Auch die rezidivfreien 1-Jahres- und 5-Jahres-Überlebensraten unterschieden sich nicht statistisch auffällig (Tabelle 20). Allerdings entwickelte im Beobachtungszeitraum nur 1 von 7 Patienten (14,3 %) mit sehr hoher CA XII-Expression (IRS > 8) im Operationspräparat ein Rezidiv. Dagegen trat bei 10 von 19 Patienten (52,6 %) mit IRS 3–4 und bei 11 von 21 Patienten (52,4 %) mit IRS 6–8 ein Rezidiv auf (Log-rank-Test für *Cut-off* IRS > 8: $\chi^2(1, n=47)=2,862$; $p=0,091$).

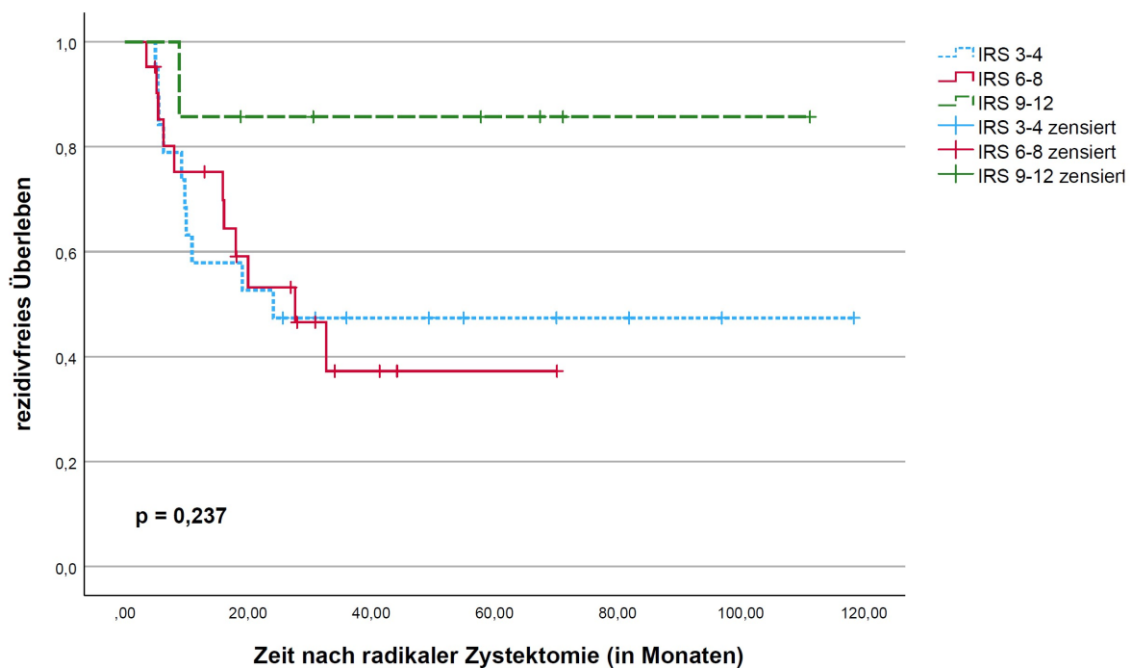


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurven des rezidivfreien Überlebens für die stratifizierten Urothelkarzinome in UICC-Tumorstadium III ($n=47$) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expression – gruppierte Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

Tabelle 20: Rezidivfreie 1-Jahres- und 5-Jahres-Überlebensraten für die stratifizierten Urothelkarzinome in UICC-Tumorstadium III ($n=47$) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expressionsstufen – gruppierte Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

	rezidivfreies 1-Jahres-Überleben (95 %-Konfidenzintervall)	rezidivfreies 5-Jahres-Überleben (95 %-Konfidenzintervall)
IRS 3-4	57,9 % (39,5 – 84,9 %)	47,4 % (29,5 – 76,3 %)
IRS 6-8	75,2 % (58,6 – 96,6 %)	37,2 % (19,2 – 72,3 %)
IRS 9-12	85,7 % (63,4 – 100,0 %)	85,7 % (63,4 – 100,0 %)

Um auch die prognostisch ungünstigeren Karzinome abzubilden, wurde die Analyse des rezidivfreien Überlebens bei ansonsten identischer Stratifizierung für das UICC-Tumorstadium IV wiederholt ($n = 40$).

Weder für den Verlauf der Kaplan-Meier-Kurven (Log-rank-Test für den gruppierten IRS: $\chi^2(3, n = 40) = 0,113$; $p = 0,990$) noch für die rezidivfreien 1-Jahres- und 5-Jahres-Überlebensraten fanden sich statistisch auffällige Unterschiede (Abbildung 24).

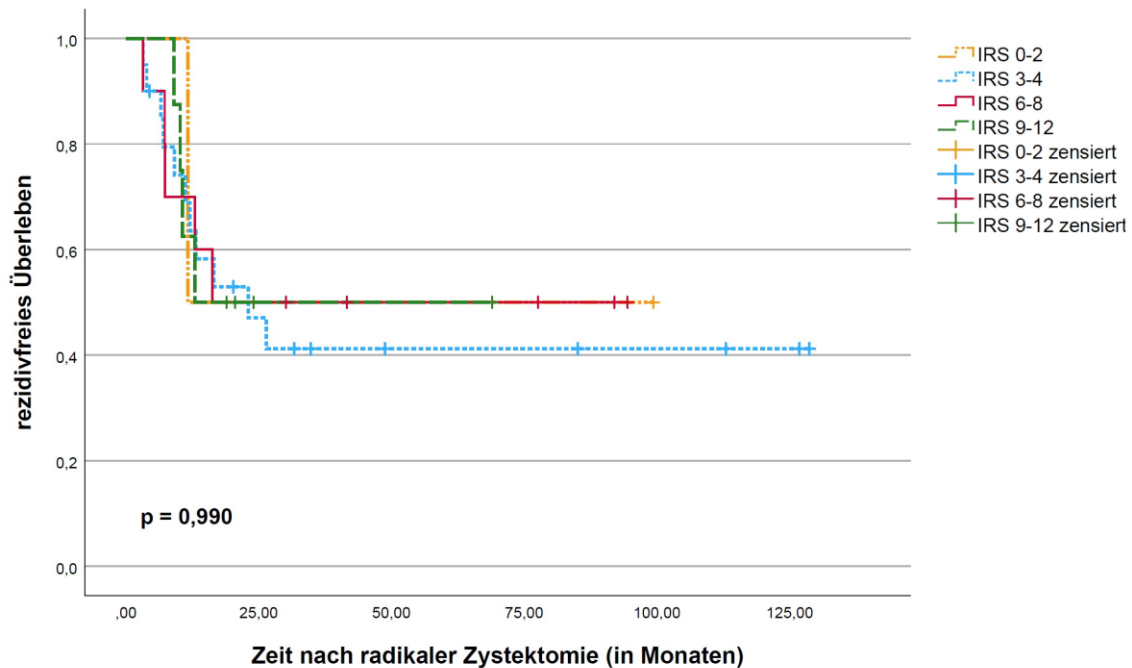


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurven des rezidivfreien Überlebens für die stratifizierte Urothelkarzinome in UICC-Tumorstadium IV ($n = 40$) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expression – gruppierte Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

Für die Analyse des Gesamt- und tumorspezifischen Überlebens wurden zunächst ebenfalls Fälle von G3-MIUCs in UICC-Stadium III eingeschlossen, deren Zystektomiepräparate tumorfreie Resektionsränder (R0) aufwiesen. Weiterhin wurden Fälle mit dem konfundierenden Faktor einer plattenepithelialen Differenzierung unberücksichtigt gelassen ($n = 54$).

Die Überlebenskurven der gruppierten IRS-Werte verliefen ohne klare Abstufung und unterschieden sich nicht statistisch auffällig (Log-rank-Test Gesamtüberleben: $\chi^2(2, n = 54) = 5,442$; $p = 0,066$; Log-rank-Test tumorspezifisches Überleben: $\chi^2(2, n = 54) = 3,104$; $p = 0,212$). In Tabelle 21 sind die 1-Jahres- und 5-Jahres-Gesamtüberlebensraten der einzelnen Gruppen aufgeführt. Abbildung 25 zeigt die Kaplan-Meier-Kurven des tumorspezifischen Überlebens. Das einzige Ereignis in der

Gruppe IRS 9–12 ($n=9$) trat bereits nach 1,45 Monaten auf. Für den *Cut-off* IRS > 8 ergab sich statistisch kein auffallend unterschiedlicher Verlauf der Überlebenskurven (Log-rank-Test Gesamtüberleben: $\chi^2(1, n=54)=3,635$; $p=0,057$; Log-rank-Test tumorspezifisches Überleben: $\chi^2(1, n=54)=2,217$; $p=0,137$).

Tabelle 21: 1-Jahres- und 5-Jahres-Gesamtüberlebensraten für die stratifizierten Urothelkarzinome in UICC-Tumorstadium III ($n=54$) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expressionsstufen – gruppierte Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

	1-Jahres-Überleben (95 %-Konfidenzintervall)	5-Jahres-Überleben (95 %-Konfidenzintervall)
IRS 3-4	94,7 % (85,2 – 100,0 %)	46,1 % (26,3 – 80,8 %)
IRS 6-8	88,1 % (76,4 – 100,0 %)	40,4 % (23,1 – 70,6 %)
IRS 9-12	88,9 % (70,5 – 100,0 %)	88,9 % (70,5 – 100,0 %)

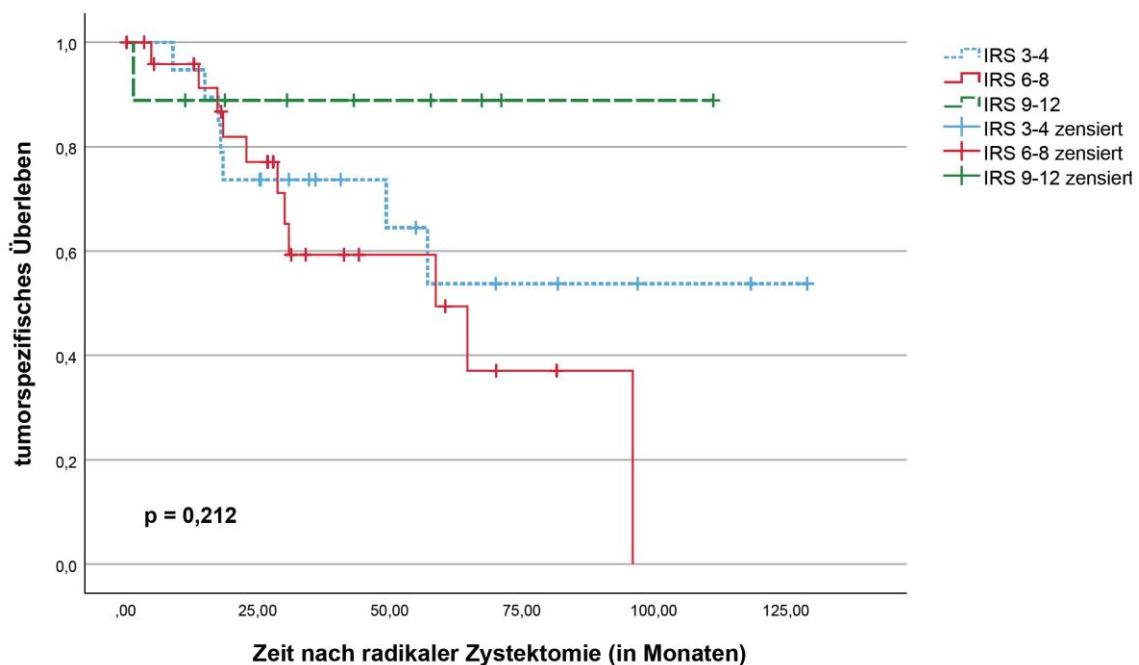


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurven des tumorspezifischen Überlebens für die stratifizierten Urothelkarzinome in UICC-Tumorstadium III ($n=54$) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expression – gruppierte Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

Ergänzend erfolgte auch die Analyse des Gesamt- und tumorspezifischen Überlebens für das Tumorstadium IV. Die übrige Stratifizierung wurde beibehalten ($n=64$).

In Abbildung 26 A sind die Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens für die gruppierten IRS-Werte dargestellt (Log-rank-Test: $\chi^2(3, n=64)=3,377$; $p=0,337$). Bei sehr hoher CA XII-Expression im untersuchten Operationspräparat ($n=12$) zeigten die

Kurven im Verlauf eine Tendenz zu einem schlechteren Überleben (Abbildung 26 B). Der Log-rank-Test für den *Cut-off* IRS > 8 ergab kein statistisch auffälliges Ergebnis ($\chi^2(1, n = 64) = 2,046; p = 0,153$).

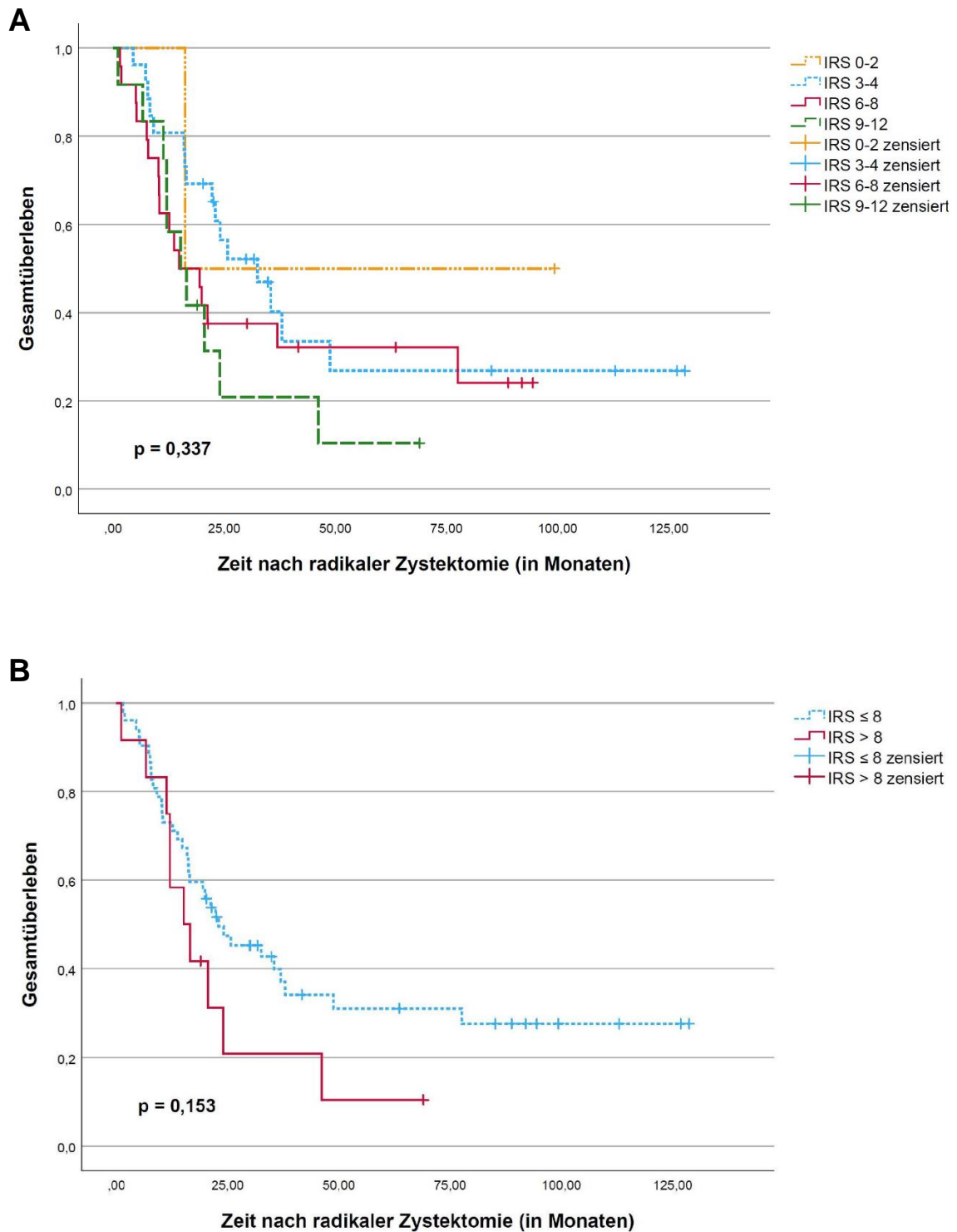


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens für die stratifizierten Urothelkarzinome in UICC-Tumorstadium IV ($n = 64$) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expression – gruppierte Werte [A] und Cut-off-Wert 8 [B] des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

Die tumorspezifischen Überlebensraten verliefen ebenfalls sowohl für die gruppierten IRS-Werte (Log-rank-Test: $\chi^2(3, n=64)=0,734$; $p=0,865$) als auch für den *Cut-off* IRS > 8 (Log-rank-Test: $\chi^2(1, n=64)=0,591$; $p=0,442$) ohne statistisch auffällige Unterschiede (Abbildung 27 A und B).

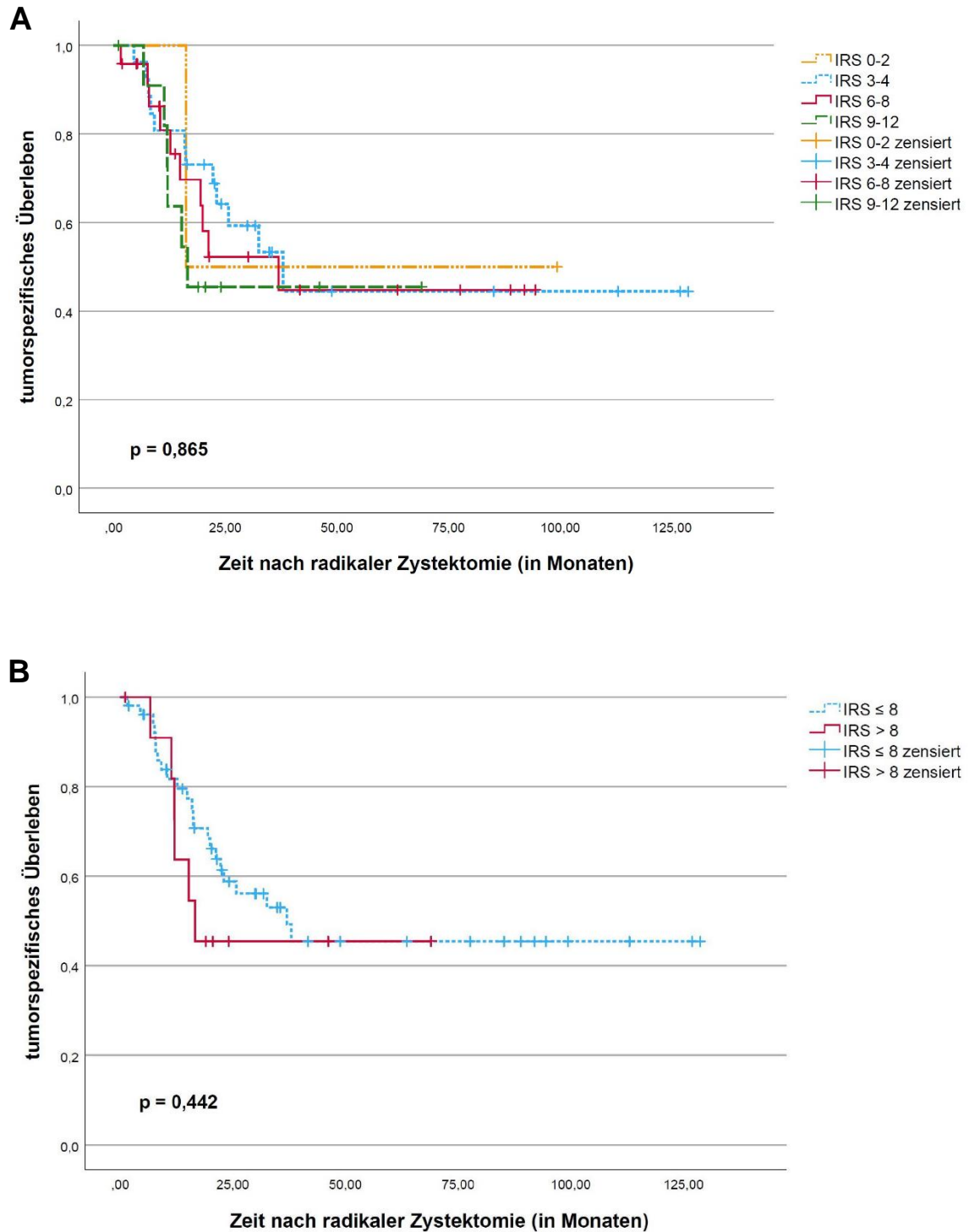


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurven des tumorspezifischen Überlebens für die stratifizierte Urothelkarzinome in UICC-Tumorstadium IV ($n=64$) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expression – gruppierte Werte [A] und Cut-off-Wert 8 [B] des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

Im Zeitraum zwischen 12 Monaten und 38 Monaten nach radikaler Zystektomie war jedoch eine Abstufung der CA XII-Expression angedeutet. Es zeigte sich eine tendenziell kürzere Überlebenszeit bei höheren IRS-Werten.

Die 1-Jahres- und 5-Jahres-Überlebensraten unterschieden sich erneut weder für das Gesamtüberleben (Tabelle 22) noch für das tumorspezifische Überleben (Tabelle 23) statistisch auffällig.

Tabelle 22: 1-Jahres- und 5-Jahres-Gesamtüberlebensraten für die stratifizierten Urothelkarzinome in UICC-Tumorstadium IV (n = 64) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expressionsstufen – gruppierte Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

	1-Jahres-Überleben (95 %-Konfidenzintervall)	5-Jahres-Überleben (95 %-Konfidenzintervall)
IRS 0-2	50,0 % (12,5 – 100,0 %)	50,0 % (12,5 – 100,0 %)
IRS 3-4	80,8 % (67,0 – 97,4 %)	26,8 % (12,3 – 58,2 %)
IRS 6-8	62,5 % (45,8 – 85,3 %)	32,1 % (17,7 – 58,4 %)
IRS 9-12	66,7 % (44,7 – 99,5 %)	10,4 % (1,7 – 64,7 %)

Tabelle 23: Tumorspezifische 1-Jahres- und 5-Jahres-Überlebensraten für die stratifizierten Urothelkarzinome in UICC-Tumorstadium IV (n = 64) unter Berücksichtigung der Carboanhydrase XII-Expressionsstufen – gruppierte Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

	1-Jahres-Überleben (95 %-Konfidenzintervall)	5-Jahres-Überleben (95 %-Konfidenzintervall)
IRS 0-2	50,0 % (12,5 – 100,0 %)	50,0 % (12,5 – 100,0 %)
IRS 3-4	80,8 % (67,0 – 97,4 %)	44,4 % (26,1 – 75,4 %)
IRS 6-8	80,9 % (65,5 – 99,9 %)	44,8 % (26,3 – 76,4 %)
IRS 9-12	72,7 % (50,7 – 100,0 %)	45,5 % (23,8 – 86,8 %)

4.2 Vergleichskollektive

Im Vergleichsgewebe fanden sich ebenfalls CA XII-positive Zellen. Analog zu den untersuchten Karzinomen wurde eine zytoplasmatische Immunfärbung beobachtet sowie teils auch ein membranöses beziehungsweise nukleäres Signal.

4.2.1 CA XII-Expression im ovariellen Vergleichsgewebe

Borderlinetumoren

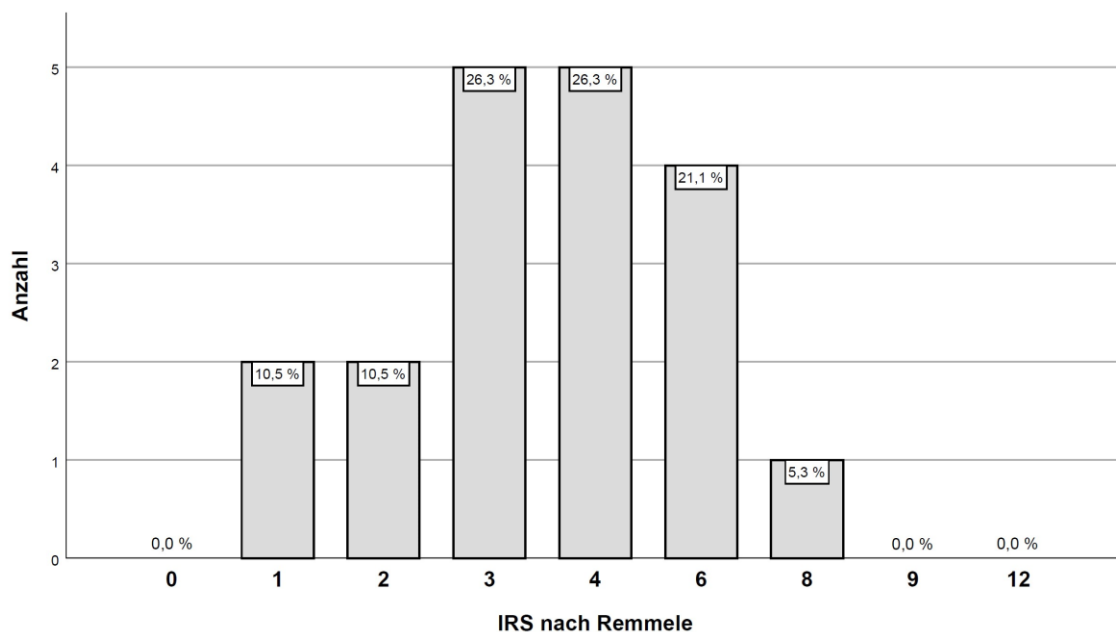


Abbildung 28: Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der ovariellen Borderlinetumoren ($n = 19$) – absolute und relative Häufigkeiten der Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

Im Kollektiv der Borderlinetumoren lag der minimale IRS-Wert bei 1 (Abbildung 28). 4 der 19 verwertbaren Fälle (21,1 %) wiesen einen $IRS \leq 2$ auf, kein Fall (0,0 %) zeigte einen $IRS > 8$. Am häufigsten waren die IRS-Werte 3 und 4 vertreten, der Median hatte den Wert 4. Nur in 1 Fall (5,3 %) waren mehr als 80 % der Tumorzellen gefärbt (Tabelle 24 A). Die dominierende Färbeintensität war in den meisten Fällen (57,9 %) mäßig stark (Tabelle 24 B). Eine starke Färbeintensität fand sich in 17 Präparaten (89,5 %), betraf jedoch meist weniger als 10 % und in keinem Fall (0,0 %) mehr als 50 % der Tumorzellen.

Bei 13 Präparaten (68,4 %) lag eine deutliche Tumorerheterogenität vor, 5 Fälle (26,3 %) zeigten eine eher homogene Färbung. 1 Fall (5,3 %) war diesbezüglich nicht auswertbar. Die Tumoren zeigten auch untereinander teils eine große Variabilität.

Tabelle 24: Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der ovariellen Borderlinetumoren – absolute (*n*) und relative Häufigkeiten für den Anteil der gefärbten Zellen [**A**] und die vorherrschende Färbeintensität [**B**], kodiert nach Remmele

A				B			
Prozentsatz positiver Zellen		<i>n</i>	(%)	vorherrschende Färbeintensität		<i>n</i>	(%)
PP 0	0 %	0	(0,0)	SI 0	keine Färbung	0	(0,0)
PP 1	1-9 %	3	(15,8)	SI 1	schwach	8	(42,1)
PP 2	10-20 %	2	(10,5)	SI 2	mäßige	11	(57,9)
	21-30 %	3	(15,8)				
	31-40 %	0	(0,0)				
	41-50 %	1	(5,3)				
PP 3	51-60 %	3	(15,8)	SI 3	stark	0	(0,0)
	61-70 %	4	(21,1)				
	71-80 %	2	(10,5)				
PP 4	81-90 %	1	(5,3)	Σ		19	(100,0)
	91-100 %	0	(0,0)				
Σ		19	(100,0)				

In manchen Bereichen war die Färbung auf die basalen, an das an das Stroma angrenzenden Anteile des Epithels beschränkt (Abbildung 29). Zudem entstand auch in diesem Kollektiv hin und wieder der Eindruck einer nukleären Beteiligung. Zum Teil fand sich eine deutliche Anfärbung von Stromakomponenten. Abbildung 30 zeigt beispielhaft die beiden zuletzt genannten Aspekte.

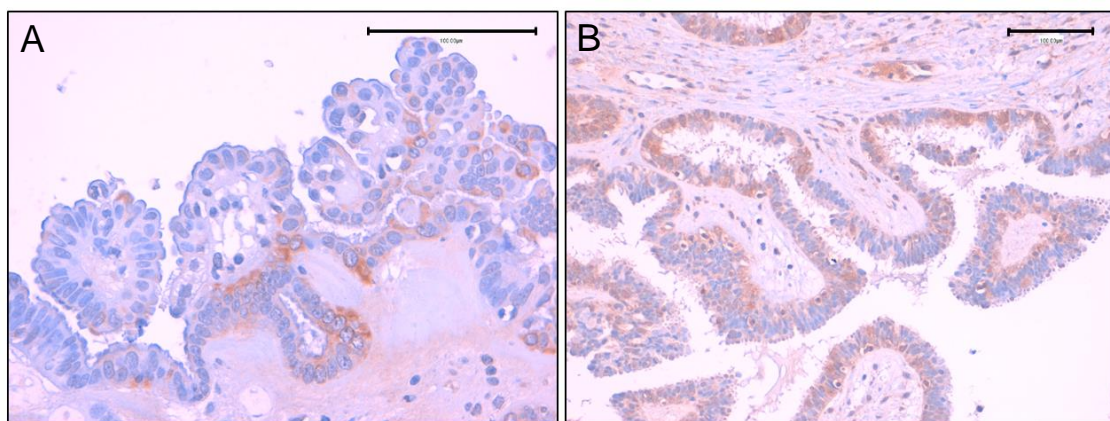


Abbildung 29: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in ovariellen Borderlinetumoren ([**A**] 400-fach vergrößert und [**B**] 200-fach vergrößert), Maßstabsleiste: 100 µm

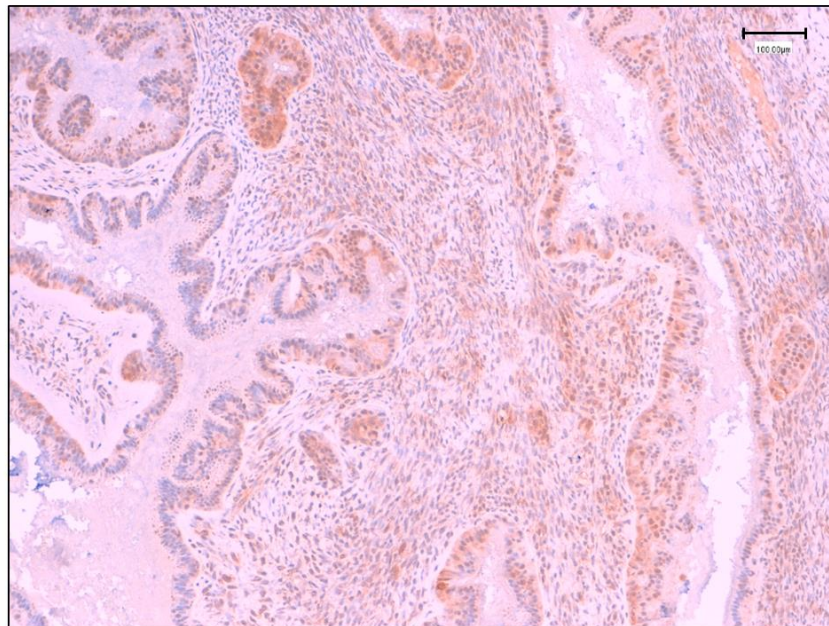


Abbildung 30: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in einem ovariellen Borderlinetumor (100-fach vergrößert), Maßstabsleiste: 100 µm

Es zeigte sich eine statistisch auffallend unterschiedliche Verteilung der CA XII-Expression zwischen den histologischen Subtypen (gruppiertes IRS: FFHT = 10,734; $p=0,005$; $V=0,549$) (Tabelle 25). Der Effekt wurde als stark quantifiziert, jedoch fand sich keine klare Abstufung der Färbeparameter. Die größte Abweichung von der statistisch erwarteten Zellenhäufigkeit bestand bei den serösen Borderlinetumoren mit einem überzufällig seltenen Vorkommen der IRS-Werte 6–8 (kR: - 3,2).

Die beiden FIGO III-Tumoren des Kollektivs wiesen eine niedrige CA XII-Expression auf (gruppiertes IRS: FFHT = 1,601; $p=0,444$; $V=0,279$) (Tabelle 26).

Tabelle 25: Kontingenz der Merkmalsausprägungen von Tumorhistologie und Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der ovariellen Borderlinetumoren – absolute (*n*) und relative Häufigkeiten für die gruppierten Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

		IRS 0-2	IRS 3-4	IRS 6-8	IRS 9-12	Σ
seröser	<i>n</i>	3	10	1	0	14
Borderlinetumor	(%)	(21,4)	(71,4)	(7,1)	(0,0)	(100,0)
muzinöser	<i>n</i>	1	0	3	0	4
Borderlinetumor	(%)	(25,0)	(0,0)	(75,0)	(0,0)	(100,0)
seromuzinöser	<i>n</i>	0	0	1	0	1
Borderlinetumor	(%)	(0,0)	(0,0)	(100,0)	(0,0)	(100,0)

Tabelle 26: Kontingenz der Merkmalsausprägungen von FIGO-Tumorstadium und Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der ovariellen Borderlinetumoren – absolute (n) und relative Häufigkeiten für die gruppierten Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

		IRS 0-2	IRS 3-4	IRS 6-8	IRS 9-12	Σ
FIGO I	n	3	9	5	0	17
	(%)	(17,6)	(52,9)	(29,4)	(0,0)	(100,0)
FIGO III	n	1	1	0	0	2
	(%)	(50,0)	(50,0)	(0,0)	(0,0)	(100,0)

Eine mittlere Effektstärke fand sich für den Zusammenhang zwischen den gruppierten IRS-Werten und dem Alter der Patientinnen (*Cut-off* medianes Alter = 52 Jahre: FFHT = 2,714; $p = 0,343$; $V = 0,402$). Präparate von Frauen, deren Alter bei Diagnosestellung über dem Median lag, wiesen häufiger eine vorherrschend mäßige Färbeintensität (kR: + 2,8) sowie eine hohe Anzahl positiver Tumorzellen (PP 4) auf (kR: + 1,0). Auch die Analyse der gruppierten Altersstufen zeigte die Tendenz einer vermehrten CA XII-Expression bei steigendem Alter.

Nicht-neoplastisches ovarielles Epithel

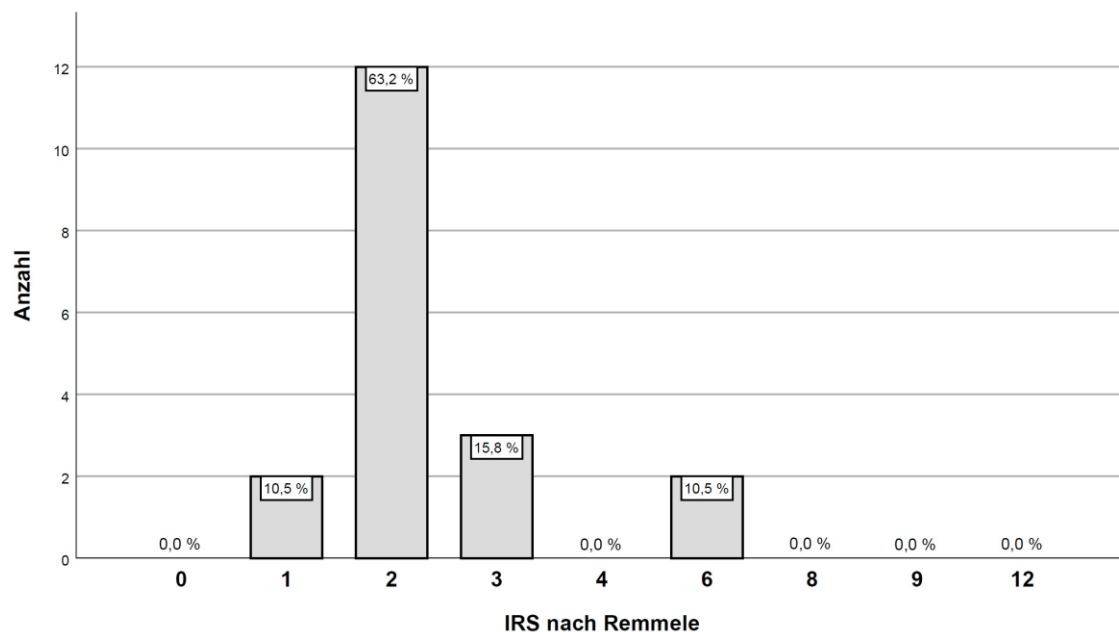


Abbildung 31: Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der nicht-neoplastischen Ovarien (n = 19) – absolute und relative Häufigkeiten der Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

Das Vergleichskollektiv der nicht-neoplastischen Ovarien wies IRS-Werte von 1 bis 6 auf (Abbildung 31). Ein $IRS \leq 2$ wurde für 14 Fälle (73,7 %) dokumentiert. Modus und Median lagen bei IRS 2. In 5 von 19 Präparaten (26,3 %) zeigten über 50 % der Epithelzellen eine Färbung, in keinem Fall (0,0 %) jedoch über 80 % der Zellen (Tabelle 27 A). Zudem war mehrheitlich (84,2 %) eine schwache Färbeintensität vorherrschend (Tabelle 27 B). In einzelnen Epithelzellen von 7 Präparaten (36,8 %) wurde die Färbung als stark bewertet.

Tabelle 27: Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der nicht-neoplastischen Ovarien – absolute (*n*) und relative Häufigkeiten für den Anteil der gefärbten Zellen [**A**] und die vorherrschende Färbeintensität [**B**], kodiert nach Remmele

A				B			
Prozentsatz positiver Zellen		<i>n</i>	(%)	vorherrschende Färbeintensität		<i>n</i>	(%)
PP 0	0 %	0	(0,0)	SI 0	keine Färbung	0	(0,0)
PP 1	1-9 %	3	(15,8)	SI 1	schwach	16	(84,2)
PP 2	10-20 %	1	(5,3)	SI 2	mäßig	3	(15,8)
	21-30 %	3	(15,8)	SI 3	stark	0	(0,0)
	31-40 %	3	(15,8)				
	41-50 %	4	(21,1)				
PP 3	51-60 %	1	(5,3)				
	61-70 %	2	(10,5)				
	71-80 %	2	(10,5)				
PP 4	81-90 %	0	(0,0)				
	91-100 %	0	(0,0)				
Σ		19	(100,0)			19	(100,0)

Eine deutlich heterogene Färbung wurde innerhalb des Epithels von 12 Fällen (63,3 %) beobachtet, während sich die Zellen in 7 Fällen (36,8 %) eher gleichmäßig färbten.

13 Präparate (68,4 %) enthielten eine oder mehrere Inklusionszysten. Die Färbung der invaginierten Epithelzellen unterschied sich nicht wesentlich von der des Oberflächenepithels. Beide Lokalisationen wurden für die Beurteilung der nicht-neoplastischen Epithelzellen im Ovar berücksichtigt.

Hochprismatisches Oberflächenepithel erschien häufig etwas stärker gefärbt. In einigen Epithelabschnitten fand sich die Färbung nur in den basalen Anteilen der Zellen, die an das ovarielle Stroma grenzten. Das spinozelluläre Bindegewebe war häufig zu großen Teilen diffus gefärbt (Abbildung 32).

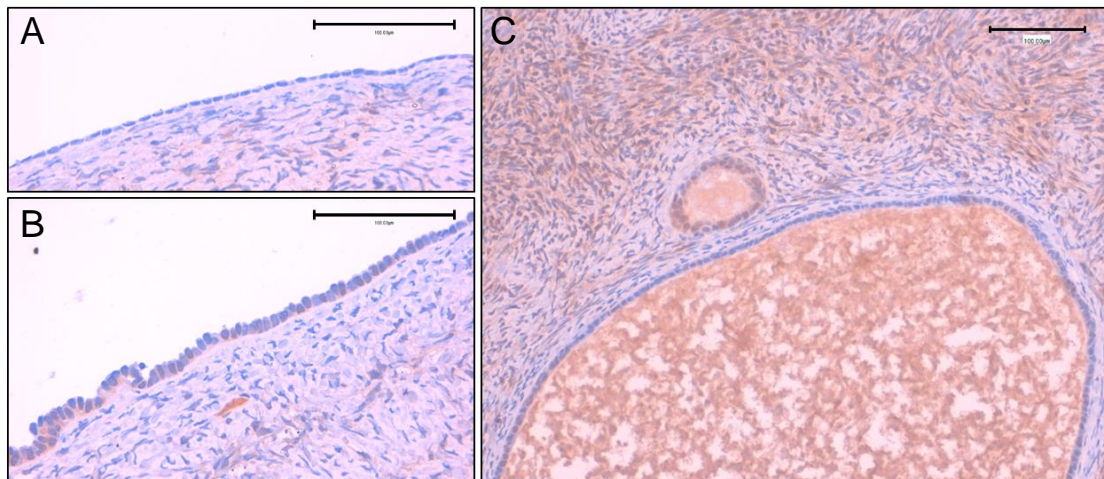


Abbildung 32: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in nicht-neoplastischen Epithelzellen des Ovars. Flaches [A] und iso- bis hochprismatisches Oberflächenepithel [B] (je 400-fach vergrößert) sowie isoprismatisches Inklusionszystenepithel im ovariellen Kortex, umgeben von spinozellulärem Bindegewebe [C] (200-fach vergrößert), Maßstabsleiste: 100 μ m

Im Mesovar gelegene mesonephrische Gangreste (Epoophoron und Paroophoron) sowie das Rete ovarii, ebenfalls ein Überrest embryonaler Strukturen, waren meist vollständig und mit mäßiger Intensität gefärbt. Einer der Flächenschnitte enthielt ein Walthard-Zellnest. Dieses wies sowohl ungefärbte Zellen als auch deutlich gefärbte Bereiche auf.

Auf manchen Flächenschnitten war zudem Gewebe der Tuba uterina angeschnitten. Die Färbung des tubaren Epithels variierte, teils waren mehr als 80 % der Zellen gefärbt. Auf den vorliegenden Präparaten wiesen Zellen des Fimbrienkranzes eine geringere Färbung auf als andere Eileiterabschnitte.

In Präparaten von Patientinnen mit der Diagnose eines außerhalb des Ovars liegenden gynäkologischen Malignoms waren tendenziell etwas mehr ovarielle Epithelzellen CA XII-positiv (PP 2: 60,0 % vs. 55,6 %; PP 3: 30,0 % vs. 22,2 %) (gruppiertes IRS: FFHT = 0,618; $p > 0,999$; $V = 0,122$).

Zwischen der CA XII-Expression und dem Alter der Patientinnen (*Cut-off* medianes Alter = 59 Jahre) zeigte sich erneut ein Zusammenhang mit mittlerer Effektstärke (gruppiertes IRS: FFHT = 1,901; $p = 0,718$; $V = 0,345$). Auch hier wurde in der Subgruppe der älteren Patientinnen häufiger eine vermehrte Expression beobachtet (kR für IRS 6–8: + 1,4).

4.2.2 CA XII-Expression im urothelialen Vergleichsgewebe

In-situ-Karzinome

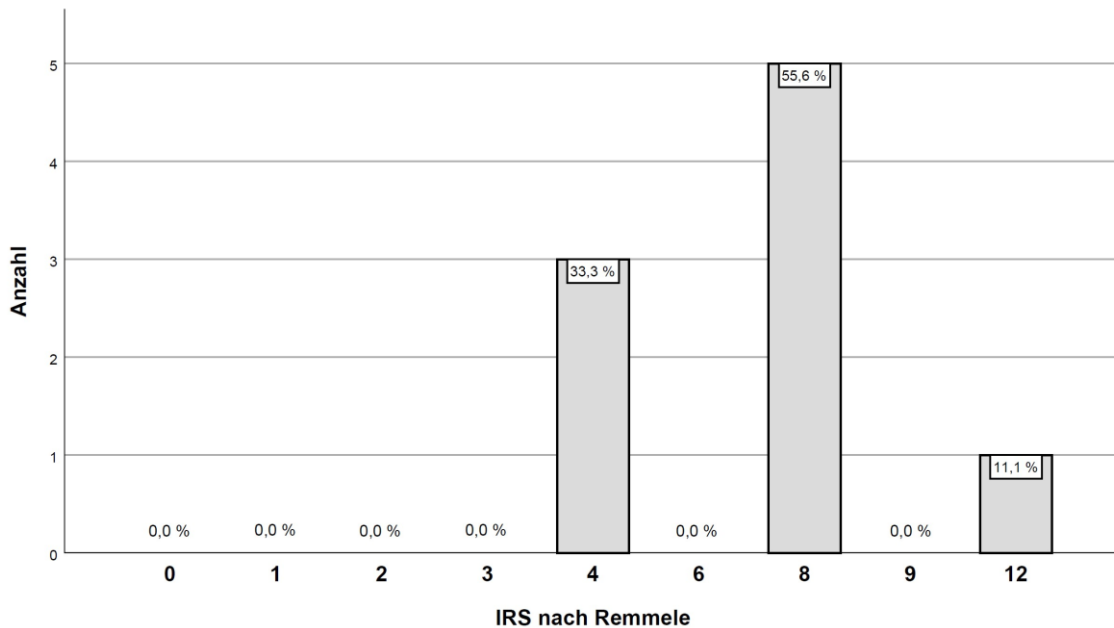


Abbildung 33: Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der urothelialen *in-situ*-Karzinome ($n = 9$) – absolute und relative Häufigkeiten der Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

Im Kollektiv der urothelialen *in-situ*-Karzinome traten die IRS-Werte 4, 8 und 12 auf (Abbildung 33). In allen 9 Fällen (100,0 %) waren über 80 % der intraepithelialen Karzinomzellen gefärbt (Tabelle 28 A), meist (55,6 %) mit vorherrschend mäßiger Färbintensität (Tabelle 28 B). Somit betrug der Modalwert 8, ebenso der Median. In 6 Präparaten (66,7 %) war starke Färbung vorhanden, meist in weniger als 10 % der Tumorzellen.

In 6 Präparaten (66,7 %) waren die neoplastischen Zellen einheitlich gefärbt (Abbildung 34), in 3 Fällen (33,3 %) variierte die Färbung innerhalb des vorliegenden Bereichs.

Die meist kleinherdig auftretenden *in-situ*-Karzinome schienen in 4 von 9 Fällen (44,4 %) etwas stärker gefärbt zu sein als das angrenzende nicht-neoplastische Urothel. In den übrigen Fällen waren die neoplastischen Zellen ähnlich stark oder etwas schwächer gefärbt.

Tabelle 28: Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der urothelialen in-situ-Karzinome – absolute (*n*) und relative Häufigkeiten für den Anteil der gefärbten Zellen [A] und die vorherrschende Färbeintensität [B], kodiert nach Remmele

A				B			
Prozentsatz positiver Zellen		<i>n</i>	(%)	vorherrschende Färbeintensität		<i>n</i>	(%)
PP 0	0 %	0	(0,0)	SI 0	keine Färbung	0	(0,0)
PP 1	1-9 %	0	(0,0)	SI 1	schwach	3	(33,3)
PP 2	10-20 %	0	(0,0)	SI 2	mäßig	5	(55,6)
	21-30 %	0	(0,0)	SI 3	stark	1	(11,1)
	31-40 %	0	(0,0)				
	41-50 %	0	(0,0)				
PP 3	51-60 %	0	(0,0)	Σ		9	(100,0)
	61-70 %	0	(0,0)				
	71-80 %	0	(0,0)				
PP 4	81-90 %	2	(22,2)				
	91-100 %	7	(77,8)				
Σ		9	(100,0)				

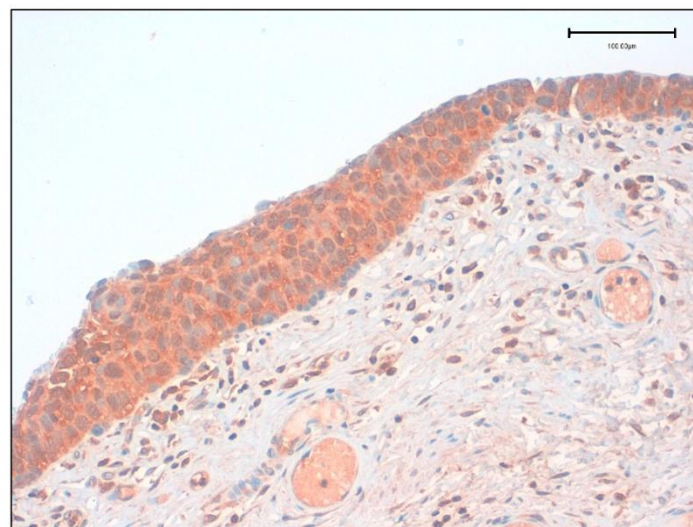


Abbildung 34: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in einem urothelialen in-situ-Karzinom (200-fach vergrößert), Maßstabsleiste: 100 µm

Weder für das Patientenalter noch für das Geschlecht erlaubte die Fallzahl eine aussagekräftige Kontingenzanalyse. Der Höchstwert IRS 12 wurde in der höchsten Altersgruppe (80–89 Jahre) beobachtet (kR: + 1,5). Bei beiden 60–69 Jahre alten Patienten wurde ein IRS 4 notiert (gruppiertes IRS und *Cut-off* medianes Alter = 73 Jahre: FFHT = 1,408; $p > 0,999$; $V = 0,408$). Das Präparat der einzigen weiblichen Patientin des Kollektivs wurde mit IRS 4 bewertet (gruppiertes IRS: FFHT = 2,641; $p = 0,444$; $V = 0,500$).

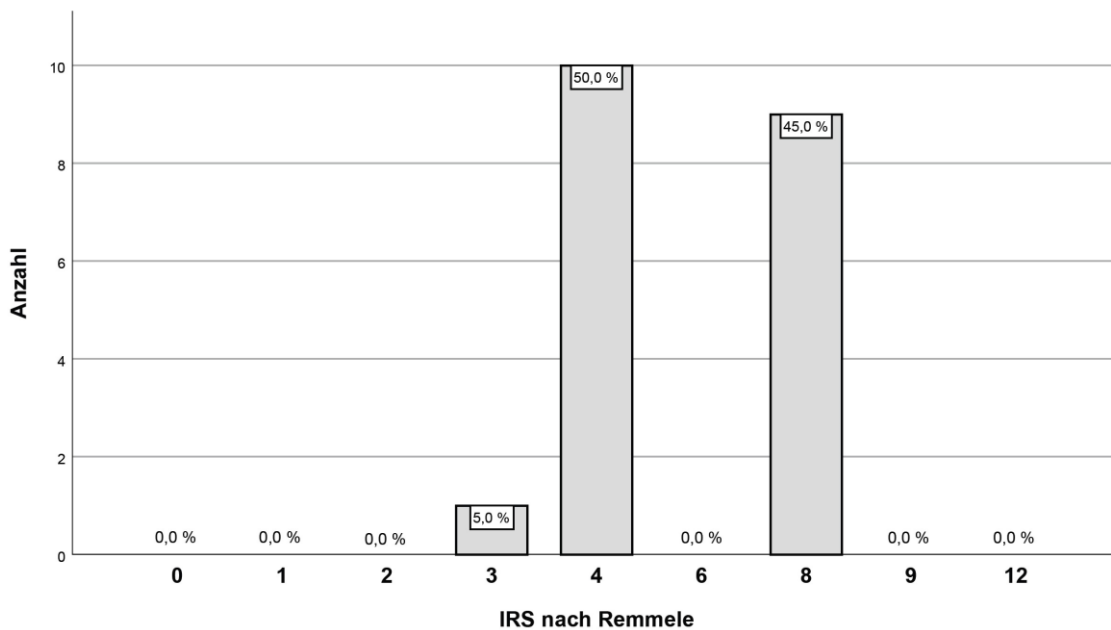
Nicht-neoplastisches Urothel

Abbildung 35: Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der nicht-neoplastischen Urothelien ($n = 20$) – absolute und relative Häufigkeiten der Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

Wie in Abbildung 35 gezeigt, waren in diesem Kollektiv die IRS-Werte 3, 4 und 8 vertreten. Modalwert und Median lagen bei IRS 4. Nur in 1 von 20 Fällen (5,0 %) war weniger als 80 % des nicht-neoplastischen Urothels gefärbt (Tabelle 29 A). Die vorherrschende Färbintensität war in den meisten Fällen (55,0 %) schwach (Tabelle 29 B). Stark gefärbte Zellen wurden in 12 Präparaten (60,0 %) beobachtet, wobei diese mehrheitlich über 10 % des Urothels ausmachten.

10 Fälle (50,0 %) wiesen ein eher homogen gefärbtes Urothel auf, in der anderen Hälfte des Kollektivs zeigte sich eine vergleichsweise heterogene Färbung.

Nur sehr selten gab es in den Präparaten Stellen, in denen alle Bereiche des Urothels ungefärbt waren. Teils war die Färbung lediglich in den basalen Anteilen zu finden (Abbildung 36 A). Erhaltene Deckzellen blieben des Öfteren ungefärbt oder wiesen eine geringere Färbung auf (Abbildung 36 B). Vereinzelt waren die Deckzellen stärker gefärbt als die übrigen Urothelzellen.

Tabelle 29: Carboanhydrase XII-Expression im Kollektiv der nicht-neoplastischen Urothelien – absolute (*n*) und relative Häufigkeiten für den Anteil der gefärbten Zellen [A] und die vorherrschende Färbeintensität [B], kodiert nach Remmele

A				B			
Prozentsatz positiver Zellen		<i>n</i>	(%)	vorherrschende Färbeintensität		<i>n</i>	(%)
PP 0	0 %	0	(0,0)	SI 0	keine Färbung	0	(0,0)
PP 1	1-9 %	0	(0,0)	SI 1	schwach	11	(55,0)
PP 2	10-20 %	0	(0,0)	SI 2	mäßig	9	(45,0)
	21-30 %	0	(0,0)	SI 3	stark	0	(0,0)
	31-40 %	0	(0,0)				
	41-50 %	0	(0,0)				
PP 3	51-60 %	0	(0,0)	Σ		20	(100,0)
	61-70 %	1	(5,0)				
	71-80 %	0	(0,0)				
PP 4	81-90 %	3	(15,0)				
	91-100 %	16	(80,0)				
Σ		20	(100,0)				

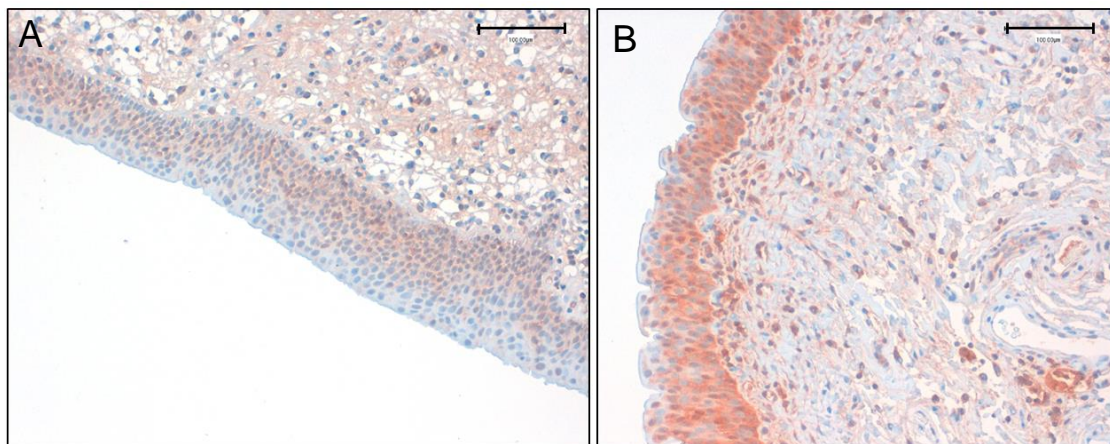


Abbildung 36: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII in nicht-neoplastischen Urothelzellen ([A] und [B], je 200-fach vergrößert), Maßstabsleiste: 100 µm

7 Präparate enthielten stellenweise hyperplastisches Urothel. Diese Fälle zeigten tendenziell eine kräftigere Färbung (FYT für den gruppierten IRS: $p = 0,160$; $V = 0,390$). Die auf 1 Präparat vorhandenen kleinen von-Brunn-Epithelnester waren ebenso gefärbt wie das übrige Urothel. Bindegewebe und Muskulatur blieben in den Flächenschnitten meist ungefärbt.

In allen 9 Fällen mit zusätzlich auf dem Objektträger vorliegendem *in-situ*-Karzinom wies das nicht-neoplastische Urothel einen hohen Anteil positiver Zellen (PP 4) auf (kR: + 0,9). Eine vorherrschend mäßige Färbeintensität fand sich dagegen etwas seltener als bei den Fällen ohne begleitendes *in-situ*-Karzinom (kR: - 0,9) (FYT für den gruppierten IRS: $p = 0,406$; $V = 0,212$).

Die 12 Fälle von Patienten mit einem bestehenden Karzinom extravasikalen Ursprungs zeigten tendenziell eine etwas geringere Färbung im nicht-neoplastischen Urothel (FYT für den gruppierten IRS: $p=0,362$; $V=0,287$). In 4 Fällen waren die invasiven Tumorverbände mit angeschnitten. Die Karzinomzellen wiesen dabei eine deutliche Färbung auf (Abbildung 37). Ein Einfluss der Tumordinfiltrate auf die CA XII-Expression des darüberliegenden Urothels ließ sich nicht ableiten.

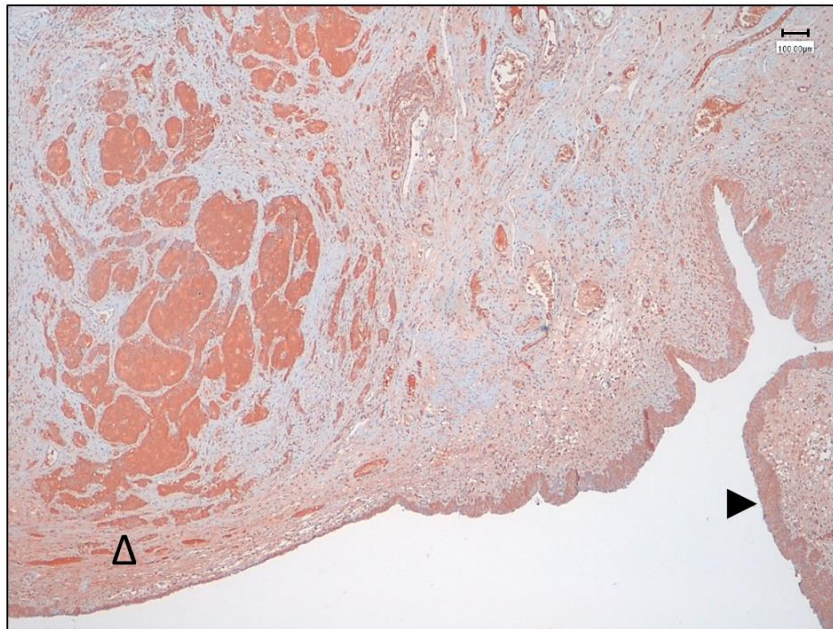


Abbildung 37: Immunhistochemische Detektion der Carboanhydrase XII im Harnblasengewebe Nicht-neoplastisches Urothel (▶) und miterfasste Tumorzellverbände eines in die Detrusormuskulatur infiltrierenden Prostatakarzinoms (Δ) (40-fach vergrößert), Maßstabsleiste: 100 µm

Die niedrigste und die höchste Altersgruppe des Kollektivs (50–59 und 80–89 Jahre) wiesen gleich häufig einen hohen Anteil positiver Zellen (PP 4) sowie eine vorherrschend mäßige Färbeintensität auf. In der Gruppe der 70–79 Jahre alten Patienten war der IRS 6–8 etwas unterrepräsentiert (kR: - 1,5) (gruppiertes IRS und *Cut-off* medianes Alter = 71,50 Jahre: FYT: $p > 0,999$; $V = 0,101$).

Die 4 Präparate von Patientinnen waren alle vollständig (kR: + 0,5) und tendenziell etwas stärker gefärbt (kR: + 1,3) als die der 16 männlichen Patienten (FYT für den gruppierten IRS: $p = 0,285$; $V = 0,302$).

4.3 Gegenüberstellung der Kollektive

Nachfolgend ist die Höhe der CA XII-Expression in den untersuchten Kollektiven vergleichend gegenübergestellt. Dabei ist die große Differenz der Fallzahlen zwischen den Karzinom- und den Vergleichskollektiven zu beachten.

4.3.1 Gynäkologische Kollektive

Tabelle 30: Gegenüberstellung der Carboanhydrase XII-Expression in den gynäkologischen Kollektiven – absolute (*n*) und relative Häufigkeiten für die gruppierten Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

		IRS 0-2	IRS 3-4	IRS 6-8	IRS 9-12	Σ
Ovarialkarzinom	<i>n</i>	29	117	167	79	392
	(%)	(7,4)	(29,8)	(42,6)	(20,2)	(100,0)
Borderlinetumor	<i>n</i>	4	10	5	0	19
	(%)	(21,1)	(52,6)	(26,3)	(0,0)	(100,0)
nicht-neoplastisches Epithel	<i>n</i>	14	3	2	0	19
	(%)	(73,7)	(15,8)	(10,5)	(0,0)	(100,0)

Die CA XII-Expression unterschied sich statistisch auffällig zwischen allen drei Kollektiven. Tabelle 30 zeigt die Verteilung der gruppierten IRS-Werte (Ovarialkarzinom vs. Borderlinetumor: FFHT = 12,224; $p=0,004$; $V=0,173$; Ovarialkarzinom vs. nicht-neoplastisches Epithel: FFHT = 46,621; $p < 0,001$; $V=0,457$; Borderlinetumor vs. nicht-neoplastisches Epithel: FFHT = 10,457; $p=0,006$; $V=0,528$). Zu erkennen ist eine Abstufung der prozentualen Häufigkeiten mit vermehrter Expression bei höherem Malignitätsniveau. Die Verteilung der zugrundeliegenden Färbeparameter (PP, SI) ist der Abbildung 38 zu entnehmen. Es ist insbesondere festzuhalten, dass die Ovarialkarzinomzellen häufiger CA XII-positiv waren als die Epithelzellen in den Vergleichspräparaten (Abbildung 38 A). Eine vorherrschend starke Färbeintensität wurde zudem nur im Karzinomkollektiv beobachtet (Abbildung 38 B).

Bei der Gegenüberstellung von Ovarialkarzinomen und Borderlinetumoren wurde insbesondere das häufigere Auftreten eines hohen Prozentsatzes positiver Zellen (PP 4) im Karzinomgewebe festgestellt (72,2 % vs. 5,3 %) (kR: + 6,2). Sowohl für den *Cut-off* IRS > 2 (FYT: $p=0,056$; $V=0,106$) als auch für den *Cut-off* IRS > 8 (FYT: $p=0,032$; $V=0,107$) fand sich eine vermehrte CA XII-Expression im Karzinomkollektiv.

Der Vergleich der Ovarialkarzinome mit den nicht-neoplastischen Epithelzellen ergab ebenfalls eine höhere CA XII-Expression im Karzinomgewebe. Das nicht-neoplastische Gewebe zeigte auffallend häufig einen IRS 0–2 (kR: + 9,2) (FYT für den *Cut-off* IRS > 2: $p < 0,001$; $V=0,455$). Ein hoher Anteil positiver Zellen (PP 4) wurde nur in den

Karzinomen beobachtet (kR: + 6,6), ebenso eine vorherrschend starke Färbeintensität (kR: +2,2) und damit ein IRS 9–12 (FYT für den *Cut-off* IRS > 8: $p = 0,032$; $V = 0,107$). Auch zwischen den Borderlinetumoren und dem nicht-neoplastischen Epithel lagen statistisch auffällige Expressionsunterschiede vor. Die prozentuale Häufigkeit einer vorherrschend mäßigen Färbeintensität war im Tumorgewebe höher als im Vergleichsepithel (SI 2: 57,9 % vs. 15,8 %) (kR: + 2,7). Der *Cut-off* IRS > 2 zeigte erneut eine höhere CA XII-Expression im neoplastischen Gewebe (FYT: $p = 0,003$; $V = 0,527$). Im Kollektiv der Borderlinetumoren betrug der IRS maximal 8, im Kollektiv der nicht-neoplastischen Ovarien maximal 6. Ein IRS > 8 wurde nur für die Karzinompräparate dokumentiert.

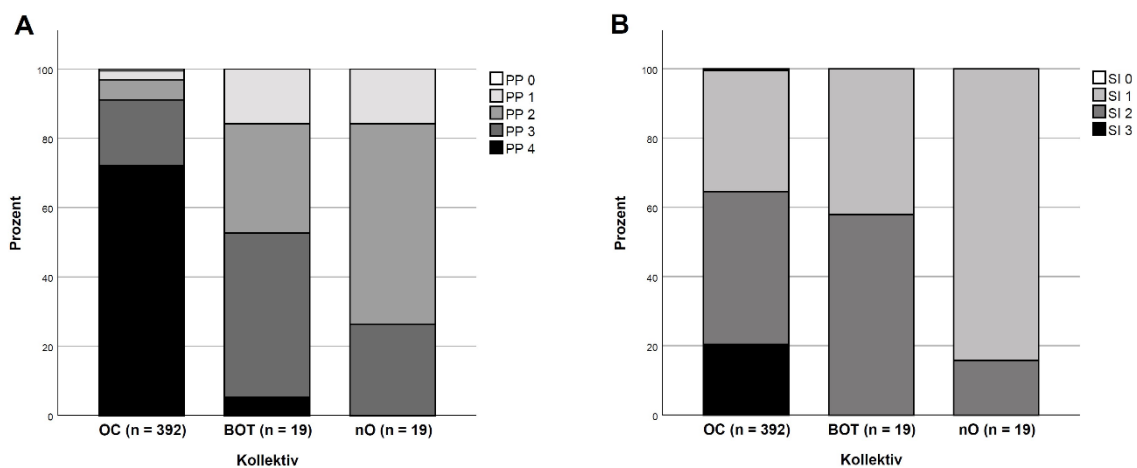


Abbildung 38: Gegenüberstellung der Carboanhydrase XII-Expression in den gynäkologischen Kollektiven – relative Häufigkeiten für die nach Remmele kodierte Werte des Prozentsatzes positiver Zellen (PP) [A] und der vorherrschenden Färbeintensität (SI) [B] innerhalb der Ovariätkarzinome (OC), ovariellen Borderlinetumoren (BOT) und nicht-neoplastischen Ovarien (nO)

Gemäß der angenommenen Karzinogenese der LGSOCs ($n = 40$) über die Zwischenstufe der serösen Borderlinetumoren ($n = 14$) wurde zusätzlich ein Vergleich der entsprechenden Subgruppen durchgeführt. Es zeigten sich weiterhin statistisch auffällige Unterschiede der CA XII-Expression zwischen allen drei Kollektiven. Die Verteilung der gruppierten IRS-Werte ist in Abbildung 39 dargestellt (FFHT = 42,403; $p < 0,001$; $V = 0,567$). Eine höhere CA XII-Expression wurde analog zu den vollständigen Kollektiven vermehrt im neoplastischen Gewebe beobachtet, insbesondere in den invasiven Karzinomen.

Für den *Cut-off* IRS > 2 gab es einen statistisch auffälligen Unterschied zwischen den LGSOCs und dem nicht-neoplastischen Gewebe (FYT: $p < 0,001$; $V = 0,722$) sowie zwischen den serösen Borderlinetumoren und dem nicht-neoplastischen Gewebe (FYT:

$p=0,005$; $V=0,517$). Keines der Kollektive enthielt den Höchstwert IRS 12. In 2 Präparaten (5,0 %) der LGSOCs zeigte sich jedoch ein IRS 9. Auch für den *Cut-off* IRS > 8 war die CA XII-Expression damit in den Karzinomen höher (kR: + 0,9 beziehungsweise + 1,0) als in den serösen Borderlinetumoren (FYT: $p > 0,999$; $V=0,116$) und den nicht-neoplastischen Epithelzellen (FYT: $p > 0,999$; $V=0,129$).

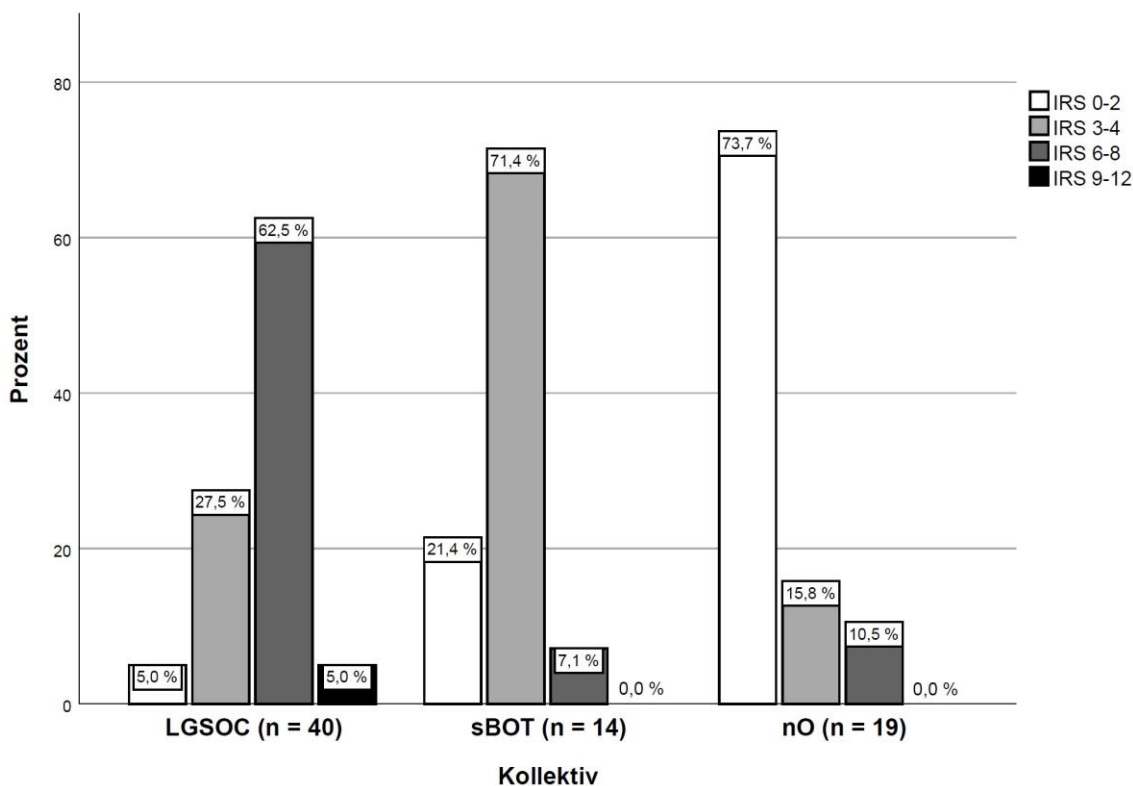


Abbildung 39: Gegenüberstellung der Carboanhydrase XII-Expression in den gemäß der Karzinogenese stratifizierten gynäkologischen Kollektiven – relative Häufigkeiten für die gruppierten Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele innerhalb der low-grade serösen Ovarialkarzinome (LGSOC), serösen ovariellen Borderlinetumoren (sBOT) und nicht-neoplastischen Ovarien (nO)

Der Vergleich von HGSOCS ($n = 267$) und nicht-neoplastischem Epithel ($n = 19$) gemäß der möglichen *de-novo*-Genese des Karzinoms erbrachte ebenfalls eine statistisch auffallend gesteigerte CA XII-Expression im malignen Gewebe (gruppiertes IRS: FFHT = 45,651; $p < 0,001$; $V = 0,521$). Der Zusammenhang zwischen der Expression und der Malignität zeigte sich sowohl für den *Cut-off* IRS > 2 (FYT: $p < 0,001$; $V = 0,519$) als auch für den *Cut-off* IRS > 8 (FYT: $p = 0,009$; $V = 0,145$).

4.3.2 Urologische Kollektive

Tabelle 31: Gegenüberstellung der Carboanhydrase XII-Expression in den urologischen Kollektiven – absolute (*n*) und relative Häufigkeiten für die gruppierten Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele

		IRS 0-2	IRS 3-4	IRS 6-8	IRS 9-12	Σ
Harnblasenkarzinom	<i>n</i>	3	82	100	49	234
	(%)	(1,3)	(35,0)	(42,7)	(20,9)	(100,0)
<i>in-situ</i>-Karzinom	<i>n</i>	0	3	5	1	9
	(%)	(0,0)	(33,3)	(55,6)	(11,1)	(100,0)
nicht-neoplastisches Urothel	<i>n</i>	0	11	9	0	20
	(%)	(0,0)	(55,0)	(45,0)	(0,0)	(100,0)

Tabelle 31 zeigt die Häufigkeiten der gruppierten IRS-Werte für die drei Kollektive (Harnblasenkarzinom vs. *in-situ*-Karzinom: FFHT = 1,248; $p = 0,848$; $V = 0,059$; Harnblasenkarzinom vs. nicht-neoplastisches Urothel: FFHT = 7,322; $p = 0,060$; $V = 0,160$; *in-situ*-Karzinom vs. nicht-neoplastisches Urothel: FFHT = 2,738; $p = 0,281$; $V = 0,320$). Die Verteilung der PP- und SI-Werte ist in Abbildung 40 dargestellt. In den Präparaten aller Kollektive war die große Mehrheit der Zellen CA XII-positiv (Abbildung 40 A). Eine vorherrschend starke Färbeintensität und damit die IRS-Werte 9–12 wurden nur im neoplastischen Gewebe beobachtet (Abbildung 40 B).

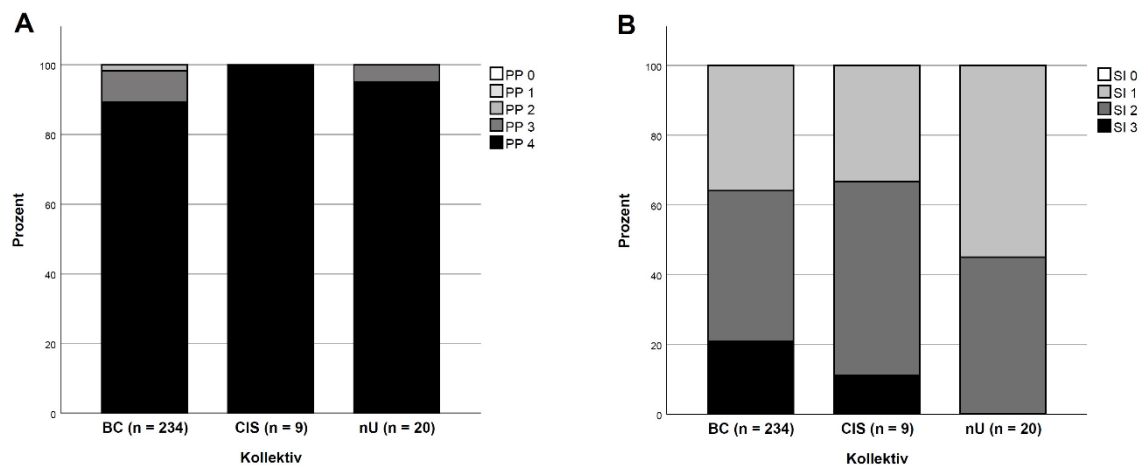


Abbildung 40: Gegenüberstellung der Carboanhydrase XII-Expression in den urologischen Kollektiven – relative Häufigkeiten für die nach Remmele kodierten Werte des Prozensatzes positiver Zellen (PP) [A] und der vorherrschenden Färbeintensität (SI) [B] innerhalb der Harnblasenkarzinome (BC), urothelialen *in-situ*-Karzinome (CIS) und nicht-neoplastischen Urothelien (nU)

Die CA XII-Expression unterschied sich nicht statistisch auffällig zwischen den muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen und den *in-situ*-Karzinomen. Im Karzinomkollektiv wurde ein minimaler IRS von 2 dokumentiert (1,3 % der Fälle), wohingegen in allen *in-situ*-Karzinomen mehr als 80 % der Zellen gefärbt waren (kR: + 1,0) und der minimale IRS bei 4 lag (FYT für den *Cut-off* IRS > 2: $p > 0,999$; $V = 0,022$). Bei den invasiven Karzinomen war die prozentuale Häufigkeit einer vorherrschend starken Färbung und damit auch die der sehr hohen IRS-Werte größer (kR: + 0,7) (FYT für den *Cut-off* IRS > 8: $p = 0,690$; $V = 0,046$).

Auch verglichen mit dem nicht-neoplastischen Urothel war das Karzinomgewebe stärker gefärbt. Während der Expressionsunterschied für den *Cut-off* IRS > 2 nicht statistisch auffällig war (FYT: $p > 0,999$; $V = 0,032$), führte das Fehlen einer vorherrschend starken Färbung im nicht-neoplastischen Vergleichsgewebe (kR: - 2,3) zu einer statistisch auffallend höheren CA XII-Expression der muskelinvasiven Karzinome (FYT für den *Cut-off* IRS > 8: $p = 0,017$; $V = 0,143$).

Das nicht-neoplastische Gewebe wies häufiger eine vorherrschend schwache Färbeintensität auf als die *in-situ*-Karzinome (kR: + 1,1). In beiden Kollektiven lag der minimale IRS über dem Wert 2. Der maximale IRS hatte bei den nicht-neoplastischen Urothelzellen den Wert 8, bei den *in-situ*-Karzinomen den Wert 12 (FYT für den *Cut-off* IRS > 8: $p = 0,310$; $V = 0,282$).

Das urotheliale *in-situ*-Karzinom ist eine obligate Präkanzerose und kann als Vorläuferläsion der muskelinvasiven Harnblasenkarzinome angesehen werden [6]. In Abbildung 41 wurde den Vergleichskollektiven das Subkollektiv der MIUCs ($n = 225$) gegenübergestellt (FFHT = 8,242; $p = 0,201$; $V = 0,118$). Die zuvor beschriebenen Unterschiede der CA XII-Expression galten auch für das stratifizierte Karzinomkollektiv ohne Berücksichtigung der 9 Fälle von reinen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen.

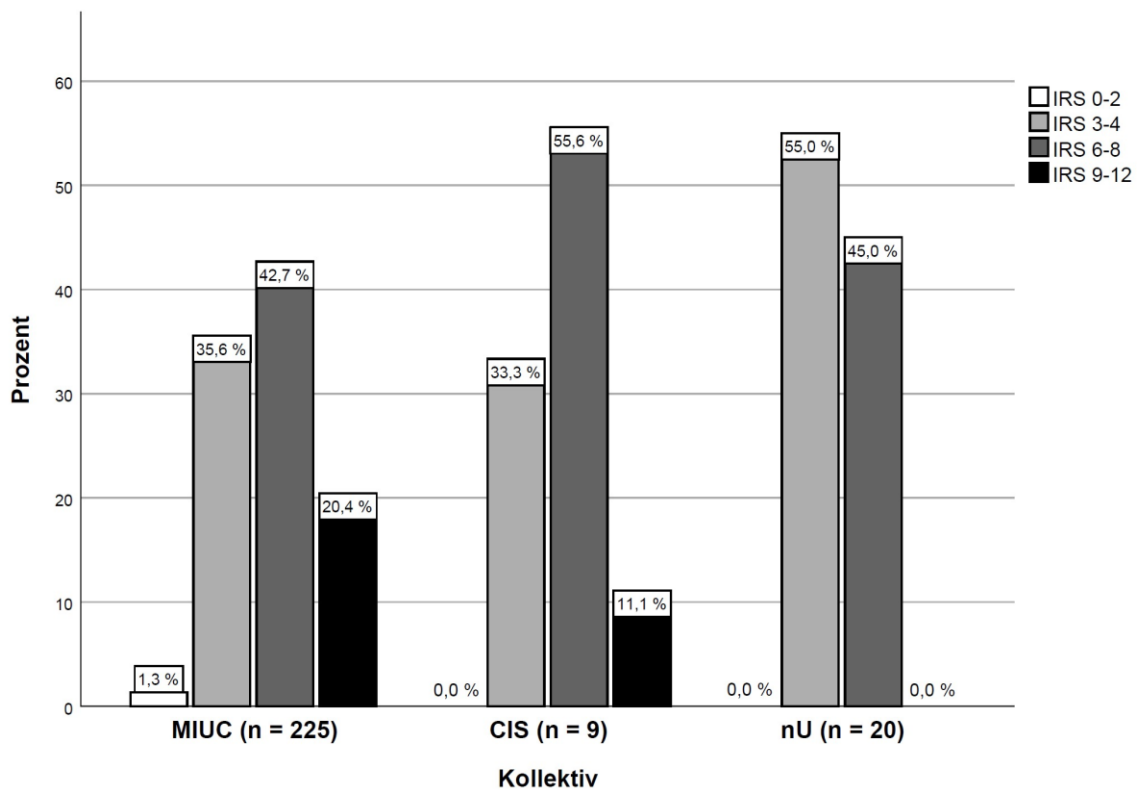


Abbildung 41: Gegenüberstellung der Carboanhydrase XII-Expression in den gemäß der Karzinogenese stratifizierten urologischen Kollektiven – relative Häufigkeiten für die gruppierten Werte des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele innerhalb der muskelinvasiven Urothelkarzinome (MIUC), urothelialen in-situ-Karzinome (CIS) und nicht-neoplastischen Urothelien (nU)

5 Diskussion

Neoplastische Zellen erhalten durch metabolische Veränderungen Selektionsvorteile. Insbesondere bei deutlich gesteigerter Glykolyserate sinkt jedoch deren intrazellulärer pH-Wert. Die Aufrechterhaltung der Zellfunktion und die weitere Proliferation wird unter anderem durch Überexpression des pH-regulierenden Ektoenzym CA XII gewährleistet [36, 37, 40, 48]. Dieses kann zugleich zur extrazellulären Azidose im Mikromilieu beitragen und auch hierüber die Tumorausbreitung fördern [39, 78, 80].

CA XII ist folglich ein attraktives Antigen für die zielgerichtete Tumorthherapie durch niedermolekulare Wirkstoffe [52, 87] oder inhibierende Antikörper [83, 88, 89] beziehungsweise deren Fab-Fragmente [90], wahlweise konjugiert mit weiteren Therapeutika [91, 93].

Trotz nachgewiesener Hochregulation in zahlreichen Neoplasien wird CA XII auch in verschiedenen Normalgeweben exprimiert [38, 53, 63]. Bisherige Studien fokussierten sich daher vor allem auf das tumorspezifischere Isoenzym CA IX [48, 51]. Entsprechend lagen zur CA XII-Enzymexpression im ovariellen und urothelialen Gewebe nur spärliche Daten vor [59, 63, 101, 103, 106].

Ovarialkarzinome und muskelinvasive Harnblasenkarzinome sind jedoch aggressive Tumorentitäten mit häufig limitierten Therapiemöglichkeiten und schlechter Prognose [5-8]. Um durch Erweiterung der Datenbasis zu Fortschritten im Umgang mit diesen Entitäten beizutragen, wurde deren immunhistochemisches CA XII-Expressionsprofil nun an einer größeren Fallzahl untersucht und umfassender ausgewertet. Die zusätzliche Analyse nicht-invasiver Tumoren sowie nicht-neoplastischer Gewebe aus Ovar und Harnblase lieferte ergänzende Informationen zur Kontingenz von CA XII-Expression und Tumorbilogie. Sie diene auch der Evaluation von CA XII als diagnostischer Biomarker in diesen Organen. Zudem erfolgte die Enzymdetektion mithilfe des monoklonalen Antikörpers 6A10. Durch die Fähigkeit zur Bindung der nativen CA XII-Domäne auf der Oberfläche vitaler Zellen und die effiziente Hemmung der katalytischen Aktivität besitzt dieser großes diagnostisches und therapeutisches Potenzial *in vivo* [76, 82, 83, 93, 95]. Für die vorliegende Arbeit kam der Antikörper erstmals auf FFPE-Gewebe zum Einsatz. Als Standardmaterial für die mikroskopische Untersuchung von Präparaten hat es einen zentralen Stellenwert in der pathologischen Routinediagnostik. Die immunhistochemische Expressionsanalyse an FFPE-Material ist, auch im Rahmen der Forschung, eine bewährte Methode zur Untersuchung von Biomarkern mit diagnostischem, prognostischem beziehungsweise prädiktivem Wert. Der Antikörper wurde von erfahrenen Mitarbeiterinnen des Pathologischen Instituts der LMU München für die angewandte Methode validiert.

5.1 Immunhistochemisches CA XII-Expressionsprofil der Karzinome

In 99,5 % der analysierten Ovariakarzinome (390 von 392 Fällen) und in 100 % der muskelinvasiven Harnblasenkarzinome (234 von 234 Fällen) wurden CA XII-positive Tumorzellen detektiert. Dabei wies meist die große Mehrheit der Karzinomzellen ein intensives Immunsignal auf. Dieses Ergebnis stützte bereits die Hypothese, dass CA XII auch für die hier untersuchten Tumorentitäten von Relevanz ist.

Dennoch variierte das Ausmaß der Expression zwischen den Patientenfällen. Auch intratumoral war häufig ein auffallend heterogenes Expressionsmuster zu beobachten. Die zeitliche und räumliche Heterogenität ist ein zentrales Charakteristikum von Neoplasien, das sowohl deren Diagnostik als auch die Therapie erschweren kann. Ursächlich können unter anderem die wechselnden Umgebungsbedingungen und die jeweilige Adaptation der betroffenen Tumorzellen durch entsprechend regulierte Genexpression sein [33, 115].

Insbesondere bei aggressivem Tumorwachstum finden sich im Karzinomgewebe multiple hypoxische Regionen [21, 27]. CA XII gilt als Hypoxie-induzierbar, wenngleich dieser Mechanismus im Vergleich zu CA IX eher schwach ausgeprägt ist [60, 63, 64, 68, 76]. Der Zusammenhang von CA XII und zellulärer Oxygenierung wurde in dieser Arbeit nicht systematisch untersucht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien schien die Verteilung und Ausprägung der CA XII-Expression innerhalb der Präparate jedoch nicht mit dem Oxygenierungslevel zu korrelieren [59, 101]. Ein konfundierender Faktor kann hierbei die Halbwertszeit des Enzyms sein [116]. Zu berücksichtigen ist auch, dass sich immunhistochemisch gefärbtes FFPE-Gewebe, insbesondere bei Verwendung von TMAs, nicht optimal zur Analyse der Hypoxie eignet [33, 110].

Zudem ist CA XII, ebenso wie CA IX, an verschiedenen zellulären Signalwegen beteiligt und wird durch diverse Faktoren beeinflusst, die in den untersuchten Tumorentitäten verändert sein können [70-72, 80, 102, 109, 117]. Die beobachtete Heterogenität der Expression begründet sich dabei vermutlich maßgeblich im äußerst variablen Genotyp der Karzinomzellen. Molekulargenetische und epigenetische Alterationen betreffen die jeweilige Zelle sowie die nachfolgenden Subklone [33, 115]. Insbesondere muskelinvasive Harnblasenkarzinome weisen eine ausgesprochen hohe Mutationslast auf. Diese können sich phänotypisch in Form verschiedener Differenzierungsmuster beziehungsweise histologischer Subtypen manifestieren [6, 10, 17, 22] und auch einen veränderten zellulären Metabolismus bedingen [37]. Tatsächlich wurde für das Harnblasenkarzinomkollektiv eine etwas höhere Heterogenität dokumentiert als für das Ovariakarzinomkollektiv.

Zur Verdeutlichung der engen Assoziation von genomischer Instabilität und metabolischer Umprogrammierung seien beispielhaft Mutationen oder die epigenetische Inaktivierung des TP53-Gens genannt, welches für das Tumorsuppressorprotein p53 kodiert. TP53 ist das am häufigsten veränderte Gen in Tumoren, da der Funktionsverlust von p53 einen enormen Selektionsvorteil für die Tumorzelle bedeutet. So reguliert p53 normalerweise den Zellzyklus, DNA-Reparaturmechanismen und auch Signalkaskaden zur gezielten Einleitung der Apoptose bei irreparablen DNA-Schäden oder bei zellulären Stressoren wie der Azidose. Darüber hinaus fördert p53 als Transkriptionsfaktor die oxidative Energiegewinnung und hemmt die Glykolyse durch entsprechende Genregulation. Die aberrante Expression von TP53 erhöht somit nicht nur die Instabilität des Genoms und damit die Proliferationsrate, sondern auch über direkte Mechanismen die Glykolyse der Tumorzellen mit konsekutiver Induktion von pH-Regulatoren wie CA XII [23, 26, 28, 30]. Eine aberrante TP53-Expression findet sich in einem Großteil der Ovariakarzinome, insbesondere in HGSOCS, und auch häufig in gering differenzierten Harnblasenkarzinomen [5, 8, 17].

Interessanterweise wurde für beide Karzinomkollektive eine sehr ähnliche Verteilung der Färbintensität notiert. In den Ovariakarzinompräparaten fanden sich häufiger CA XII-negative Tumorzellen als in den Harnblasenkarzinompräparaten. Es ist anzunehmen, dass in diesen Zellen andere pH-Regulationsmechanismen hochreguliert waren.

Für beide Tumorentitäten wurde bereits mehrfach eine hohe Expression des Isoenzym CA IX beschrieben [98-103]. Durch den kombinierten Einsatz eines anti-CA IX- und eines anti-CA XII-Antikörpers könnte deren diagnostischer Wert vermutlich weiter gesteigert werden. So untersuchten beispielsweise Tafreshi *et al.* Lymphknotenmetastasen von Mammakarzinomen auf beide Antigene und erreichten hierdurch eine 100 %-ige Detektion der Fälle [92]. Zudem ist die gegenseitige Kompensation der enzymatischen Aktivität bekannt, weshalb auch eine kombinierte Inhibition von CA IX und CA XII lohnend erscheint [47, 68, 76].

In den immunhistochemischen Vergleichsstudien lag das CA XII-Expressionslevel beider Tumorentitäten niedriger.

Eine häufig zitierte Publikation zur CA XII-Expression in Ovariakarzinomen stammt von Hynninen *et al.* aus dem Jahr 2006. Aus deren Balkendiagramm lässt sich eine Positivität für 41 der 57 untersuchten Karzinome ableiten. Die Bewertung der Expressionshöhe erfolgte nur anhand der Färbintensität, ohne Einbezug des Prozentsatzes positiver Zellen. Interessanterweise wies dabei keines der Ovariakarzinome eine vorherrschend starke Expression auf [101].

Ivanov *et al.* dokumentierten in 7 von 16 Ovariakarzinomen eine fokale CA XII-Expression, definiert durch eine immunhistochemische Färbung von weniger als 40 %

der Tumorzellen. In der gleichen Studie exprimierten 12 von 14 Urothelkarzinomen CA XII, jedoch ebenfalls nur fokal und hier mit geringer Intensität [63]. In deren Publikation findet sich keine Angabe zur Kollektivzusammensetzung. Aufgrund der epidemiologischen Häufigkeitsverteilung ist anzunehmen, dass im Gegensatz zur vorliegenden Studie auch *low-grade* Urothelkarzinome analysiert wurden.

In beiden genannten Arbeiten kam der gleiche polyklonale Antikörper zum Einsatz. Dieser wurde mithilfe von rekombinantem CA XII hergestellt [118]. Der Antikörper der vorliegenden Arbeit wurde dagegen anhand von nativem Enzym generiert, welches die natürlichen posttranslationalen Modifikationen aufwies [65, 105]. Im Grunde wäre für monoklonale Antikörper ein schwächeres Immunsignal zu erwarten, da diese nur ein bestimmtes Epitop des Antigens binden [112]. In dieser Arbeit wurde jedoch eine verhältnismäßig hohe Konzentration und Inkubationsdauer der Primärantikörper sowie ein äußerst sensitives Detektionssystem verwendet.

Auch die Autoren des *Human Protein Atlas* untersuchten eine kleine Anzahl von Ovarial- und Urothelkarzinomen immunhistochemisch. Aufgrund der Applikation mehrerer Antikörper wurden unterschiedliche Expressionslevel angegeben. Die Urothelkarzinome exprimierten im Allgemeinen mehr CA XII als die Ovarialkarzinome. Für beide Entitäten war die Zahl positiver Fälle jedoch geringer als in der vorliegenden Studie [103]. Eine schwache Immunfärbung von weniger als einem Viertel der Tumorzellen wurde dabei offenbar als CA XII-negativ gewertet.

Für die Detektion von intakten Karzinomzellen mit einem anti-CA XII-Antikörper ist die Expression auf der Zelloberfläche entscheidend. Dies gilt sowohl für die therapeutische Anwendung *in vivo* als auch für die *in-vitro*-Diagnostik, beispielsweise im Rahmen der sogenannten *Liquid Biopsy*. Hierbei werden Körperflüssigkeiten unter anderem auf zirkulierende Tumorzellen untersucht, wodurch auch dem Problem der Tumorerogenität begegnet werden kann [115, 119]. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde mithilfe des hier verwendeten Antikörpers bereits der Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen durchflusszytometrisch untersucht. Dabei konnte auf den vitalen Tumorzellen aller 22 Fälle eine deutliche CA XII-Expression nachgewiesen werden [97].

Die CA XII-Oberflächenexpression war in den Präparaten der vorliegenden Arbeit häufig nicht gut abgrenzbar und konnte daher nicht separat ausgewertet werden. Die Methode der Immunhistochemie ist hierfür nicht optimal geeignet [86, 120]. Beeinflusst wird die Quantifizierung der Expression unter anderem von der Schnittebene des Präparates. Power *et al.* berichteten ebenfalls von einer erschwerten immunhistochemischen Detektion der CA XII-Oberflächenexpression [121]. Zudem sind bei der Herstellung immunhistochemisch gefärbter FFPE-Präparate vor allem extrazelluläre Epitope anfällig für Strukturveränderungen. Bei unvollständiger Antigendemaskierung ist insbesondere

die Bindung von Antikörpern beeinträchtigt, die mit nativem Enzym generiert wurden [110, 120]. In dieser Arbeit ist das CA XII-Expressionsprofil somit unter Berücksichtigung intrazellulärer Immunsignale dargestellt.

Bei Annahme einer spezifischen Bindung der enzymatischen CA XII-Domäne durch den Antikörper stellt sich die Frage nach den funktionellen Korrelaten der subzellulären Enzymlokalisationen und deren Bedeutung für die Tumorbilogie. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die Verwendung von CA XII als Biomarker in der pathologischen Diagnostik von Relevanz.

Es ist allgemein anerkannt, dass Membranproteine in abweichender Lokalisation detektiert werden können [122-124]. Auch für die Transmembran-CAs finden sich in der bestehenden Literatur zahlreiche Berichte einer zytoplasmatischen oder nukleären Immunfärbung, die zuvor genannten Vergleichsstudien eingeschlossen. Teils zeigte sich ein Zusammenhang der Lokalisation mit pathologischen oder klinischen Parametern [92, 108, 125-130]. Häufig gehen die Autoren jedoch nicht näher auf diese Beobachtung ein. Entsprechende Untersuchungen lagen hauptsächlich für das Isoenzym CA IX vor [131].

Die Zytoplasmafärbung ergibt sich vermutlich durch die Detektion von CA XII in verschiedenen Transport- oder Speichervesikeln, Stationen des Endomembransystems und Komplexen mit Partnerproteinen zur Teilnahme an intrazellulären Signalwegen. Der jeweilige Anteil an der Immunfärbung ist unklar, da sich die Studien meist auf einen Aspekt fokussierten. Zudem variiert die Zusammensetzung der zellulären Prozesse, wie zuvor beschrieben, aufgrund der molekularen Heterogenität und sich verändernder Umgebungsfaktoren.

Bei vermindertem Bedarf wird die Membranexpression beispielsweise durch die Bildung von endozytotischen Vesikeln und der Fusion mit frühen Endosomen herunterreguliert [122, 129]. Intrazellulär kann das Enzym vorübergehend gespeichert werden, um gegebenenfalls erneut eine rasche Expression zu ermöglichen. Christianson *et al.* zeigten für CA IX eine bevorzugte Endozytose über Lipidflöße der Plasmamembran. Bei Azidose wurde CA IX vermehrt in die Zelle aufgenommen [130, 132].

Das Enzym kann zudem zur Regeneration internalisiert werden. So wurde für CA IX auch die klassische, Clathrin-vermittelte Endozytose und der verhältnismäßig langsame Transport zum perinukleär lokalisierten Recycling-Kompartiment gezeigt [133]. Hierdurch könnte sich möglicherweise auch das für CA XII beobachtete, perinukleär betonte Immunsignal einiger Zellen erklären.

Die Degradation des Enzyms erfolgt, zumindest partiell, ebenfalls über Endozytose. Miki *et al.* kennzeichneten an der Plasmamembran lokalisiertes CA XII mit einem Fluorophor und beobachteten in den darauffolgenden Stunden ein zunehmend intrazelluläres Signal. Dieses stimmte mit der Lokalisation von Lysosomen überein, sodass die Autoren

den endogenen Abbau von CA XII postulierten [116]. Laut Lin *et al.* ist jedoch die Abspaltung der Ektodomäne in den Extrazellularraum (sog. *Shedding*) der Hauptmechanismus für die Degradation von CA XII. Die Autoren fanden in ihrer Studie keinen Hinweis für die intrazelluläre Zersetzung des Enzyms [64]. In beiden Studien wurden Lungenkarzinomzellen untersucht.

Da die abgespaltene Ektodomäne katalytisch aktiv bleibt, nutzen Tumorzellen das *Shedding* auch zur Sekretion von löslichem Enzym [64, 133]. Dieser Mechanismus kann stark hochreguliert werden und trägt vermutlich wesentlich zur Ansäuerung des Tumormilieus bei [64].

Zudem wurde für CA IX bereits gezeigt, dass die Ektodomäne in den benachbarten Zellen, am ehesten durch Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion, eine vermehrte Enzymexpression induzieren kann [134]. Auch in der Zelle selbst wird das degradierte Transmembranprotein nachproduziert [64]. Das zytoplasmatische Immunsignal könnte somit auch auf die Detektion von neu synthetisierten Enzymen zurückzuführen sein [54, 118, 125].

Deren Funktion und subzelluläre Lokalisation wird unter anderem durch alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikationen gesteuert [54-58, 135]. Beide Prozesse können durch molekulare Alterationen beeinträchtigt sein. So führt etwa die Mutation E143K zu einer veränderten N-Glykosylierung von CA XII und dem Verbleib des Enzyms am endoplasmatischen Retikulum [136]. Allerdings setzen sich entsprechende Veränderungen in Tumoren nur durch, wenn sie zu einem Selektionsvorteil für die Zelle führen [20].

Neben dem Ersatz von internalisierten und sezernierten Enzymen ist insbesondere auch die Produktion und intrazelluläre Speicherung CA XII-haltiger Exosomen als mögliche Ursache der Zytoplasmafärbung zu nennen. Diese Membranvesikel knospen vom trans-Golgi-Netzwerk in Endosomen hinein, jedoch ist auch die Entstehung über endozytotische Vesikel möglich. Endosomen können zu sogenannten multivesikulären Körpern reifen. Das auf den intraluminalen Vesikeln exprimierte Enzym hat dabei keinen Kontakt zum Zytosol. Statt mit Lysosomen zu verschmelzen, können multivesikuläre Körper mit der Plasmamembran fusionieren und die enthaltenen Vesikel als Exosomen freisetzen [137]. Die EVs, zu denen auch direkt von der Plasmamembran abgeschürfte Membranpartikel gehören, sind maßgeblich an der interzellulären Kommunikation beteiligt und können genetische Informationen, Metabolite sowie funktionelle Proteine übertragen. Sie spielen eine wichtige Rolle für die Tumorbilogie [45, 119, 130, 138]. Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper wurde initial durch die Immunisierung einer Ratte mit Tumorexosomen generiert [65].

Ebenso wie die Internalisierung von EVs beziehungsweise deren Beladung kann auch die Endozytose von in der Plasmamembran verankerten Proteinen der Teilnahme an intrazellulären Prozessen dienen und funktionelle Änderungen in der Zelle auslösen [122]. Diese über die katalytische Aktivität hinausgehende Funktion von CA XII kann ebenfalls zur beobachteten Zytoplasmafärbung beigetragen haben und erklärt insbesondere auch das nukleär lokalisierte Immunsignal.

So ist beispielsweise bekannt, dass CA IX intrazellulär mit β -catenin interagiert und hierüber auch in den Zellkern gelangen kann [79, 101, 125]. Durch seine wichtige Rolle für die Zelladhäsion und die Modulation tumorrelevanter Gene (kanonischer Wnt-Signalweg) ist β -catenin an der malignen Transformation beziehungsweise Progression beteiligt und in Ovarial- sowie Harnblasenkarzinomen häufig stark akkumuliert [139]. Für Letztere konnten Matsue *et al.* kürzlich eine vermehrte nukleäre Anhäufung von β -catenin bei CA II-Überexpression und konsekutiv die gesteigerte Transkription von EMT-Genen zeigen [140].

Buanne *et al.* berichteten zahlreiche weitere Interaktion von CA IX mit zytoplasmatischen Proteinen und vermuteten die Beteiligung des Enzyms an mehreren Signalwegen. Einige der Bindungspartner vermitteln ebenfalls den nukleären Transport. Die Autoren zeigten eine entsprechende Kernfärbung sowie eine perinukleär betonte Zytoplasmafärbung im Bereich der Zentrosomen. Bei Hypoxie trat die intrazelluläre CA IX-Expression verstärkt auf und die Immunfärbung schloss auch die Nukleoli ein [126]. Offenbar kann CA IX an nukleoläres Chromatin binden und die Transkription der ribosomalen DNA positiv beeinflussen. In zellulären Stresssituationen verlässt CA IX diese Bindung, vermutlich durch Komplexbildung mit dem nukleären Exportprotein XPO1, und bewirkt damit eine Reduktion der energieaufwändigen Ribosomenbiogenese sowie letztlich der Proteinbiosynthese [141]. Die Zunahme von zytoplasmatischer und nukleärer CA IX-Expression in hypoxischen Zellen wurde auch von anderen Autoren beschrieben [128].

CA XII enthält im ersten Abschnitt der intrazellulären Domäne ebenfalls eine Sequenz für den Kerntransport. Das Exportsignal ist im Bereich der Transmembrandomäne lokalisiert [142]. Vermutlich muss das Enzym, wie für CA IX beschrieben, zunächst den sekretorischen Weg zur Membran durchlaufen, bevor es retrograd über den Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum und schließlich zum Zellkern transportiert werden kann [143]. Dazu wird scheinbar das vollständige Transmembranprotein endozytiert [126, 128]. Die Interaktion mit Bindungspartnern kann aus Vesikeln und Endosomen heraus erfolgen [122]. Nach dem *Shedding* der Ektodomäne könnte auch das verbleibende, gelöste Proteinfsegment allein als Transkriptionsfaktor dienen [133]. Dieser Prozess lässt sich jedoch mit Antikörpern gegen die Ektodomäne nicht visualisieren.

Zusammenfassend ergibt sich das beobachtete Expressionsmuster vermutlich aus der Gesamtheit unterschiedlicher Prozesse, die in der immunhistochemischen Färbung nur bedingt zu differenzieren waren.

Es ist anzunehmen, dass das zytoplasmatische Immunsignal zu einem gewissen Grad den Enzym-Umsatz widerspiegelt. Möglicherweise ist die prädiktive Aussagekraft hierdurch höher als bei isolierter Berücksichtigung der Oberflächenexpression.

5.2 Fehlende Tumorzellspezifität des Enzyms CA XII

Erwartungsgemäß wurde CA XII auch von nicht-neoplastischen Zellen exprimiert. Zu nennen sind hier sowohl Komponenten der Tumorumgebung als auch Zellen des Normalgewebes in tumorfreien Präparaten. Nur epitheliale Zellen wurden in dieser Arbeit systematisch ausgewertet.

Das ovarielle Epithel aller Vergleichspräparate wies stellenweise CA XII auf. Meist blieb jedoch die Mehrheit der Epithelzellen CA XII-negativ. Dies bestätigte die Beobachtung von Ivanov *et al.* [63]. Interessanterweise scheint das ovarielle Oberflächenepithel mehr CA IX als CA XII zu exprimieren [59, 63]. Erwähnenswert ist auch, dass das CA 12-Gen im Ovar offenbar alternativ gespleißt wird [55, 106]. Eine Expression auf dem Proteinlevel wird im *Human Protein Atlas* nicht berichtet. Allerdings fanden dort nur die ovariellen Stroma- und Follikelzellen Berücksichtigung [106].

Für CA IX ist bekannt, dass die alternativ gespleißte Form des Enzyms im Normalgewebe mit einer veränderten Funktion einhergehen und den Vergleich mit neoplastischem Gewebe beeinträchtigen kann [135]. Für CA XII sollte diese Möglichkeit ebenfalls in Betracht gezogen werden. Die alternativ gespleißte Form von CA XII scheint jedoch mit verschiedenen Neoplasien assoziiert zu sein [54, 96].

In den urologischen Vergleichspräparaten präsentierte sich stets ein Großteil der nicht-neoplastischen Urothelzellen CA XII-positiv. Tatsächlich ist in der bestehenden Literatur für das Harnblasengewebe eine höhere CA XII-Genexpression dokumentiert als für das ovarielle Gewebe. Das immunhistochemische CA XII-Expressionslevel des analysierten Urothels lag in diesen Studien niedriger als in der vorliegenden Arbeit [63, 106].

Die intravitale Entfernung von Gewebe ist ein invasiver Eingriff, der nur bei rechtfertigender Indikationsstellung durchgeführt wird. So lagen bei den hier inkludierten Patienten teils Begleiterkrankungen vor. Entzündungsprozesse könnten zu einer vermehrten CA XII-Induktion geführt haben, da diese unter anderem den Transkriptionsfaktor HIF-1 aktivieren [30, 144]. Bei der Interpretation ist auch zu bedenken, dass histologisch unauffälliges Urothel bereits präneoplastisch verändert sein kann [11, 12]. Für die urologischen Kollektive wurden ausschließlich Zystektomiepräparate verwendet. Zum Teil waren die Patienten vortherapiert. Im Grunde weist das Urothel einen niedrigen

Zellumsatz auf. Bei Verletzungen oder Reizungen kann dieser jedoch stark ansteigen. Die Basalzellschicht stimuliert die Proliferation dabei durch Freisetzung des Signalmoleküls *Sonic hedgehog* [145]. Giuntini *et al.* konnten bereits eine positive Modulation von CA XII durch den Hedgehog-Signalweg aufzeigen [80].

Für die Verwendung von CA XII als Tumormarker oder therapeutisches Zielantigen erscheint eine Expression im nicht-neoplastischen Gewebe zwar nicht ideal, sie stellt jedoch nicht zwangsläufig einen Hinderungsgrund dar [9]. Insbesondere bei der Behandlung von prognostisch ungünstigen Krebserkrankungen ist das Auftreten von Nebenwirkungen zu einem gewissen Grad vertretbar. Selbst relativ unselektive Verfahren wie beispielsweise die Chemotherapie haben weiterhin einen zentralen Stellenwert in der Onkologie, da deren Wirksamkeit häufig die Nachteile überwiegt.

Darüber hinaus ist anzunehmen, dass auch die Inhibition von CA XII auf Komponenten des Tumorstromas von Bedeutung für eine erfolgreiche Tumorthherapie ist. Hierdurch könnte deren tumorfördernder Einfluss reduziert werden. So unterstützen CAFs das Tumorwachstum nicht nur metabolisch im Rahmen des umgekehrten Warburg-Effektes [34], sondern tragen durch die Expression von Transmembran-CAs auch maßgeblich zur Tumorzidose und folglich zur EMT der Tumorzellen bei [146]. Das Vorhandensein von CA XII-positiven tumorassoziierten Makrophagen war im hepatozellulären Karzinom mit einem höheren Metastasierungsrisiko und folglich einer schlechteren Prognose verbunden. Die selektive Inhibition zeigte im Mausmodell ein reduziertes Tumorwachstum und eine effektivere Immuntherapie [67]. Das in der vorliegenden Arbeit stellenweise extrazellulär beziehungsweise intraluminal detektierte Immunsignal könnte, zumindest in Teilen, auf das Vorliegen von löslichen Enzymen und CA XII-haltigen EVs zurückzuführen sein. Deren Erkennung leistet vermutlich ebenfalls einen wichtigen Beitrag zur Tumorthherapie und ist zudem relevant für die Tumordiagnostik [96, 99, 119, 131].

Auch die im klinischen Alltag etablierten Tumormarker sind in den seltensten Fällen tumorzellspezifisch und meist durch zahlreiche Faktoren beeinflussbar. Sie eignen sich nicht gut für den Tumornachweis, insbesondere nicht bei isolierter Betrachtung. Für die Diagnosestellung ist die histomorphologische Beurteilung im Allgemeinen überlegen. Vor allem bei häufiger Überexpression im neoplastischen Gewebe beziehungsweise bei charakteristischem Expressionsprofil können Tumormarker jedoch die Diagnostik ergänzen und als Verlaufsparemeter dienen [9].

5.3 Kontingenzanalysen der CA XII-Expression mit pathologischen und klinischen Charakteristika

5.3.1 CA XII-Hochregulation im malignen Gewebe

Tatsächlich fand sich in der Mehrheit der Ovarialkarzinome eine deutliche CA XII-Überexpression. Auch in den muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen war ein höheres Expressionslevel zu beobachten als im nicht-neoplastischen Vergleichsgewebe.

In beiden Tumorentitäten manifestierte sich die höhere Expression statistisch auffällig durch eine stärkere Immunfärbung. Im Ovarialkarzinomkollektiv wurde zudem ein auffallend höherer Anteil CA XII-positiver Zellen erreicht als im Vergleichskollektiv.

In den gynäkologischen und den urologischen Präparaten waren teils auch nicht-neoplastische Zellen mit starker CA XII-Expression vorhanden. Interessanterweise wurde eine vorherrschend starke Immunfärbung aber nur im neoplastischen Gewebe beobachtet. Dies könnte hinsichtlich der Verwendung von CA XII als diagnostischer Biomarker von Relevanz sein.

Die Hochregulation in beiden Karzinomkollektiven unterstrich die vermutete Bedeutung von CA XII für die Tumorbilogie.

Interessant war in diesem Zusammenhang auch die CA XII-Expression der ovariellen Borderlinetumoren. Deren maligne Potenz ist niedriger als bei Karzinomen, aber höher als bei Adenomen [5, 14]. Alle untersuchten Borderlinetumoren exprimierten CA XII, wobei das Expressionsprofil deutlich variierte. Insgesamt fand sich, entsprechend der Erwartung, eine statistisch auffallend geringere Expression als in den Ovarialkarzinomen. Verglichen mit dem ovariellen Normalgewebe lag das Expressionslevel dagegen auffallend höher. Zwischen den histologischen Subtypen bestanden Unterschiede der CA XII-Expression, wobei die niedrige Fallzahl der muzinösen und seromuzinösen Borderlinetumoren, insbesondere aufgrund der beobachteten Variabilität, keine valide Aussage zuließ. Zur Reduktion von konfundierenden Faktoren wie der abweichenden Molekulargenetik, wurde die Überexpression von CA XII zusätzlich an Subkollektiven gemäß der angenommenen Karzinogenese geprüft. Die invasiven, aber gut differenzierten LGSOCs exprimierten mehr CA XII als die serösen Borderlinetumoren. Diese wiesen wiederum mehr CA XII auf als das nicht-neoplastische ovarielle Epithel. Die vermehrte Expression bei höherer Progressionsstufe lässt sich durch die jeweilige Proliferationsrate erklären. Mit Voranschreiten der malignen Transformation nimmt der Glukosemetabolismus in den ovariellen Epithelzellen graduell zu [32] und entsprechend steigt der Bedarf zur intrazellulären pH-Regulation [30, 40]. CA XII wird dabei bereits in frühen Stufen der Tumorgenese hochreguliert [86, 108].

Übersteigt die Glykolyserate eine kritische Schwelle, bedingt die extrazelluläre Azidose eine deutliche Beschleunigung des Tumorwachstums und den Übergang in ein invasives Karzinom [42, 44].

Hynninen *et al.* untersuchten 6 Borderlinetumoren und dokumentierten in 4 Fällen eine CA XII-Expression. Es bestand dabei kein Expressionsunterschied zwischen den serösen und den muzinösen Borderlinetumoren (je $n = 3$). Eine CA XII-Hochregulation im malignen Gewebe ließ sich am ehesten für den muzinösen Subtyp ableiten [101]. Zu beachten ist hierbei die niedrige Fallzahl sowie die Tatsache, dass nur die Intensität der Expression ausgewertet wurde. In der vorliegenden Arbeit unterschieden sich die Borderlinetumoren vorwiegend durch einen meist niedrigeren Anteil CA XII-positiver Tumorzellen von den Ovarialkarzinomen.

Ivanov *et al.* fanden in allen 6 untersuchten Borderlinetumoren eine fokale Expression von CA XII (< 40 % der Tumorzellen). Aus deren Daten war keine CA XII-Überexpression der invasiven Karzinome ableitbar [63].

Auch für die MIUCs wurde eine nicht-invasive Vorläuferläsion in die Auswertung einbezogen. Das intraepitheliale Karzinom des Urothels ist jedoch im Gegensatz zum ovariellen Borderlinetumor eine obligate Präkanzerose mit hoher maligner Potenz [6].

Entsprechend dem höheren Malignitätsniveau wiesen die *in-situ*-Karzinome höhere CA XII-Expressionslevel auf als die Borderlinetumoren, insbesondere aufgrund des häufigeren Vorkommens von CA XII-positiven Zellen. Für Erstere konnte allerdings nur eine niedrige Fallzahl ($n = 9$) untersucht werden. Zudem wurde das Expressionsprofil vermutlich durch weitere Faktoren beeinflusst, da das nicht-neoplastische Urothel bereits eine höhere Expression aufwies als das ovarielle Normalgewebe.

Aufgrund der häufigen CA XII-Positivität in allen urologischen Kollektiven zeigte sich die ansteigende Expression bei maligner Transformation nicht so ausgeprägt wie bei den gynäkologischen Kollektiven. Die Expression der *in-situ*-Karzinome war verglichen mit dem nicht-neoplastischen Urothel höher, jedoch manifestierte sich der Unterschied nicht statistisch auffällig. Ebenso wiesen die muskelinvasiven Karzinomzellen nicht auffallend mehr CA XII auf als die präinvasiven, aber bereits gering differenzierten Tumorzellen des *in-situ*-Karzinoms.

Es ist anzunehmen, dass eine starke CA XII-Expression zum hohen Progressionsrisiko des *in-situ*-Karzinoms beiträgt [42, 78]. Je stärker die intraepitheliale Azidose ausgeprägt ist und je besser die Tumorzellen an das azidotische Milieu adaptiert sind, desto eher kommt es zum invasiven Wachstum [28, 44]. Die therapeutische Inhibition von CA XII erscheint daher auch für das urotheliale *in-situ*-Karzinom lohnend. Als flache Läsion im Bereich der Harnblase ist das intraepitheliale Karzinom gut zugänglich für die intravesikale Applikation von Therapeutika [8].

5.3.2 Assoziation von CA XII und Tumorbiologie innerhalb der Karzinome

Der histologische Tumorgrad dient als zentraler Parameter für die Aggressivität von Karzinomen. Er ist ein wichtiger Prognosefaktor [7].

Im Ovarialkarzinomkollektiv zeigte sich eine statistisch auffällige, wenngleich schwache Assoziation von starker CA XII-Expression und geringer Tumorzellendifferenzierung. Geprägt wurde die Beobachtung durch den Expressionsunterschied zwischen HGSOCS und LGSOCs. Diese histologischen Subtypen unterscheiden sich maßgeblich in ihrer Molekulargenetik. So weisen beinahe alle HGSOCS eine aberrante Expression von TP53 auf, wohingegen diese in LGSOCs vollständig fehlt [5]. Bei Hynninen *et al.* wurde nur innerhalb der serösen Ovarialkarzinome auf einen Zusammenhang mit dem Tumorgrad getestet, ohne einen solchen festzustellen [101]. Deren Studie fand allerdings vor Einführung des zweistufigen Graduierungssystems der serösen Karzinome und der Anerkennung von HGSOCS und LGSOC als eigenständige Subtypen statt. Klarzellige Ovarialkarzinome werden stets als G3-Tumoren klassifiziert [5]. Wie auch bei Hynninen *et al.* waren in der vorliegenden Arbeit alle klarzelligen Karzinome CA XII-positiv. Interessanterweise präsentierte sich in deren Analyse nur dieser histologische Subtyp mit einer höheren CA XII- als CA IX-Expression. Zu beachten ist hierbei die niedrige Anzahl untersuchter Fälle. Die intensivste CA XII-Expression berichteten die Autoren im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit für die muzinösen Karzinome [101]. Diese werden üblicherweise dreistufig graduiert [5, 7], wobei das Kollektiv der vorliegenden Arbeit keine gering differenzierten muzinösen Karzinome beinhaltete. Es kann nur spekuliert werden, dass sich das abweichende Ergebnis hierauf zurückführen lässt. Bei Hynninen *et al.* fand sich keine entsprechende Information [101]. In der vorliegenden Arbeit wiesen die undifferenzierten Karzinome ($n = 8$) den höchsten Prozentsatz an starker Expression auf. Dieser epidemiologisch seltene Subtyp verhält sich klinisch hoch maligne [5].

Wenngleich sich besser differenzierte Karzinome im Allgemeinen langsamer ausbreiten, geht die niedrigere Proliferationsrate häufig mit einem schlechteren Therapieansprechen einher. Diese Tumoren können daher ebenfalls prognostisch ungünstig sein. Auch bestimmte histologische Subtypen wie das klarzellige oder muzinöse Ovarialkarzinom scheinen beispielsweise weniger sensibel auf die konventionelle Chemotherapie zu reagieren [7, 14]. An der Therapieresistenz kann CA XII kausal beteiligt sein. Das Enzym fördert neben der Azidose im Mikromilieu auch die Aktivität des P-GP [66]. Dieser MDR-Transporter schleust unter anderem das Zytostatikum Paclitaxel aus der Tumorzelle aus, welches neben Carboplatin insbesondere beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom zur Erstlinientherapie gehört [7, 147]. Platinderivate sind kein Substrat des P-GP. Sie können jedoch dessen Expression erhöhen und so zu einer Resistenz gegenüber

anderen Wirkstoffen beitragen [147]. Durch die Kombination mit einem CA XII-Inhibitor ließe sich die Chemosensitivität von Ovarialkarzinomen vermutlich verbessern [74, 82].

Der Zusammenhang von CA XII-Expression und Differenzierungsgrad konnte für das Harnblasenkarzinomkollektiv nicht hinreichend analysiert werden, da muskelinvasive Karzinome generell als genetisch instabil gelten [6] und ebenso wie die untersuchten *in-situ*-Karzinome als *high-grade* Tumoren klassifiziert wurden. Die 18 G2-Karzinome zeigten dabei einen Trend zu vermehrter CA XII-Expression. Interessanterweise wiesen die G2-Karzinome im vorliegenden Kollektiv zugleich ein tendenziell niedrigeres tumorspezifisches Überleben auf, möglicherweise bedingt durch ein schlechteres Therapieansprechen. Diese Beobachtungen waren nicht statistisch auffällig.

Aufgrund fehlender Angaben konnten in der Analyse weder die histopathologischen noch die molekularen Subtypen der MIUCs zufriedenstellend berücksichtigt werden. Vermerkt war jedoch das Vorliegen einer abweichenden Differenzierung. MIUCs mit plattenepithelialer Differenzierung zeigten statistisch auffallend häufiger eine starke CA XII-Expression. Diese Karzinome wachsen typischerweise aggressiv und werden häufig erst bei fortgeschrittener Tumorausbreitung entdeckt [6, 148]. Plattenepithelial differenzierte MIUCs sind molekulargenetisch meist dem basalen Subtyp zuzuordnen [149]. In diesem ist der Transkriptionsfaktor HIF-1 häufig stark aktiv [12]. Auch die CA 9-Genexpression scheint in den basalen Karzinomen auffallend hoch zu sein [98]. Deren genetisches Profil ähnelt dem von anderen plattenepithelial differenzierten Tumoren wie beispielsweise den Plattenepithelkarzinomen der Lunge oder des Kopf-Hals-Bereichs [12]. Diese Karzinome zeigen ebenfalls häufig eine hohe CA XII-Expression [85, 107]. Für den basalen Subtyp des Harnblasenkarzinoms finden sich in der Literatur kontroverse Daten bezüglich des Therapieansprechens. Auch ein vergleichsweise gutes Ansprechen auf die chemo- oder radiotherapeutische Behandlung ist beschrieben [12, 98]. Möglicherweise eignen sich diese Karzinome besonders gut für den Einsatz eines anti-CA XII-ADC mit gekoppeltem Zytostatikum beziehungsweise Radiotherapeutikum.

CA XII fördert das Migrations- und Invasionspotenzial von neoplastischen Zellen über mehrere Mechanismen. Bekannt ist dabei auch eine funktionelle und teils physische Assoziation mit proteolytischen Enzymen zur Degradation der extrazellulären Matrix [78, 79]. Für die Harnblasenkarzinome konnte in der vorliegenden Arbeit gezielt Gewebe aus der Invasionsfront untersucht werden. Eine eindeutig gesteigerte Expression von CA XII war dabei nicht erkennbar. Andererseits war die Immunfärbung der Invasionsfront nur äußerst selten schwächer als die des Haupttumors. Bei Ochi *et al.* blieben 45 von 70 Ösophaguskarzinomen im Bereich der Invasionsfront frei von CA XII, wobei diese Fälle mit einem niedrigen Expressionslevel des Gesamttumors assoziiert waren [108]. Lloyd *et al.* analysierten in ihrer Studie 10 duktale Mammakarzinome und zeigten, dass CA XII

insbesondere im Tumorzentrum hochreguliert wird. Dort ist die Zelldichte höher und die Vaskularisation geringer. An der Invasionsfront fanden die Autoren dagegen eine vermehrte CA IX-Expression [150].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kontingenz von Parametern der Tumorausbreitung und der CA XII-Expression innerhalb von stratifizierten Subkollektiven untersucht. Insbesondere im frühen Stadium präsentierten sich die HGSOCS häufig mit einer hohen CA XII-Expression. Diese Beobachtung ist sowohl diagnostisch als auch therapeutisch relevant, da die meist späte Diagnosestellung maßgeblich zur schlechten Prognose der HGSOCS beiträgt [10]. Durch den Einsatz von CA XII als Zielantigen könnten die Karzinome möglicherweise bereits im lokalisierten Stadium detektiert und an der weiteren Ausbreitung gehindert werden. Interessanterweise wird von Ovarialkarzinomen vor allem im frühen Stadium auch der ER α exprimiert, der den tumorfördernden Effekt der Östrogene vermittelt [151, 152] und ein wichtiger Induktor von CA XII ist [70]. Im fortgeschrittenen Tumorstadium werden die ERs häufig herunterreguliert [151]. Die bereits fernmetastasierten HGSOCS des vorliegenden Kollektivs zeigten statistisch auffallend seltener eine hohe CA XII-Expression. Diese Beobachtung ist allerdings von etwas eingeschränkter Aussagekraft, da nur für einen kleinen Teil der Fälle eine Zuordnung zur M0- oder M1-Kategorie der TNM-Klassifikation erfolgte.

Bei den MIUCs ging eine geringere Ausdehnung des Primärtumors nicht im gleichen Maße wie bei den HGSOCS mit einer höheren CA XII-Expression einher. Auch die MIUCs wiesen jedoch bereits in den niedrigeren Stadien eine deutliche Expression auf, entsprechend den präinvasiven *in-situ*-Karzinomen. Frühe stromainvasive *high-grade* Urothelkarzinome waren nicht Teil des Kollektivs. Interessanterweise zeigten die MIUCs mit bekannter Fernmetastasierung, ähnlich wie bei den HGSOCS, etwas häufiger eine niedrige Expression. Die Beobachtung war nicht statistisch auffällig. In den MIUCs mit dokumentierter Lymphgefäß-, Venen- oder Perineuralscheideninvasion wurde CA XII nicht auffallend höher exprimiert als bei deren Fehlen. Um eine entsprechende Korrelation zu erkennen, wäre vermutlich die isolierte Betrachtung der membranösen Expression erforderlich [127]. Zu bedenken ist außerdem, dass die Invasionsparameter nicht an den vorliegenden Gewebeständen erhoben wurden.

Weder für die HGSOCS noch für die MIUCs ließ sich eine klare Assoziation zwischen der CA XII-Expressionshöhe und dem Lymphknotenstatus ableiten.

Anhand von Überlebensanalysen konnte die prognostische Aussagekraft der CA XII-Expression näher untersucht werden. Die Voraussetzungen für eine multivariate Cox-Analyse waren nicht gegeben. Sofern es die Fallzahl zuließ, wurden bekannte

konfundierende Faktoren manuell stratifiziert. Die generierten Daten gelten somit nur für das jeweils analysierte Subkollektiv.

Bei den inkludierten Patientinnen der HGSOCS ging eine besonders hohe CA XII-Expression zum Zeitpunkt der Diagnosestellung tendenziell mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben und einem schlechteren Gesamtüberleben einher. Die wenigen Patientinnen mit einer sehr niedrigen Expression in den ausgewerteten Präparaten zeigten dagegen einen Trend zu einem längeren Gesamtüberleben. Wenngleich am vorliegenden Kollektiv kein statistisch auffälliger Zusammenhang nachgewiesen werden konnte, ist der beobachtete Effekt möglicherweise klinisch relevant.

Aufgrund der hohen genetischen Instabilität ist das HGSOCS ein sehr heterogener Subtyp des Ovarialkarzinoms. Es ist bekannt, dass sich Untergruppen der HGSOCS hinsichtlich ihres klinischen Verlaufs unterscheiden [10]. Das Gesamtüberleben wurde nur innerhalb des FIGO-Stadiums III untersucht. Operativ lässt sich bei diesen Patientinnen häufig keine Tumorfreiheit erreichen. Der postoperative Tumorrest ist zentral für die Prognose des Ovarialkarzinoms [7]. Es kann spekuliert werden, dass die starke Expression von CA XII mit einer vermehrten Dissemination der Tumorzellen und folglich mit einem schlechteren Operationsergebnis verbunden war. Auch ein vermindertes Ansprechen auf die postoperative Systemtherapie kommt als Ursache für die ungünstigere Prognose bei starker CA XII-Expression in Betracht.

Im *Human Protein Atlas* ist die Überlebenskurve von unstratifizierten Ovarialkarzinompatientinnen in Abhängigkeit der CA 12-Genexpression dargestellt [103]. Wenngleich insgesamt keine prognostische Relevanz berichtet wird, zeichnet sich im Verlauf ein etwas besseres Überleben bei niedriger Expression ab. Hynninen *et al.* schlossen in ihre Überlebensanalyse alle Ovarialkarzinome mit seröser Histomorphologie ein. Eine weitere Stratifizierung erfolgte offenbar nicht. Hierbei beobachteten die Autoren keine nennenswerte Korrelation mit dem Überleben [101].

In der vorliegenden Arbeit ließ sich auch für das Harnblasenkarzinomkollektiv kein statistisch auffälliger Zusammenhang zwischen der CA XII-Expressionshöhe und dem postoperativen Verlauf nachweisen. Ein eventuell klinisch relevanter Unterschied der Überlebenskurven wurde auch hier am ehesten bei Vorhandensein einer vorherrschend starken Immunfärbung im Operationspräparat beobachtet.

Für die analysierten MIUCs ergab sich interessanterweise kein einheitlicher Trend. Während eine sehr hohe CA XII-Expression in der nach UICC-Tumorstadium III stratifizierten Subgruppe eher mit einem längeren rezidivfreien Überleben assoziiert war und auch mit einem besseren tumorspezifischen sowie Gesamtüberleben einherging, zeigte sich diese für die stratifizierten MIUCs in Stadium IV eher prognostisch ungünstig.

Bei höherer Expression im Zystektomiepräparat traten die Todesfälle hier tendenziell früher auf.

Auch vom *Human Protein Atlas* wird die CA 12-Genexpression in Urothelkarzinomen insgesamt als nicht prognostisch bezeichnet. Die Überlebenskurve lässt jedoch insbesondere für das Stadium III eine Assoziation von hoher Expression und besserem Patientenüberleben erkennen [103]. Vermutlich wird dieser Effekt durch einen nicht berücksichtigten konfundierenden Faktor hervorgerufen.

Zusammenfassend zeigte sich die CA XII-Expressionshöhe an den analysierten Subkollektiven der vorliegenden Arbeit nicht als verlässlicher prognostischer Biomarker. Die häufig starke Expression in biologisch aggressiven Tumoren könnte jedoch möglicherweise als ergänzender Parameter dienen, um Patienten mit Bedarf an zusätzlichen oder alternativen Therapien zu selektieren.

5.3.3 Identifizierung von Patientengruppen mit auffälliger CA XII-Expression

Die zielgerichtete Tumorthherapie hat ein enormes Potenzial. Das instabile Genom der Karzinomzellen und die damit verbundene Heterogenität kann jedoch eine große Hürde für deren Einsatz darstellen [4]. Komponenten des zellulären Metabolismus erscheinen in dieser Hinsicht als besonders lohnenswerte Zielstrukturen. Obwohl auch diese durch die molekulare Heterogenität beeinflusst werden können, finden sich einige Antigene aufgrund ihrer tumorbiologischen Bedeutung ubiquitär im Tumorgewebe [30, 117]. So war auch CA XII in der großen Mehrheit der untersuchten Ovarial- und Harnblasenkarzinomzellen zu detektieren. Wenngleich insgesamt eine Überexpression im Tumorgewebe beobachtet wurde, lag die CA XII-Expressionshöhe bei individueller Betrachtung nicht zuverlässig oberhalb der des nicht-neoplastischen Gewebes. Ein *Cut-off* zur Abgrenzung einer klinisch relevanten Expression wurde für CA XII bislang nicht etabliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde der IRS-Wert 2 verwendet, um die Karzinome mit besonders niedriger Expression näher zu untersuchen. Gruppiert wurden hierdurch Fälle ohne Immunfärbung im vorliegenden Gewebe, mit schwachem Immunsignal in maximal 50 % der beurteilten Zellen oder mit mäßig ausgeprägter Farbreaktion in weniger als 10 % der Zellen. Diese Karzinome ließen sich in der Kontingenzanalyse mit klinisch-pathologischen Parametern keiner homogenen Patientengruppe zuordnen. Eine CA XII-Positivität zeigte sich bei Verwendung des *Cut-off* IRS > 2 noch immer in 92,6 % der Ovarialkarzinome (363 von 392 Fällen) und 98,7 % der Harnblasenkarzinome (231 von 234 Fällen). In den gynäkologischen Kollektiven grenzte sich die Expression der Karzinome durch den *Cut-off* IRS > 2 statistisch auffällig von den Vergleichsgeweben ab. Eine vorherrschend starke Färbintensität bei insgesamt mehr als 50 % positiven Zellen

(Cut-off IRS > 8) zeigte sich in dieser Arbeit interessanterweise für die gynäkologischen und die urologischen Kollektive nur im neoplastischen Gewebe und war auch innerhalb der Karzinome mit biologisch aggressiven Tumoren assoziiert.

Die Progression und das Therapieansprechen der untersuchten Tumorentitäten werden von Geschlechtshormonen beeinflusst. Die Zusammenhänge sind jedoch komplex und entsprechend finden sich in der Literatur teils widersprüchliche Berichte [151, 153, 154]. Bei den urologischen Neoplasien ließ sich anhand der beobachteten Expressionsunterschiede keine klare Assoziation zwischen CA XII und dem Patientengeschlecht ableiten. Im nicht-neoplastischen Vergleichskollektiv schien das Urothel von Frauen tendenziell etwas mehr CA XII zu exprimieren. Für lumbale Mammakarzinome ist bekannt, dass CA 12 sowohl durch den ER α als auch durch den Transkriptionsfaktor GATA3 reguliert werden kann [71]. Die Arbeit von Li *et al.* legt nahe, dass Östrogene die Expression von GATA3 im urothelialen Normalgewebe fördern. Demgegenüber zeigen Androgene einen hemmenden Effekt [153].

In den Kollektiven der Borderlinetumoren und der nicht-neoplastischen Ovarien fand sich bei den älteren Patientinnen eine höhere CA XII-Expression. Im stratifizierten Kollektiv der HGSOCS wiesen dagegen die Fälle der jüngeren Patientinnen etwas vermehrt CA XII auf, mit der höchsten Expression im Alter zwischen 40 und 49 Jahren. Es ist denkbar, dass diese Beobachtung auf den höheren Anteil BRCA-mutierter Karzinome zurückzuführen ist. In Mammakarzinomen wurde der Funktionsverlust des BRCA1-Proteins bereits mit einer erhöhten Expression des Isoenzym CA IX in Verbindung gebracht [129, 155].

Auch für das Harnblasenkarzinom gibt es Hinweise auf molekulare Unterschiede zwischen den jüngeren und den älteren Patienten. Erstere zeigen dabei eine bessere Prognose [8]. Bei den untersuchten MIUCs und den urothelialen *in-situ*-Karzinomen fand sich tendenziell etwas vermehrt CA XII in den Präparaten von älteren Patienten.

5.4 Stärken und Limitationen der durchgeführten Studie

In dieser retrospektiven Arbeit wurde die CA XII-Expression verschiedener Gewebe unter vergleichbaren Labor- und Auswertungsbedingungen untersucht. Die Wahl der Kollektive erlaubte die Gegenüberstellung von Zellverbänden mit unterschiedlichem biologischem Verhalten beziehungsweise malignem Potenzial.

Hervorzuheben ist die große Fallzahl der untersuchten Karzinome. Hierdurch war eine gewisse Stratifizierung der heterogenen Tumorentitäten möglich. Im Fokus der Analyse standen die HGSOCS und MIUCs. Trotz der Kollektivgröße konnten epidemiologisch

selteneren Karzinome teils nur orientierend ausgewertet werden. Auch in den Vergleichskollektiven war die Fallzahl verhältnismäßig niedrig.

Die Aussagekraft des statistischen p -Wertes ist insbesondere bei hoher und variierender Fallzahl eingeschränkt. Diesem Problem wurde durch Angabe der Effektstärken sowie durch Auswertung der korrigierten Residuen begegnet. Da die Gefahr falschpositiver Aussagen auch durch eine große Anzahl durchgeführter Tests steigt, wurden die Ergebnisse vorsichtig formuliert. Die schwache Datenlage zur CA XII-Expression in den untersuchten Geweben sowie zur intrazellulären Enzymlokalisation erschwerte die Formulierung konkreter Hypothesen. Zudem existierte für die immunhistochemische Auswertung und Abstufung der CA XII-Expression keine etablierte Methode. Die Analyse der Daten erfolgte daher teils deskriptiv-explorativ. Eine Verifizierung der generierten Erkenntnisse an neuen Datensätzen ist anzustreben.

Darüber hinaus bedarf es dringend CA XII-spezifischer Untersuchungen bezüglich des Interaktoms und der subzellulären Korrelate. In der durchgeführten Immunfärbung waren diese nicht hinreichend differenzierbar. Einschränkend sei auch erwähnt, dass die Ergebnisse immunhistochemischer Studien nur bedingt auf die intravitale Situation übertragbar sind [82, 94, 120].

Das Immunsignal wurde in dieser Arbeit semiquantitativ ausgewertet. Durch den Einsatz einer Software zur digitalen Bildanalyse wäre die Expression vermutlich differenzierter quantifizierbar und weniger untersucherabhängig. In den Karzinomkollektiven trug die Analyse mehrerer Gewebestanzes pro Patientenfall der intratumoralen Heterogenität Rechnung und erlaubte im Harnblasenkarzinomkollektiv den gezielten Vergleich der CA XII-Expression von Haupttumor und Invasionsfront. Eine ausreichend hohe Repräsentativität der untersuchten Präparate ist anzunehmen [156]. Hinsichtlich einer möglichen Verwendung als Biomarker in der pathologischen Diagnostik sollte die Konkordanz des Expressionsprofils zwischen kleinen Gewebeproben und dem umfassend aufgearbeiteten Tumormaterial idealerweise speziell für das Antigen CA XII geprüft werden.

5.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit betont das Potenzial von CA XII als Ansatzpunkt für neue Strategien in der Diagnostik und Therapie von Ovarial- und Harnblasenkarzinomen. Sie soll einen Impuls für weiterführende Studien geben.

Denkbar ist beispielsweise der diagnostische Einsatz eines anti-CA XII-Antikörpers im Rahmen der *Liquid Biopsy*. Unter Einbezug des Ergebnisses der vorausgegangenen durchflusszytometrischen Analyse [97] könnte CA XII etwa ein nützlicher Biomarker zur

Detektion von malignen Zellen im Aszitespunktat sein. Eine entsprechende Untersuchung von Urinproben wäre ebenfalls wünschenswert, um die immunhistochemischen Ergebnisse mit der CA XII-Oberflächenexpression von intakten urothelialen Zellen zu korrelieren. Dabei sollten in das Vergleichskollektiv gesunde Probanden ohne vorherige Intervention im Bereich des Harntraktes inkludiert werden.

Anti-CA XII-Antikörper eignen sich auch für die *in-vivo*-Diagnostik und könnten hier insbesondere der Visualisierung von Mikrometastasen dienen [93, 94].

Bei Verwendung von CA XII-Inhibitoren wie dem monoklonalen Antikörper 6A10 bietet sich zugleich die Möglichkeit zur zielgerichteten Therapie. Aussichtsreich erscheint zum jetzigen Zeitpunkt vor allem die lokale Applikation des Antikörpers als Teil eines Chemo- oder Radioimmunkonjugates. Hierdurch kann ein dualer Effekt erzielt werden [82, 95]. Zudem ist die Kombination mit einem CA IX-Inhibitor in Betracht zu ziehen [47, 68, 76]. Ovarialkarzinompatientinnen könnten vermutlich vorwiegend durch eine perioperative Elimination von disseminierten beziehungsweise residualen Tumorzellen profitieren. Daher sollte die intraperitoneale Anwendung als mögliche Behandlungsoption evaluiert werden. Von Vorteil ist hierbei, dass die Mikrometastasen häufig nur oberflächlich in die Bauchorgane invadieren [10]. Für das Harnblasenkarzinom wäre entsprechend primär die intravesikale Anwendung zur Therapie der flachen, häufig multifokalen *high-grade* Tumoren anzustreben, um deren Progression zu verzögern oder gar zu verhindern. Zudem lässt sich hierdurch möglicherweise die Zahl der Rezidive senken.

Vorzugsweise in Kombination mit der operativen Therapie könnte der Einsatz eines anti-CA XII-ADC auch für das muskelinvasive Harnblasenkarzinom eine vielversprechende Behandlungsoption sein, um residuale sowie zirkulierende Tumorzellen zu detektieren und zu therapieren.

Die ersten Studienergebnisse aus der klinischen Validierung des Antikörpers 6A10 lassen hoffen, dass durch die Verwendung von CA XII als Zielantigen zukünftig die Lebensqualität vieler Tumorpatienten verbessert und deren Überlebenszeit verlängert werden kann [95].

6 Zusammenfassung

Das Enzym Carboanhydrase XII (CA XII) ist ein wichtiger Bestandteil der zellulären pH-Regulation und wird in vielen Tumoren überexprimiert. Es gilt als attraktives Zielmolekül für zusätzliche diagnostische und therapeutische Optionen, wie sie auch für Ovarialkarzinome und muskelinvasive Harnblasenkarzinome dringend benötigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das CA XII-Expressionsprofil dieser Tumorentitäten an einer großen Fallzahl immunhistochemisch untersucht. Dabei kam der monoklonale anti-CA XII-Antikörper 6A10 auf formalinfixierten Paraffinpräparaten zum Einsatz. Es erfolgte die Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern inklusive der Analyse von Überlebensdaten für stratifizierte Subkollektive. Zudem wurde eine kleinere Anzahl von nicht-invasiven Tumoren sowie nicht-neoplastischen Epithelien aus Ovar und Harnblase hinsichtlich ihrer CA XII-Expression untersucht und mit den Karzinomen verglichen.

Die große Mehrheit der Karzinomzellen beider Entitäten präsentierte sich CA XII-positiv. Innerhalb des Ovarialkarzinomkollektivs war ein hohes Expressionslevel statistisch auffallend mit einem geringen tumorzellulären Differenzierungsgrad assoziiert. Die biologisch besonders aggressiven *high-grade* serösen Ovarialkarzinome wiesen häufig bereits im frühen Tumorstadium eine hohe CA XII-Expression auf. Im fortgeschrittenen Stadium war diese tendenziell mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben sowie einem schlechteren Gesamtüberleben der Patientinnen verbunden. Die invasiven Ovarialkarzinome zeigten ein statistisch auffallend höheres Expressionslevel als die nicht-invasiven ovariellen Borderlinetumoren des Vergleichskollektivs. Diese exprimierten wiederum auffallend mehr CA XII als das nicht-neoplastische ovarielle Epithel.

In den Harnblasenkarzinomen manifestierte sich die hochregulierte CA XII-Expression durch eine auffallend stärkere Immunfärbung verglichen mit den nicht-neoplastischen Urothelzellen. Letztere zeigten sich ebenfalls häufig CA XII-positiv. Es wurde kein statistischer Expressionsunterschied zwischen den urothelialen *in-situ*-Karzinomen und den muskelinvasiven Karzinomen festgestellt. Alle analysierten Harnblasenkarzinome waren *high-grade* Tumoren. In Urothelkarzinomen mit plattenepithelialer Differenzierung fand sich auffallend häufig eine hohe CA XII-Expression. Anhand des Expressionslevels ließ sich für die untersuchten Patientenfälle keine klare prognostische Aussage ableiten.

Insgesamt legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass CA XII für die Tumorbilogie der aggressiven Ovarial- und Harnblasenkarzinome von Bedeutung ist. Die Verwendung des Enzyms als diagnostischer Biomarker und therapeutisches Zielantigen hat auch in diesen Tumorentitäten großes Potenzial und sollte weiter evaluiert werden.

Literaturverzeichnis

1. Ronckers, C., C. Spix, C. Trübenbach, A. Katalinic, M. Christ, A. Cicero, J. Folkerts, J. Hansmann, K. Kranzhöfer, B. Kunz, K. Manegold, U. Meyer zum Büschenfelde, A. Penzkofer, G. Vollmer, S. Weg-Remers, B. Barnes, N. Buttman-Schweiger, S. Dahm, M. Franke, I. Schönfeld, K. Kraywinkel, and A. Wienecke, *Krebs in Deutschland für 2019/2020*, 14th ed. 2023, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Berlin DOI: 10.25646/11357.
2. Schlander, M., K. Hernandez-Villafuerte, and C. Thielscher, *Kosten der Onkologie in Deutschland*. Forum, 2018. **33**(5): 330-337 DOI: 10.1007/s12312-018-0481-5.
3. Barnes, B., K. Kraywinkel, E. Nowossadeck, I. Schönfeld, A. Starker, A. Wienecke, and U. Wolf, *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*, 2016, Robert Koch-Institut: Berlin DOI: 10.17886/rkipubl-2016-014.
4. Gambardella, V., N. Tarazona, J.M. Cejalvo, P. Lombardi, M. Huerta, S. Rosello, T. Fleitas, D. Roda, and A. Cervantes, *Personalized medicine: recent progress in cancer therapy*. Cancers, 2020. **12**(4): 1009 DOI: 10.3390/cancers12041009.
5. WHO Classification of Tumours Editorial Board, ed. *Female genital tumours*. 5th ed. WHO classification of tumours. Vol. 4. 2020, IARC Press.
6. WHO Classification of Tumours Editorial Board, ed. *Urinary and male genital tumours*. 5th ed. WHO classification of tumours. Vol. 8. 2022, IARC Press.
7. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, and AWMF). *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 4.0*. 2020 [zuletzt abgerufen am 20.01.2024]; URL: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/>.
8. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, and AWMF). *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 2.0*. 2020 [zuletzt abgerufen am 22.01.2024]; URL: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/harnblasenkarzinom/>.
9. Carvalho, V.P.d., M.L. Grassi, C.d.S. Palma, H.H.A. Carrara, V.M. Faca, F.J. Candido dos Reis, and A. Poersch, *The contribution and perspectives of proteomics to uncover ovarian cancer tumor markers*. Transl Res, 2019. **206**: 71-90 DOI: 10.1016/j.trsl.2018.11.001.
10. Lisio, M.-A., L. Fu, A. Goyeneche, Z.-h. Gao, and C. Telleria, *High-grade serous ovarian cancer: basic sciences, clinical and therapeutic standpoints*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(4): 952 DOI: 10.3390/ijms20040952.
11. Knowles, M.A. and C.D. Hurst, *Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(1): 25-41 DOI: 10.1038/nrc3817.
12. Mau, B., B. Johnson, D.E. Hansel, and D.J. McConkey, *The many faces of muscle-invasive bladder cancer: histopathological and molecular characterization*. Semin Radiat Oncol, 2023. **33**(1): 1-11 DOI: 10.1016/j.semradonc.2022.10.001.
13. Ferlay, J., M. Colombet, I. Soerjomataram, D.M. Parkin, M. Pineros, A. Znaor, and F. Bray, *Cancer statistics for the year 2020: an overview*. Int J Cancer, 2021. **149**(4): 778-789 DOI: 10.1002/ijc.33588.
14. Prat, J., *Pathology of borderline and invasive cancers*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2017. **41**: 15-30 DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2016.08.007.
15. Karnezis, A.N., K.R. Cho, C.B. Gilks, C.L. Pearce, and D.G. Huntsman, *The disparate origins of ovarian cancers: pathogenesis and prevention strategies*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(1): 65-74 DOI: 10.1038/nrc.2016.113.
16. Berek, J.S., S.T. Kehoe, L. Kumar, and M. Friedlander, *Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum*. Int J Gynecol Obstet, 2018. **143**(S2): 59-78 DOI: 10.1002/ijgo.12614.
17. Rüschoff, J.H. and H. Moch, *Molekularpathologische Diagnostik des Harnblasenkarzinoms – prädiktive und prognostische Marker*. Die Onkologie, 2022. **28**(9): 742-752 DOI: 10.1007/s00761-022-01219-3.
18. Hanahan, D., *Hallmarks of cancer: new dimensions*. Cancer Discov, 2022. **12**(1): 31-46 DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
19. Horne, S.D., S.A. Pollick, and H.H.Q. Heng, *Evolutionary mechanism unifies the hallmarks of cancer*. Int J Cancer, 2015. **136**(9): 2012-2021 DOI: 10.1002/ijc.29031.

20. Greaves, M. and C.C. Maley, *Clonal evolution in cancer*. Nature, 2012. **481**(7381): 306-313 DOI: 10.1038/nature10762.
21. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): 646-674 DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
22. Hoffmann, M.J., H. Taubert, and K. Junker, *Molekulare Grundlagen der Karzinogenese und molekularbiologische Untersuchungsmethoden*, in *Uroonkologie*, H. Rübben, et al., Editors. 2020, Springer: Berlin, Heidelberg. p. 1-20 DOI: 10.1007/978-3-662-54652-9_11-1.
23. Gorges, K., L. Graeve, and P.E. Petrides, *Prinzipien der zellulären Tumorgenese und -progression*, in *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, P.C. Heinrich, et al., Editors. 2022, Springer: Berlin, Heidelberg. p. 835-849 DOI: 10.1007/978-3-662-60266-9_52.
24. Stratton, M.R., *Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise*. Science, 2011. **331**(6024): 1553-1558 DOI: 10.1126/science.1204040.
25. Loeb, L.A., *Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(6): 450-457 DOI: 10.1038/nrc3063.
26. Darwiche, N., *Epigenetic mechanisms and the hallmarks of cancer: an intimate affair*. Am J Cancer Res, 2020. **10**(7): 1954-1978.
27. Parks, S.K., Y. Cormerais, I. Marchiq, and J. Pouyssegur, *Hypoxia optimises tumour growth by controlling nutrient import and acidic metabolite export*. Mol Aspects Med, 2016. **47-48**: 3-14 DOI: 10.1016/j.mam.2015.12.001.
28. Gatenby, R.A. and R.J. Gillies, *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): 891-899 DOI: 10.1038/nrc1478.
29. DeBerardinis, R.J. and N.S. Chandel, *Fundamentals of cancer metabolism*. Sci Adv, 2016. **2**(5): e1600200 DOI: 10.1126/sciadv.1600200.
30. Kroemer, G. and J. Pouyssegur, *Tumor cell metabolism: cancer's achilles' heel*. Cancer Cell, 2008. **13**(6): 472-482 DOI: 10.1016/j.ccr.2008.05.005.
31. Pavlova, N.N. and C.B. Thompson, *The emerging hallmarks of cancer metabolism*. Cell Metab, 2016. **23**(1): 27-47 DOI: 10.1016/j.cmet.2015.12.006.
32. Cantuaria, G., A. Magalhaes, M. Penalver, R. Angioli, P. Braunschweiger, O. Gomez-Marin, R. Kanhoush, C. Gomez-Fernandez, and M. Nadji, *Expression of GLUT-1 glucose transporter in borderline and malignant epithelial tumors of the ovary*. Gynecol Oncol, 2000. **79**(1): 33-37 DOI: 10.1006/gyno.2000.5910.
33. Takacova, M., I. Kajanova, M. Kolarcikova, J. Lapinova, M. Zatovicova, and S. Pastorekova, *Understanding metabolic alterations and heterogeneity in cancer progression through validated immunodetection of key molecular components: a case of carbonic anhydrase IX*. Cancer Metastasis Rev, 2021. **40**(4): 1035-1053 DOI: 10.1007/s10555-021-10011-5.
34. Pavlides, S., D. Whitaker-Menezes, R. Castello-Cros, and N. Flomenberg, *The reverse Warburg effect aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma*. Cell Cycle, 2009. **8**(23): 3984-4001 DOI: 10.4161/cc.8.23.10238.
35. Afonso, J., L.L. Santos, A. Morais, T. Amaro, A. Longatto-Filho, and F. Baltazar, *Metabolic coupling in urothelial bladder cancer compartments and its correlation to tumor aggressiveness*. Cell Cycle, 2016. **15**(3): 368-380 DOI: 10.1080/15384101.2015.1121329.
36. Damaghi, M., J. Wojtkowiak, and R. Gillies, *pH sensing and regulation in cancer*. Front Physiol, 2013. **4**: 370 DOI: 10.3389/fphys.2013.00370.
37. Boedtkjer, E. and S.F. Pedersen, *The acidic tumor microenvironment as a driver of cancer*. Annu Rev Physiol, 2020. **82**(1): 103-126 DOI: 10.1146/annurev-physiol-021119-034627.
38. Türeci, Ö., U. Sahin, E. Vollmar, S. Siemer, E. Gottert, G. Seitz, A.K. Parkkila, G.N. Shah, J.H. Grubb, M. Pfreundschuh, and W.S. Sly, *Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): 7608-7613 DOI: 10.1073/pnas.95.13.7608.
39. Ivanov, S.V., I. Kuzmin, M.-H. Wei, S. Pack, L. Geil, B.E. Johnson, E.J. Stanbridge, and M.I. Lerman, *Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes*. Proc Natl Acad Sci, 1998. **95**(21): 12596-12601 DOI: 10.1073/pnas.95.21.12596.
40. Chiche, J., M.C. Brahimi-Horn, and J. Pouyssegur, *Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(4): 771-794 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00994.x.

41. Estrella, V., T. Chen, M. Lloyd, J. Wojtkowiak, H.H. Cornell, A. Ibrahim-Hashim, K. Bailey, Y. Balagurunathan, J.M. Rothberg, B.F. Sloane, J. Johnson, R.A. Gatenby, and R.J. Gillies, *Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion*. *Cancer Res*, 2013. **73**(5): 1524-1535 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2796.
42. Smallbone, K., R.A. Gatenby, R.J. Gillies, P.K. Maini, and D.J. Gavaghan, *Metabolic changes during carcinogenesis: potential impact on invasiveness*. *J Theor Biol*, 2007. **244**(4): 703-713 DOI: 10.1016/j.jtbi.2006.09.010.
43. Pillai, S.R., M. Damaghi, Y. Marunaka, E.P. Spugnini, S. Fais, and R.J. Gillies, *Causes, consequences, and therapy of tumors acidosis*. *Cancer Metastasis Rev*, 2019. **38**(1-2): 205-222 DOI: 10.1007/s10555-019-09792-7.
44. Ibrahim-Hashim, A. and V. Estrella, *Acidosis and cancer: from mechanism to neutralization*. *Cancer Metastasis Rev*, 2019. **38**(1): 149-155 DOI: 10.1007/s10555-019-09787-4.
45. Zhao, H., A. Achreja, E. Iessi, M. Logozzi, D. Mizzoni, R. Di Raimo, D. Nagrath, and S. Fais, *The key role of extracellular vesicles in the metastatic process*. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2018. **1869**(1): 64-77 DOI: 10.1016/j.bbcan.2017.11.005.
46. Riemann, A., M. Rauschner, M. Gießelmann, S. Reime, V. Haupt, and O. Thews, *Extracellular acidosis modulates the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers and adhesion of epithelial and tumor cells*. *Neoplasia*, 2019. **21**(5): 450-458 DOI: 10.1016/j.neo.2019.03.004.
47. Doyen, J., S. Parks, S. Marcie, J. Pouyssegur, and J. Chiche, *Knock-down of hypoxia-induced carbonic anhydrases IX and XII radiosensitizes tumor cells by increasing intracellular acidosis*. *Front Oncol*, 2013. **2**: 199 DOI: 10.3389/fonc.2012.00199.
48. Mboge, M.Y., B.P. Mahon, R. McKenna, and S.C. Frost, *Carbonic anhydrases: role in pH control and cancer*. *Metabolites*, 2018. **8**(1): 19 DOI: 10.3390/metabo8010019.
49. Lee, S.-H. and J.R. Griffiths, *How and why are cancers acidic? Carbonic anhydrase IX and the homeostatic control of tumour extracellular pH*. *Cancers*, 2020. **12**(6): 1616 DOI: 10.3390/cancers12061616.
50. Haapasalo, J., K. Nordfors, H. Haapasalo, and S. Parkkila, *The expression of carbonic anhydrases II, IX and XII in brain tumors*. *Cancers*, 2020. **12**(7): 1723 DOI: 10.3390/cancers12071723.
51. Parkkila, S., *Carbonic anhydrase isozymes as diagnostic biomarkers and therapeutic targets*, in *The carbonic anhydrases: current and emerging therapeutic targets.*, W.R. Chegwiddden and N.D. Carter, Editors. 2021, Springer International Publishing: Cham. p. 13-36.
52. Supuran, Claudiu T., *Emerging role of carbonic anhydrase inhibitors*. *Clin Sci*, 2021. **135**(10): 1233-1249 DOI: 10.1042/cs20210040.
53. Waheed, A. and W.S. Sly, *Carbonic anhydrase XII functions in health and disease*. *Gene*, 2017. **623**: 33-40 DOI: 10.1016/j.gene.2017.04.027.
54. Haapasalo, J., M. Hilvo, K. Nordfors, H. Haapasalo, S. Parkkila, A. Hyrskyluoto, I. Rantala, A. Waheed, W.S. Sly, S. Pastorekova, J. Pastorek, and A.-K. Parkkila, *Identification of an alternatively spliced isoform of carbonic anhydrase XII in diffusely infiltrating astrocytic gliomas*. *Neuro Oncol*, 2008. **10**(2): 131-138 DOI: 10.1215/15228517-2007-065.
55. Lee, M., B. Vecchio-Pagan, N. Sharma, A. Waheed, X. Li, K.S. Raraigh, S. Robbins, S.T. Han, A.L. Franca, M.J. Pellicore, T.A. Evans, K.M. Arcara, H. Nguyen, S. Luan, D. Belchis, J. Hertecant, J. Zabner, W.S. Sly, and G.R. Cutting, *Loss of carbonic anhydrase XII function in individuals with elevated sweat chloride concentration and pulmonary airway disease*. *Hum Mol Genet*, 2016. **25**(10): 1923-1933 DOI: 10.1093/hmg/ddw065.
56. Whittington, D.A., A. Waheed, B. Ulmasov, G.N. Shah, J.H. Grubb, W.S. Sly, and D.W. Christianson, *Crystal structure of the dimeric extracellular domain of human carbonic anhydrase XII, a bitopic membrane protein overexpressed in certain cancer tumor cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(17): 9545-9550 DOI: 10.1073/pnas.161301298.
57. Di Fiore, A., C.T. Supuran, A. Scaloni, and G. De Simone, *Post-translational modifications in tumor-associated carbonic anhydrases*. *Amino Acids*, 2022. **54**(4): 543-558 DOI: 10.1007/s00726-021-03063-y.
58. Hulikova, A., M. Zatovicova, E. Svastova, P. Ditte, R. Bresseur, R. Kettmann, C.T. Supuran, J. Kopacek, J. Pastorek, and S. Pastorekova, *Intact intracellular tail is critical for proper functioning of the tumor-associated, hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(22): 3563-3568 DOI: 10.1016/j.febslet.2009.10.060.
59. Liao, S.-Y., M.I. Lerman, and E.J. Stanbridge, *Expression of transmembrane carbonic anhydrases, CAIX and CAXII, in human development*. *BMC Dev Biol*, 2009. **9**(1): 22 DOI: 10.1186/1471-213X-9-22.

60. Wykoff, C.C., N. Beasley, P.H. Watson, L. Campo, S.K. Chia, R. English, J. Pastorek, W.S. Sly, P. Ratcliffe, and A.L. Harris, *Expression of the hypoxia-inducible and tumor-associated carbonic anhydrases in ductal carcinoma in situ of the breast*. *Am J Pathol*, 2001. **158**(3): 1011-1019 DOI: 10.1016/s0002-9440(10)64048-5.
61. Watson, P., S. Chia, C. Wykoff, C. Han, R. Leek, W. Sly, K. Gatter, P. Ratcliffe, and A. Harris, *Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma*. *Br J Cancer*, 2003. **88**(7): 1065-1070 DOI: 10.1038/sj.bjc.6600796.
62. Wykoff, C.C., N.J. Beasley, P.H. Watson, K.J. Turner, J. Pastorek, A. Sibtain, G.D. Wilson, H. Turley, K.L. Talks, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe, and A.L. Harris, *Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases*. *Cancer Res*, 2000. **60**(24): 7075-7083.
63. Ivanov, S., S.Y. Liao, A. Ivanova, A. Danilkovitch-Miagkova, N. Tarasova, G. Weirich, M.J. Merrill, M.A. Proescholdt, E.H. Oldfield, J. Lee, J. Zavada, A. Waheed, W. Sly, M.I. Lerman, and E.J. Stanbridge, *Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer*. *Am J Pathol*, 2001. **158**(3): 905-919 DOI: 10.1016/s0002-9440(10)64038-2.
64. Lin, F.-L., J.-T. Yen, P.-W. Fang, S.-Q. Xu, J.-C. Lin, and K.-T. Tan, *Protein-labeling fluorescent probe reveals ectodomain shedding of transmembrane carbonic anhydrases*. *ACS Chem Biol*, 2022. **17**(11): 3218-3228 DOI: 10.1021/acscchembio.2c00679.
65. Gondi, G., *Einfluss eines Carboanhydrase XII-spezifischen Antikörpers auf das Tumorstadium in vitro und in vivo sowie Onkosomen-basierte Generierung neuer tumorreaktiver Antikörper*. Dissertation, 2013. LMU München DOI: 10.5282/edoc.16170.
66. Kopecka, J., I. Campia, A. Jacobs, A.P. Frei, D. Ghigo, B. Wollscheid, and C. Riganti, *Carbonic anhydrase XII is a new therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer cells*. *Oncotarget*, 2015. **6**(9): 6776-6793 DOI: 10.18632/oncotarget.2882.
67. Ning, W.-R., D. Jiang, X.-C. Liu, Y.-F. Huang, Z.-P. Peng, Z.-Z. Jiang, T. Kang, S.-M. Zhuang, Y. Wu, and L. Zheng, *Carbonic anhydrase XII mediates the survival and prometastatic functions of macrophages in human hepatocellular carcinoma*. *J Clin Invest*, 2022. **132**(7): e153110 DOI: 10.1172/JCI1153110.
68. Chiche, J., K. Ilc, J. Laferriere, E. Trottier, F. Dayan, N.M. Mazure, M.C. Brahimi-Horn, and J. Pouyssegur, *Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH*. *Cancer Res*, 2009. **69**(1): 358-368 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2470.
69. Kallio, H., A. Rodriguez, M. Hilvo, A. Hyrskyluoto, and S. Parkkila, *Cancer-associated carbonic anhydrases IX and XII: effect of growth factors on gene expression in human cancer cell lines*. *Journal of Cancer Molecules*, 2010. **5**(3): 73-78.
70. Barnett, D.H., S. Sheng, T.H. Charn, A. Waheed, W.S. Sly, C.-Y. Lin, E.T. Liu, and B.S. Katzenellenbogen, *Estrogen receptor regulation of carbonic anhydrase XII through a distal enhancer in breast cancer*. *Cancer Res*, 2008. **68**(9): 3505-3515 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6151.
71. Porras, L., F. Gorse, N.K. Thiombane, L. Gaboury, and S. Mader, *CAXII Is a surrogate marker for luminal breast tumors regulated by ER and GATA3*. *Cancers*, 2022. **14**(21): 5453 DOI: 10.3390/cancers14215453.
72. Franke, C.M., V.W. Gu, B.G. Grimm, V.C. Cassady, J.R. White, R.J. Weigel, and M.V. Kulak, *TFAP2C regulates carbonic anhydrase XII in human breast cancer*. *Oncogene*, 2020. **39**(6): 1290-1301 DOI: 10.1038/s41388-019-1062-5.
73. Inagaki, T., A. Moschetta, Y.-K. Lee, L. Peng, G. Zhao, M. Downes, R.T. Yu, J.M. Shelton, J.A. Richardson, J.J. Repa, D.J. Mangelsdorf, and S.A. Kliewer, *Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor*. *Proc Natl Acad Sci*, 2006. **103**(10): 3920-3925 DOI: 10.1073/pnas.0509592103.
74. Tonissen, K.F. and S.-A. Poulsen, *Carbonic anhydrase XII inhibition overcomes P-glycoprotein-mediated drug resistance: a potential new combination therapy in cancer*. *Cancer Drug Resist*, 2021. **4**: 343-355 DOI: 10.20517/cdr.2020.110.
75. Lounnas, N., C. Rosilio, M. Nebout, D. Mary, E. Griessinger, Z. Neffati, J. Chiche, H. Spits, T.J. Hagenbeek, V. Asnafi, S.-A. Poulsen, C.T. Supuran, J.-F. Peyron, and V. Imbert, *Pharmacological inhibition of carbonic anhydrase XII interferes with cell proliferation and induces cell apoptosis in T-cell lymphomas*. *Cancer Lett*, 2013. **333**(1): 76-88 DOI: 10.1016/j.canlet.2013.01.020.
76. Gondi, G., J. Mysliwicz, A. Hulikova, J.P. Jen, P. Swietach, E. Kremmer, and R. Zeidler, *Antitumor efficacy of a monoclonal antibody that inhibits the activity of cancer-associated carbonic anhydrase XII*. *Cancer Res*, 2013. **73**(21): 6494-6503 DOI: 10.1158/0008-5472.Can-13-1110.

77. Chafe, S.C., F.S. Vizeacoumar, G. Venkateswaran, O. Nemirovsky, S. Awrey, W.S. Brown, P.C. McDonald, F. Carta, A. Metcalfe, J.M. Karasinska, L. Huang, S.K. Muthuswamy, D.F. Schaeffer, D.J. Renouf, C.T. Supuran, F.J. Vizeacoumar, and S. Dedhar, *Genome-wide synthetic lethal screen unveils novel CAIX-NFS1/xCT axis as a targetable vulnerability in hypoxic solid tumors*. *Sci Adv*, 2021. **7**(35) DOI: 10.1126/sciadv.abj0364.
78. Hsieh, M.-J., K.-S. Chen, H.-L. Chiou, and Y.-S. Hsieh, *Carbonic anhydrase XII promotes invasion and migration ability of MDA-MB-231 breast cancer cells through the p38 MAPK signaling pathway*. *Eur J Cell Biol*, 2010. **89**(8): 598-606 DOI: 10.1016/j.ejcb.2010.03.004.
79. Daunys, S. and V. Petrikaite, *The roles of carbonic anhydrases IX and XII in cancer cell adhesion, migration, invasion and metastasis*. *Biol Cell*, 2020. **112**(12): 383-397 DOI: 10.1111/boc.201900099.
80. Giuntini, G., S. Monaci, Y. Cau, M. Mori, A. Naldini, and F. Carraro, *Inhibition of melanoma cell migration and invasion targeting the hypoxic tumor associated CAXII*. *Cancers*, 2020. **12**(10): 3018 DOI: 10.3390/cancers12103018.
81. Li, G., T.-W. Chen, A.-C. Nickel, S. Muhammad, H.-J. Steiger, T. Tzaridis, D. Hänggi, R. Zeidler, W. Zhang, and U.D. Kahlert, *Carbonic anhydrase XII is a clinically significant, molecular tumor-subtype specific therapeutic target in glioma with the potential to combat invasion of brain tumor cells*. *Onco Targets Ther*, 2021. **14**: 1707-1718 DOI: 10.2147/ott.S300623.
82. von Neubeck, B., G. Gondi, C. Riganti, C. Pan, A. Parra Damas, H. Scherb, A. Erturk, and R. Zeidler, *An inhibitory antibody targeting carbonic anhydrase XII abrogates chemoresistance and significantly reduces lung metastases in an orthotopic breast cancer model in vivo*. *Int J Cancer*, 2018. **143**(8): 2065-2075 DOI: 10.1002/ijc.31607.
83. Battke, C., E. Kremmer, J. Mysliwicz, G. Gondi, C. Dumitru, S. Brandau, S. Lang, D. Vullo, C. Supuran, and R. Zeidler, *Generation and characterization of the first inhibitory antibody targeting tumour-associated carbonic anhydrase XII*. *Cancer Immunol Immunother*, 2011. **60**(5): 649-658 DOI: 10.1007/s00262-011-0980-z.
84. Leppilampi, M., J. Saarnio, T.J. Karttunen, J. Kivelä, S. Pastorekova, A. Waheed, W.S. Sly, and S. Parkkila, *Carbonic anhydrase isozymes IX and XII in gastric tumors*. *World J Gastroenterol*, 2003. **9**(7): 1398-1403 DOI: 10.3748/wjg.v9.i7.1398.
85. Ilie, M.I., V. Hofman, C. Ortholan, R.E. Amadi, C. Bonnetaud, K. Havet, N. Venissac, J. Mouroux, N.M. Mazure, J. Pouyssegur, and P. Hofman, *Overexpression of carbonic anhydrase XII in tissues from resectable non-small cell lung cancers is a biomarker of good prognosis*. *Int J Cancer*, 2011. **128**(7): 1614-1623 DOI: 10.1002/ijc.25491.
86. Kivelä, A., S. Parkkila, J. Saarnio, T.J. Karttunen, J. Kivelä, A.K. Parkkila, A. Waheed, W.S. Sly, J.H. Grubb, G. Shah, O. Türeci, and H. Rajaniemi, *Expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase isozyme XII in normal human gut and colorectal tumors*. *Am J Pathol*, 2000. **156**(2): 577-584 DOI: 10.1016/s0002-9440(10)64762-1.
87. Mboge, M.Y., R. McKenna, and S.C. Frost, *Advances in anti-cancer drug development targeting carbonic anhydrase IX and XII*. *Top Anticancer Res*, 2015. **5**: 3-42 DOI: 10.2174/9781681083339116050004.
88. Uda, N.R., F. Stenner, V. Seibert, P. Herzig, N. Markuly, M. Van Dijk, A. Zippelius, and C. Renner, *Humanized monoclonal antibody blocking carbonic anhydrase 12 enzymatic activity leads to reduced tumor growth in vitro*. *Anticancer Res*, 2019. **39**(8): 4117-4128 DOI: 10.21873/anticancer.13570.
89. Stravinskiene, D., A. Sliziene, L. Baranauskiene, V. Petrikaite, and A. Zvirbliene, *Inhibitory monoclonal antibodies and their recombinant derivatives targeting surface-exposed carbonic anhydrase XII on cancer cells*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(24): 9411 DOI: 10.3390/ijms21249411.
90. Alterio, V., M. Kellner, D. Esposito, F. Liesche-Starnecker, S. Bua, C.T. Supuran, S.M. Monti, R. Zeidler, and G. De Simone, *Biochemical and structural insights into carbonic anhydrase XII/Fab6A10 complex*. *J Mol Biol*, 2019. **431**(24): 4910-4921 DOI: 10.1016/j.jmb.2019.10.022.
91. Testa, C., A.M. Papini, R. Zeidler, D. Vullo, F. Carta, C.T. Supuran, and P. Rovero, *First studies on tumor associated carbonic anhydrases IX and XII monoclonal antibodies conjugated to small molecule inhibitors*. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2022. **37**(1): 592-596 DOI: 10.1080/14756366.2021.2004593.
92. Tafreshi, N.K., M.M. Bui, K. Bishop, M.C. Lloyd, S.A. Enkemann, A.S. Lopez, D. Abrahams, B.W. Carter, J. Vagner, S.R. Grobmyer, R.J. Gillies, and D.L. Morse, *Noninvasive detection of breast cancer lymph node metastasis using carbonic*

- anhydrases IX and XII targeted imaging probes*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(1): 207-219 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0238.
93. Fiedler, L., *Diagnostic and therapeutic applications of CA XII targeting 6A10 Fab*. Dissertation, 2019. LMU München DOI: 10.5282/edoc.23493.
 94. Pan, C., O. Schoppe, A. Parra-Damas, R. Cai, M.I. Todorov, G. Gondj, B. von Neubeck, N. Bögürçü-Seidel, S. Seidel, K. Sleiman, C. Veltkamp, B. Förstera, H. Mai, Z. Rong, O. Trompak, A. Ghasemigharagoz, M.A. Reimer, A.M. Cuesta, J. Coronel, I. Jeremias, D. Saur, A. Acker-Palmer, T. Acker, B.K. Garvalov, B. Menze, R. Zeidler, and A. Ertürk, *Deep learning reveals cancer metastasis and therapeutic antibody targeting in the entire body*. Cell, 2019. **179**(7): 1661-1676 DOI: 10.1016/j.cell.2019.11.013.
 95. Roll, W., M. Müther, G. Böning, A. Delker, N. Warneke, F.-J. Gildehaus, M. Schäfers, W. Stummer, R. Zeidler, H.-J. Reulen, and L. Stegger, *First clinical experience with fractionated intracavitary radioimmunotherapy using [(177)Lu]Lu-6A10-Fab fragments in patients with glioblastoma: a pilot study*. EJNMMI Res, 2023. **13**(1): 78 DOI: 10.1186/s13550-023-01029-7.
 96. Kobayashi, M., T. Matsumoto, S. Ryuge, K. Yanagita, R. Nagashio, Y. Kawakami, N. Goshima, S.X. Jiang, M. Saegusa, A. Iyoda, Y. Satoh, N. Masuda, and Y. Sato, *CAXII Is a sero-diagnostic marker for lung cancer*. PLoS One, 2012. **7**(3): e33952 DOI: 10.1371/journal.pone.0033952.
 97. Hiepp, L., D. Mayr, K. Gärtner, E. Schmoeckel, F. Klauschen, A. Burges, S. Mahner, R. Zeidler, and B. Czogalla, *Carbonic anhydrase XII as biomarker and therapeutic target in ovarian carcinomas*. PLoS One, 2022. **17**(7): e0271630 DOI: 10.1371/journal.pone.0271630.
 98. Todenhöfer, T., E.A. Gibb, R. Seiler, A. Kamyabi, J. Hennenlotter, P. McDonald, I. Moskalev, C. Stewart, J. Gao, L. Fazli, S. Dedhar, A. Stenzl, H.Z. Oo, and P.C. Black, *Evaluation of carbonic anhydrase IX as a potential therapeutic target in urothelial carcinoma*. Urol Oncol, 2021. **39**(8): 498.e491-498.e411 DOI: 10.1016/j.urolonc.2021.04.011.
 99. de Martino, M., I. Lucca, A. Mbeutcha, H.G. Wiener, A. Haitel, M. Susani, S.F. Shariat, and T. Klatter, *Carbonic anhydrase IX as a diagnostic urinary marker for urothelial bladder cancer*. Eur Urol, 2015. **68**(4): 552-554 DOI: 10.1016/j.eururo.2015.06.015.
 100. Klatter, T., D.B. Seligson, J.Y. Rao, H. Yu, M. de Martino, K. Kawaoka, S.G. Wong, A.S. Belldegrun, and A.J. Pantuck, *Carbonic anhydrase IX in bladder cancer: a diagnostic, prognostic, and therapeutic molecular marker*. Cancer, 2009. **115**(7): 1448-1458 DOI: 10.1002/cncr.24163.
 101. Hynninen, P., L. Vaskivuo, J. Saarnio, H. Haapasalo, J. Kivelä, S. Pastorekova, J. Pastorek, A. Waheed, W.S. Sly, U. Puistola, and S. Parkkila, *Expression of transmembrane carbonic anhydrases IX and XII in ovarian tumours*. Histopathology, 2006. **49**(6): 594-602 DOI: 10.1111/j.1365-2559.2006.02523.x.
 102. Choschzick, M., E. Oosterwijk, V. Müller, L. Woelber, R. Simon, H. Moch, and P. Tennstedt, *Overexpression of carbonic anhydrase IX (CAIX) is an independent unfavorable prognostic marker in endometrioid ovarian cancer*. Virchows Arch, 2011. **459**(2): 193-200 DOI: 10.1007/s00428-011-1105-y.
 103. Uhlen, M., C. Zhang, S. Lee, E. Sjöstedt, L. Fagerberg, G. Bidkhorji, R. Benfeitas, M. Arif, Z. Liu, F. Edfors, K. Sanli, K. von Feilitzen, P. Oksvold, E. Lundberg, S. Hober, P. Nilsson, J. Mattsson, J.M. Schwenk, H. Brunnström, B. Glimelius, T. Sjöblom, P.-H. Edqvist, D. Djureinovic, P. Micke, C. Lindskog, A. Mardinoglu, and F. Ponten, *A pathology atlas of the human cancer transcriptome*. Science, 2017. **357**(6352): eaan2507 DOI: 10.1126/science.aan2507.
 104. Martin, S., R. Raveendran, R. Ahalya, and V.K. Gopalakrishnan, *Expression of carbonic anhydrase IX & XII in ovarian cancer tissues*. Biotechnol (Rajkot), 2009. **3**(4): 294-298.
 105. Zaborowski, M.P., K. Lee, Y.J. Na, A. Sammarco, X. Zhang, M. Iwanicki, P.S. Cheah, H.-Y. Lin, M. Zinter, C.-Y. Chou, G. Fulci, B.A. Tannous, C.P.-K. Lai, M.J. Birrer, R. Weissleder, H. Lee, and X.O. Breakefield, *Methods for systematic identification of membrane proteins for specific capture of cancer-derived extracellular vesicles*. Cell Rep, 2019. **27**(1): 255-268. e256 DOI: 10.1016/j.celrep.2019.03.003.
 106. Uhlen, M., L. Fagerberg, B.M. Hallström, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjöstedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C.A.-K. Szigyarto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J.O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P.-H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J.M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen, and F. Ponten, *Tissue-based map of the human proteome*. Science, 2015. **347**(6220): 1260419 DOI: 10.1126/science.1260419.

107. Chien, M.-H., T.-H. Ying, Y.-H. Hsieh, C.-H. Lin, C.-H. Shih, L.-H. Wei, and S.-F. Yang, *Tumor-associated carbonic anhydrase XII is linked to the growth of primary oral squamous cell carcinoma and its poor prognosis*. *Oral Oncol*, 2012. **48**(5): 417-423 DOI: 10.1016/j.oraloncology.2011.11.015.
108. Ochi, F., A. Shiozaki, D. Ichikawa, H. Fujiwara, S. Nakashima, K. Takemoto, T. Kosuga, H. Konishi, S. Komatsu, K. Okamoto, M. Kishimoto, Y. Marunaka, and E. Otsuji, *Carbonic anhydrase XII as an independent prognostic factor in advanced esophageal squamous cell carcinoma*. *J Cancer*, 2015. **6**(10): 922-929 DOI: 10.7150/jca.11269.
109. Vergara, D., S. Ravaioli, E. Fonzi, L. Adamo, M. Damato, S. Bravaccini, F. Pirini, A. Gaballo, R. Barbano, B. Pasculli, J. Franck, I. Fournier, M. Salzet, and M. Maffia, *Carbonic anhydrase XII expression is modulated during epithelial mesenchymal transition and regulated through protein kinase C signaling*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(3): 715 DOI: 10.3390/ijms21030715.
110. Sendelhofert, A. and A. Heier, [persönliche Kommunikation am 11.04.2019].
111. Lang, G., *Immunhistochemie*, in *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2013, Springer: Wien. p. 269-304 DOI: 10.1007/978-3-7091-1190-1_12.
112. Anderson, J., G. Rolls, and W. Steven. *Immunohistochemistry: an overview + steps to better IHC staining*. [zuletzt abgerufen am: 05.02.2023]; URL: <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/an-animated-guide-to-immunohistochemistry/>.
113. Remmele, W. and H.E. Stegner, *Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue*. *Pathologe*, 1987. **8**(3): 138-140.
114. Hemmerich, W. *StatistikGuru: Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse: Gruppen an einem bestimmten Zeitpunkt vergleichen*. 2021 [zuletzt abgerufen am: 23.09.2023]; URL: <https://statistikguru.de/spss/kaplan-meier/gruppen-zeitpunkt-vergleichen.html>.
115. Tellez-Gabriel, M., B. Ory, F. Lamoureux, M.-F. Heymann, and D. Heymann *Tumour heterogeneity: the key advantages of single-cell analysis*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**, 2142 DOI: 10.3390/ijms17122142.
116. Miki, T., S.-h. Fujishima, K. Komatsu, K. Kuwata, S. Kiyonaka, and I. Hamachi, *LDAI-based chemical labeling of intact membrane proteins and its pulse-chase analysis under live cell conditions*. *Chem Biol*, 2014. **21**(8): 1013-1022 DOI: 10.1016/j.chembiol.2014.07.013.
117. Tondo-Steele, K. and K. McLean, *The "sweet spot" of targeting tumor metabolism in ovarian cancers*. *Cancers*, 2022. **14**(19): 4696 DOI: 10.3390/cancers14194696.
118. Karhumaa, P., S. Parkkila, O. Türeci, A. Waheed, J.H. Grubb, G. Shah, A. Parkkila, K. Kaunisto, J. Tapanainen, W.S. Sly, and H. Rajaniemi, *Identification of carbonic anhydrase XII as the membrane isozyme expressed in the normal human endometrial epithelium*. *Mol Hum Reprod*, 2000. **6**(1): 68-74 DOI: 10.1093/molehr/6.1.68.
119. Ozensoy Guler, O., C.T. Supuran, and C. Capasso, *Carbonic anhydrase IX as a novel candidate in liquid biopsy*. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2020. **35**(1): 255-260 DOI: 10.1080/14756366.2019.1697251.
120. Lawson, N.L., P.W. Scorer, G.H. Williams, M.E. Vandenberghe, M.J. Ratcliffe, and C. Barker, *Impact of decalcification, cold ischemia, and deglycosylation on performance of programmed cell death ligand-1 antibodies with different binding epitopes: comparison of 7 clones*. *Mod Pathol*, 2023. **36**(9): 100220 DOI: 10.1016/j.modpat.2023.100220.
121. Power, K.A., S. Grad, J.P. Rutges, L.B. Creemers, M.H. van Rijen, P. O'Gaora, J.G. Wall, M. Alini, A. Pandit, and W.M. Gallagher, *Identification of cell surface-specific markers to target human nucleus pulposus cells: expression of carbonic anhydrase XII varies with age and degeneration*. *Arthritis Rheum*, 2011. **63**(12): 3876-3886 DOI: 10.1002/art.30607.
122. Sorkin, A. and M. von Zastrow, *Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(9): 609-622 DOI: 10.1038/nrm2748.
123. Bryant, D.M. and J.L. Stow, *Nuclear translocation of cell-surface receptors: lessons from fibroblast growth factor*. *Traffic*, 2005. **6**(10): 947-953 DOI: 10.1111/j.1600-0854.2005.00332.x.
124. Liu, Y., P. Li, L. Fan, and M. Wu, *The nuclear transportation routes of membrane-bound transcription factors*. *Cell Commun Signal*, 2018. **16**(1): 12 DOI: 10.1186/s12964-018-0224-3.
125. Svastova, E., N. Zilka, M. Zatovicova, A. Gibadulinova, F. Ciampor, J. Pastorek, and S. Pastorekova, *Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with β -catenin*. *Exp Cell Res*, 2003. **290**(2): 332-345 DOI: 10.1016/S0014-4827(03)00351-3.

126. Buanne, P., G. Renzone, F. Monteleone, M. Vitale, S.M. Monti, A. Sandomenico, C. Garbi, D. Montanaro, M. Accardo, G. Troncone, M. Zatovicova, L. Csaderova, C.T. Supuran, S. Pastorekova, A. Scaloni, G. De Simone, and N. Zambrano, *Characterization of carbonic anhydrase IX interactome reveals proteins assisting its nuclear localization in hypoxic cells*. J Proteome Res, 2013. **12**(1): 282-292 DOI: 10.1021/pr300565w.
127. Eom, K.-Y., M.H. Jang, S.Y. Park, E.Y. Kang, S.W. Kim, J.H. Kim, J.-S. Kim, and I.A. Kim, *The expression of carbonic anhydrase (CA) IX/XII and lymph node metastasis in early breast cancer*. Cancer Res Treat, 2016. **48**(1): 125-132 DOI: 10.4143/crt.2014.243.
128. Ambrosio, M.R., C. Di Serio, G. Danza, B.J. Rocca, A. Ginori, I. Prudovsky, N. Marchionni, M.T. del Vecchio, and F. Tarantini, *Carbonic anhydrase IX is a marker of hypoxia and correlates with higher Gleason scores and ISUP grading in prostate cancer*. Diagn Pathol, 2016. **11**: 45 DOI: 10.1186/s13000-016-0495-1.
129. Rezuchova, I., M. Bartosova, P. Belvoncikova, M. Takacova, M. Zatovicova, L. Jelenska, L. Csaderova, I. Meciarova, and K. Pohlodek *Carbonic anhydrase IX in tumor tissue and plasma of breast cancer patients: reliable biomarker of hypoxia and prognosis*. Int J Mol Sci, 2023. **24**, 4325 DOI: 10.3390/ijms24054325.
130. Logozzi, M., C. Capasso, R. Di Raimo, S. Del Prete, D. Mizzone, M. Falchi, C.T. Supuran, and S. Fais, *Prostate cancer cells and exosomes in acidic condition show increased carbonic anhydrase IX expression and activity*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2019. **34**(1): 272-278 DOI: 10.1080/14756366.2018.1538980.
131. Sedlakova, O., E. Svastova, M. Takacova, J. Kopacek, J. Pastorek, and S. Pastorekova, *Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors*. Front Physiol, 2014. **4**: 400 DOI: 10.3389/fphys.2013.00400.
132. Christianson, H.C., J.A. Menard, V. Indira Chandran, E. Bourseau-Guilmain, D. Shevela, J. Lidfeldt, A.-S. Mansson, S. Pastorekova, J. Messinger, and M. Belting, *Tumor antigen glycosaminoglycan modification regulates antibody-drug conjugate delivery and cytotoxicity*. Oncotarget, 2017. **8**(40): 66960-66974 DOI: 10.18632/oncotarget.16921.
133. Zatovicova, M. and S. Pastorekova, *Modulation of cell surface density of carbonic anhydrase IX by shedding of the ectodomain and endocytosis*. Acta Virol, 2013. **57**: 257-264 DOI: 10.4149/av_2013_02_257.
134. Vidlickova, I., F. Dequiedt, L. Jelenska, O. Sedlakova, M. Pastorek, S. Stuchlik, J. Pastorek, M. Zatovicova, and S. Pastorekova, *Apoptosis-induced ectodomain shedding of hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX from tumor cells: a double-edged response to chemotherapy*. BMC Cancer, 2016. **16**: 239 DOI: 10.1186/s12885-016-2267-4.
135. Barathova, M., M. Takacova, T. Holotnakova, A. Gibadulinova, A. Ohradanova, M. Zatovicova, A. Hulikova, J. Kopacek, S. Parkkila, C.T. Supuran, S. Pastorekova, and J. Pastorek, *Alternative splicing variant of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX expressed independently of hypoxia and tumour phenotype*. Br J Cancer, 2008. **98**(1): 129-136 DOI: 10.1038/sj.bjc.6604111.
136. Hong, J.H., E. Muhammad, C. Zheng, E. Hershkovitz, S. Alkrinawi, N. Loewenthal, R. Parvari, and S. Muallem, *Essential role of carbonic anhydrase XII in secretory gland fluid and HCO₃⁻ secretion revealed by disease causing human mutation*. J Physiol, 2015. **593**(24): 5299-5312 DOI: 10.1113/JP271378.
137. Gurung, S., D. Perocheau, L. Touramanidou, and J. Baruteau, *The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling*. Cell Commun Signal, 2021. **19**(1): 47 DOI: 10.1186/s12964-021-00730-1.
138. Franzen, C.A., R.H. Blackwell, V. Todorovic, K.A. Greco, K.E. Foreman, R.C. Flanigan, P.C. Kuo, and G.N. Gupta, *Urothelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition after exposure to muscle invasive bladder cancer exosomes*. Oncogenesis, 2015. **4**(8): e163-e163 DOI: 10.1038/oncsis.2015.21.
139. Nguyen, V.H.L., R. Hough, S. Bernaudo, and C. Peng, *Wnt/β-catenin signalling in ovarian cancer: insights into its hyperactivation and function in tumorigenesis*. J Ovarian Res, 2019. **12**(1): 122 DOI: 10.1186/s13048-019-0596-z.
140. Matsue, T., M. Gi, M. Shiota, H. Tachibana, S. Suzuki, M. Fujioka, A. Kakehashi, T. Yamamoto, M. Kato, J. Uchida, and H. Wanibuchi, *The carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide inhibits urinary bladder cancers via suppression of β-catenin signaling*. Cancer Sci, 2022. **113**(8): 2642-2653 DOI: 10.1111/cas.15467.
141. Sasso, E., M. Vitale, F. Monteleone, F.L. Boffo, M. Santoriello, D. Sarnataro, C. Garbi, M. Sabatella, B. Crifo, L.A. Paolella, G. Minopoli, J.-Y. Winum, and N. Zambrano, *Binding of carbonic anhydrase IX to 45S rDNA genes is prevented by exportin-1 in hypoxic cells*. BioMed Res Int, 2015. **2015**: 674920 DOI: 10.1155/2015/674920.
142. Manandhar, P., *Homology modeling and docking study of Danio rerio Carbonic Anhydrase VI-Pentraxin protein and bioinformatics analysis of extra-cellular CAs*.

- Masterarbeit, 2015. University of Tampere. URL: <https://urn.fi/URN:NBN:fi:uta-201512022478>.
143. Succio, M., S. Amiranda, E. Sasso, C. Marciano, A. Finizio, G. De Simone, C. Garbi, and N. Zambrano, *Carbonic anhydrase IX subcellular localization in normoxic and hypoxic SH-SY5Y neuroblastoma cells is assisted by its C-terminal protein interaction domain*. *Heliyon*, 2023. **9**(8): E18885 DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e18885.
 144. Nortunen, M., N. Väkiparta, S. Parkkila, J. Saarnio, H. Huhta, and T.J. Karttunen, *Carbonic anhydrases II, IX, and XII in reflux esophagitis*. *Dig Dis Sci*, 2022. **67**(5): 1761-1772 DOI: 10.1007/s10620-021-06985-5.
 145. Shin, K., J. Lee, N. Guo, J. Kim, A. Lim, L. Qu, I.U. Mysorekar, and P.A. Beachy, *Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder*. *Nature*, 2011. **472**(7341): 110-114 DOI: 10.1038/nature09851.
 146. Fiaschi, T., E. Giannoni, L. Taddei, P. Cirri, A. Marini, G. Pintus, C. Nativi, B. Richichi, A. Scozzafava, F. Carta, E. Torre, C.T. Supuran, and P. Chiarugi, *Carbonic anhydrase IX from cancer-associated fibroblasts drives epithelial-mesenchymal transition in prostate carcinoma cells*. *Cell Cycle*, 2013. **12**(11): 1791-1801 DOI: 10.4161/cc.24902.
 147. Stordal, B., M. Hamon, V. McEneaney, S. Roche, J.P. Gillet, J.J. O'Leary, M. Gottesman, and M. Clynes, *Resistance to paclitaxel in a cisplatin-resistant ovarian cancer cell line is mediated by P-glycoprotein*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): e40717 DOI: 10.1371/journal.pone.0040717.
 148. Liu, Y.G., M.M. Bui, and B. Xu, *Urothelial carcinoma with squamous differentiation is associated with high tumor stage and pelvic lymph-node metastasis*. *Cancer Control*, 2017. **24**(1): 78-82 DOI: 10.1177/107327481702400113.
 149. Weyerer, V., R. Stoehr, S. Bertz, F. Lange, C.I. Geppert, S. Wach, H. Taubert, D. Sikic, B. Wullich, A. Hartmann, and M. Eckstein, *Prognostic impact of molecular muscle-invasive bladder cancer subtyping approaches and correlations with variant histology in a population-based mono-institutional cystectomy cohort*. *World J Urol*, 2021. **39**(11): 4011-4019 DOI: 10.1007/s00345-021-03788-1.
 150. Lloyd, M.C., J.J. Cunningham, M.M. Bui, R.J. Gillies, J.S. Brown, and R.A. Gatenby, *Darwinian dynamics of intratumoral heterogeneity: not solely random mutations but also variable environmental selection forces*. *Cancer Res*, 2016. **76**(11): 3136-3144 DOI: 10.1158/0008-5472.Can-15-2962.
 151. Burges, A., A. Brüning, C. Dannenmann, T. Blankenstein, U. Jeschke, N. Shabani, K. Friese, and I. Mylonas, *Prognostic significance of estrogen receptor alpha and beta expression in human serous carcinomas of the ovary*. *Arch Gynecol Obstet*, 2010. **281**(3): 511-517 DOI: 10.1007/s00404-009-1185-y.
 152. O'Donnell, A.J.M., K.G. Macleod, D.J. Burns, J.F. Smyth, and S.P. Langdon, *Estrogen receptor- α mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen*. *Endocr Relat Cancer*, 2005. **12**(4): 851-866 DOI: 10.1677/erc.1.01039.
 153. Li, Y., H. Ishiguro, T. Kawahara, Y. Miyamoto, K. Izumi, and H. Miyamoto, *GATA3 in the urinary bladder: suppression of neoplastic transformation and down-regulation by androgens*. *Am J Cancer Res*, 2014. **4**(5): 461-473.
 154. Ide, H. and H. Miyamoto, *Sex hormone receptor signaling in bladder cancer: a potential target for enhancing the efficacy of conventional non-surgical therapy*. *Cells*, 2021. **10**(5): 1169 DOI: 10.3390/cells10051169.
 155. Neumeister, V.M., C.A. Sullivan, R. Lindner, K. Lezon-Geyda, J. Li, J. Zavada, M. Martel, P.M. Glazer, D.P. Tuck, D.L. Rimm, and L. Harris, *Hypoxia-induced protein CAIX is associated with somatic loss of BRCA1 protein and pathway activity in triple negative breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2012. **136**(1): 67-75 DOI: 10.1007/s10549-012-2232-0.
 156. Ruiz, C., S. Seibt, K.A. Kuraya, A.K. Siraj, M. Mirlacher, P. Schraml, R. Maurer, H. Spichtin, J. Torhorst, S. Popovska, R. Simon, and G. Sauter, *Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer*. *Int J Cancer*, 2006. **118**(9): 2190-2194 DOI: 10.1002/ijc.21581.

Danksagung

Der erste Dank gebührt dem emeritierten Direktor des Pathologischen Instituts der LMU Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kirchner, unter dessen Leitung ich die Möglichkeit zur Promotion erhielt. Mein Dank gilt ebenso dem amtierenden Direktor Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. Frederick Klauschen, unter dessen Leitung ich meine Arbeit erfolgreich abschließen konnte.

Bei meiner Doktormutter und Mentorin Frau Prof. Dr. med. Doris Mayr möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken. Zunächst für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung des Projektes und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Darüber hinaus jedoch auch für die fachliche Begleitung und vor allem für die persönliche Unterstützung während der gesamten Promotionsphase, das entgegengebrachte Vertrauen, den Zuspruch und das Verständnis auch abseits der Dissertation, die stetige Erreichbarkeit sowie die Möglichkeit zur Publikation in einer Fachzeitschrift als Erstautorin.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei meiner zweiten Betreuerin Frau PD Dr. med. Elisa Schmoeckel sowie insbesondere bei unseren Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. Reinhard Zeidler (Helmholtz Zentrum München) und Herrn PD Dr. med. Bastian Czogalla (Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU), die mir beratend und motivierend zur Seite standen. Vielen Dank für die Bereitstellung des Ovarialkarzinomkollektivs und des Antikörpers sowie für die lehrreichen Gespräche.

Herrn Prof. Dr. med. David Horst (Institut für Pathologie der Charité) und Herrn PD Dr. med. Gerald Schulz (Urologische Klinik und Poliklinik der LMU) danke ich für die Bereitstellung des Harnblasenkarzinomkollektivs.

Frau Dr. rer. biol. hum. Dipl.-Geogr. Miriam Rottmann (Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der LMU) danke ich für die Beantwortung einzelner Fragen zur statistischen Auswertung.

Frau Andrea Sendelhofert und Frau Anja Heier danke ich für das vermittelte Wissen und die Arbeiten im immunhistochemischen Labor.

Gedankt sei auch den hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Pathologischen Instituts der LMU für die gute Zusammenarbeit während der gemeinsamen Zeit.

Den allergrößten Dank verdienen jedoch meine Eltern und mein Bruder Max, denen diese Arbeit in Liebe gewidmet ist. Von ganzem Herzen danke ich euch, dass ihr mir stets auf so vielfältige Weise den Rücken stärkt!!

Affidavit



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Hiepp, Lisa

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

***Immunhistochemische Expressionsanalyse des Enzyms Carboanhydrase XII
zur Evaluation dessen Potenzials als Biomarker und Zielantigen
in Ovarial- und Harnblasenkarzinomen***

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Wackersberg, 28.12.2024

Ort, Datum

Lisa Hiepp

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Lebenslauf und Publikationsliste

In der elektronischen Version wird der Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.

Publikationen

Paper

Teilaspekte dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

L. Hiepp, D. Mayr, K. Gärtner, E. Schmoeckel, F. Klauschen, A. Burges, S. Mahner, R. Zeidler and B. Czogalla (2022): *Carbonic anhydrase XII as biomarker and therapeutic target in ovarian carcinomas*. PLoS One 17(7): e0271630. DOI: 10.1371/journal.pone.0271630

Posterbeiträge

Teilergebnisse der Arbeit wurden im Rahmen der 105. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie sowie auf dem 96. Kongress der Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde präsentiert.

Folgende Abstracts wurden veröffentlicht:

L. Hiepp, D. Mayr, K. Gärtner, E. Schmoeckel, F. Klauschen, A. Burges, S. Mahner, R. Zeidler and B. Czogalla (2022): *Carbonic anhydrase XII as biomarker and therapeutic target in ovarian carcinomas*. Deutsche Gesellschaft für Pathologie e.V., Geschäftsstelle Berlin; Abstractband: 424-425 (P06.04). URL: https://www.pathologie-dgp.de/media/Dgp/Jahrestagung-2022/DGP2022_Abstractband_final_Web.pdf

DGP, Münster (9. - 11. Juni 2022)

L. Hiepp, D. Mayr, K. Gärtner, E. Schmoeckel, F. Klauschen, A. Burges, S. Mahner, R. Zeidler and B. Czogalla (2022): *Carboanhydrase XII als Biomarker und therapeutisches Zielantigen in Ovarialkarzinomen*. Geburtshilfe und Frauenheilkunde; 82(06):644-645 (P028). DOI: 10.1055/s-0042-1749055

BGGF, Würzburg (19. - 21. Mai 2022)