

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Pathologie

Direktor: Professor Dr. med. Guido Sauter

**Zusammenhang der NY-ESO-1 Expression zur TMPRSS2:ERG-  
Genfusion beim Prostatakrebs**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Zahnmedizin

(Dr. med. dent.)

der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Daniel Ospina-Klinck

geboren: Hamburg

2016

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:  
8.11.2016

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität  
Hamburg am:

Prüfungsausschuss, Vorsitzender: Prof. Dr. Guido Sauter

Prüfungsausschuss, 2.Gutachter: Prof. Dr. Stefan Kindler

## ***Inhaltsverzeichnis***

1	NY-ESO-1 expression is tightly linked to TMPRSS2-ERG fusion in prostate cancer (Publikation der Originalarbeit).....	4
2	Einleitung .....	15
3	Material und Methoden .....	16
3.1	Gewebeproben .....	16
3.2	Immunhistochemie.....	17
4	Resultate .....	17
4.1	Technische Aspekte.....	17
4.2	Die NY-ESO-1-Expression.....	17
5	Diskussion.....	18
6	Zusammenfassung.....	22
7	Abstract .....	23
8	Literaturverzeichnis .....	24
9	Erklärung des Eigenanteils an der Publikation.....	30
10	Danksagung .....	31
11	Eidesstattliche Erklärung .....	33

# NY-ESO-1 Expression is Tightly Linked to TMPRSS2–ERG Fusion in Prostate Cancer

Katharina Grupp,<sup>1,2\*</sup> Daniel Ospina-Klinck,<sup>2</sup> Maria Christina Tsourlakis,<sup>2</sup> Christina Koop,<sup>2</sup> Waldemar Wilczak,<sup>2</sup> Meike Adam,<sup>3,4</sup> Ronald Simon,<sup>2</sup> Guido Sauter,<sup>2</sup> Jakob Robert Izbicki,<sup>1</sup> Markus Graefen,<sup>3</sup> Hartwig Huland,<sup>3</sup> Stefan Steurer,<sup>2</sup> Thorsten Schlomm,<sup>3,4</sup> Sarah Minner,<sup>2</sup> and Alexander Quaas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>General, Visceral and Thoracic Surgery Department and Clinic, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

<sup>2</sup>Institute of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

<sup>3</sup>Martini-Clinic, Prostate Cancer Center, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

<sup>4</sup>Department of Urology, Section for Translational Prostate Cancer Research, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

**BACKGROUND.** NY-ESO-1 has been suggested as therapeutic cancer vaccine in prostate cancer. This study was undertaken to explore the relationship of NY-ESO-1 with tumor phenotype, biochemical recurrence, and molecular subgroups in hormone-naïve prostate cancers.

**METHODS.** NY-ESO-1 immunohistochemistry was analyzed on a tissue microarray containing 11,152 prostate cancer samples. Results were compared to clinically follow-up data, ERG status, and deletions on *PTEN*, 3p13, 5q21, and 6q15.

**RESULTS.** NY-ESO-1 expression was absent in benign prostate glands. In prostate cancer, NY-ESO-1 positivity was found 8.8% of our 8,761 interpretable tumors including 5.8% with weak, 2.5% with moderate, and 0.5% with strong expression. There was a threefold higher rate of NY-ESO-1 expression in *ERG* fusion positive tumors than in *ERG* negative cancers ( $P < 0.0001$ ). There was a significant association with early PSA recurrence, which was largely limited to *ERG* positive cancers. Within the *ERG* positive subgroup, high NY-ESO-1 expression was associated with early biochemical recurrence ( $P = 0.0002$ ) and high Gleason grade ( $P < 0.0001$ ). In *ERG* negative cancers, NY-ESO-1 expression was also linked to *PTEN* ( $P = 0.0012$ ) and 6q15 deletions ( $P = 0.0005$ ).

**CONCLUSIONS.** Our observations indicate a tight link of NY-ESO-1 expression to *ERG* activation and (to a lesser extent) *PTEN*- and 6q15-deletions in prostate cancer. The impact of these interactions on the likelihood of response to immunotherapy is unclear. The prognostic impact of NY-ESO-1 expression is little and not independent of histologic variables. *Prostate* 74:1012–1022, 2014. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

**KEY WORDS:** NY-ESO-1; prostate cancer; tissue microarray

## INTRODUCTION

Prostate cancer is the most common malignancy in men in Western societies [1]. Even though, the majority of prostate cancers have an indolent course, prostate cancer represents the second most frequent cause of cancer related death in men. Major challenges in the treatment of prostate cancers include decision making on whether or not aggressive therapy is needed at the time of initial cancer diagnosis. Moreover, in case of metastatic disease, better systemic treatment options

Conflict of interest: None.

Katharina Grupp and Daniel Ospina-Klinck contributed equally to this work.

\*Correspondence to: Katharina Grupp, General, Visceral and Thoracic Surgery Department and Clinic, Institute of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany. E-mail: k.grupp@uke.de

Received 15 January 2014; Accepted 2 April 2014

DOI 10.1002/pros.22816

Published online 1 May 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

are needed when anti-hormonal therapy is no longer effective. Despite recent advantages in research, the only established pre-treatment prognostic parameters currently include Gleason grade, tumor extent on biopsies, pre-operative PSA, and clinical parameters. As these data are statistically powerful but not sufficient for optimal individual treatment decisions, it can be hoped, that the analysis of molecular features may enable a better individual prediction of tumor aggressiveness in the future.

Vaccination of cancer patients with immunogenic components of their individual cancers represents a promising new strategy in cancer therapy. NY-ESO-1 is the most immunogenic cancer/testis antigen [2] and aberrantly expressed in various malignancies, including breast cancer [3], gastrointestinal stromal tumors [4], cutaneous melanoma [5], synovial sarcomas [6], esophageal [7], and epithelial ovarian cancer [8]. Cancers expressing NY-ESO-1 were described to spontaneously induce immunological reactions including NY-ESO-1 specific antibody expression and CD4 and CD8 mediated T cell responses [9–11]. Accordingly, NY-ESO-1 induced immunogenicity is currently exploited for experimental therapeutic vaccination approaches, a strategy which is now evaluated in several clinical trials [12–20].

For prostate, NY-ESO-1 expression was described to occur in about 10% of cancers [21,22] and autoantibodies recognizing NY-ESO-1 were detected in a subset of prostate cancer patients [22–24]. Phase I clinical trials utilizing NY-ESO-1 vaccination in hormone-refractory prostate cancer patients have shown an induction of NY-ESO-1 antibody, and CD4 and CD8 cell responses [25–27]. Similar observations are described in the phase I clinical study including metastatic and high risk stage D1 prostate cancer patients after vaccination with recombinant NY-ESO-1 protein mixed with CpG as adjuvant [2]. While these data seem to suggest a high potential for anti-NY-ESO-1 immunotherapy, little is known on the molecular epidemiology of NY-ESO-1 in prostate cancer. To learn more on the prevalence of NY-ESO-1 protein expression in untreated prostate cancer and its relationship with tumor phenotype, PSA recurrence and molecular subgroups in prostate cancer, an existing tissue microarray containing samples from more than 10,000 patients with clinical follow-up and an attached molecular database was utilized. Our data demonstrate that high NY-ESO-1 protein expression is a prognostic marker in ERG fusion positive prostate cancer.

**MATERIALS AND METHODS**

**Patients**

Radical prostatectomy specimens were available from 11,152 patients, undergoing surgery between

1992 and 2011 at the Department of Urology, and the Martini Clinics at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf. Follow-up data were available of 9,695 patients with a median follow-up of 36.8 months (range: 1–228 months; Table I). Prostate specific antigen values were measured following surgery and recurrence was defined as a post-operative PSA of 0.2 ng/ml and increasing at first of appearance. All prostate specimens were analyzed according to a standard procedure, including complete embedding of the entire prostate for histological analysis [28]. The TMA manufacturing process was described earlier in detail [29]. In short, one 0.6 mm core was taken from a representative tissue block from each patient. The tissues were distributed among 24 TMA blocks, each

**TABLE I. Composition of the Prognostic Tissue Microarray Containing 11,152 Prostate Cancer Specimens**

	No. of patients	
	Study cohort on tissue microarray (n = 11,152)	Biochemical relapse among categories (n = 1,824)
Follow-up (mo)		
Mean	53.4	—
Median	36.8	—
Age (y)		
<50	318	49
50–60	2,768	460
60–70	6,548	1,081
>70	1,439	232
Pretreatment PSA (ng/ml)		
<4	1,407	142
4–10	6,735	827
10–20	2,159	521
>20	720	309
pT category (AJCC 2002)		
pT2	7,370	570
pT3a	2,409	587
pT3b	1,262	618
pT4	63	49
Gleason grade		
≤3 + 3	2,859	193
3 + 4	1,565	573
4 + 3	6,183	849
≥4 + 4	482	208
pN category		
pN0	6,117	1,126
pN+	561	291
Surgical margin		
Negative	8,984	1,146
Positive	1,970	642

Numbers do not always add up to 11,152 in the different categories because of cases with missing data. Abbreviation: AJCC, American Joint Committee on Cancer.

containing 144–522 tumor samples. Presence or absence of cancer tissue was validated by immunohistochemical AMACR and 34BE12 analysis on adjacent TMA sections. For internal controls, each TMA block also contained various control tissues, including normal prostate tissue. The molecular database attached to this TMA contained results on ERG expression in 9,628, ERG break apart fluorescence in-situ hybridization (FISH) analysis in 6,106 (extended from [30]), and deletion status of 5q21 in 3,037 [31], 6q15 in 3,528 (extended from [32]), *PTEN* in 6,130 [33], and 3p13 in 1,290 (unpublished data) tumors.

### Immunohistochemistry

Freshly cut TMA sections were analyzed on 1 day and in one experiment. Primary antibody specific for NY-ESO-1 (mouse, Invitrogen; at 1/150 dilution) was applied, slides were deparaffinized and exposed to heat-induced antigen retrieval for 5 min in an autoclave at 121°C in pH 9 Tris–EDTA buffer. Bound antibody was then visualized using the EnVision Kit (Dako). NY-ESO-1 staining was evaluated according to the following scoring system: The staining intensity (0, 1+, 2+, and 3+) and the fraction of positive tumor cells were recorded for each tissue spot. A final score was built from these two parameters according to the following established score, as previously described [34,35]: Negative scores had absence of NY-ESO-1 staining, weak scores had staining intensity of 1+ in  $\leq 70\%$  of tumor cells or staining intensity of 2+ in  $\leq 30\%$  of tumor cells; moderate scores had staining intensity of 1+ in  $\geq 70\%$  of tumor cells, staining intensity of 2+ in  $> 30\%$  but in  $\leq 70\%$  of tumor cells or staining intensity of 3+ in  $\leq 30\%$  of tumor cells; strong

scores had staining intensity of 2+ in  $> 70\%$  of tumor cells or staining intensity of 3+ in  $> 30\%$  of tumor cells.

### Statistics

Statistical calculations were performed with JPM 9 software (SAS Institute, Inc., NC). Contingency tables and the  $\chi^2$ -test were performed to search for associations between molecular parameters and tumor phenotype. Survival curves were calculated according to Kaplan–Meier. The Log-Rank test was applied to detect significant survival differences between groups. COX proportional hazards regression analysis was performed to test the statistical independence and significance between pathological, molecular, and clinical variables.

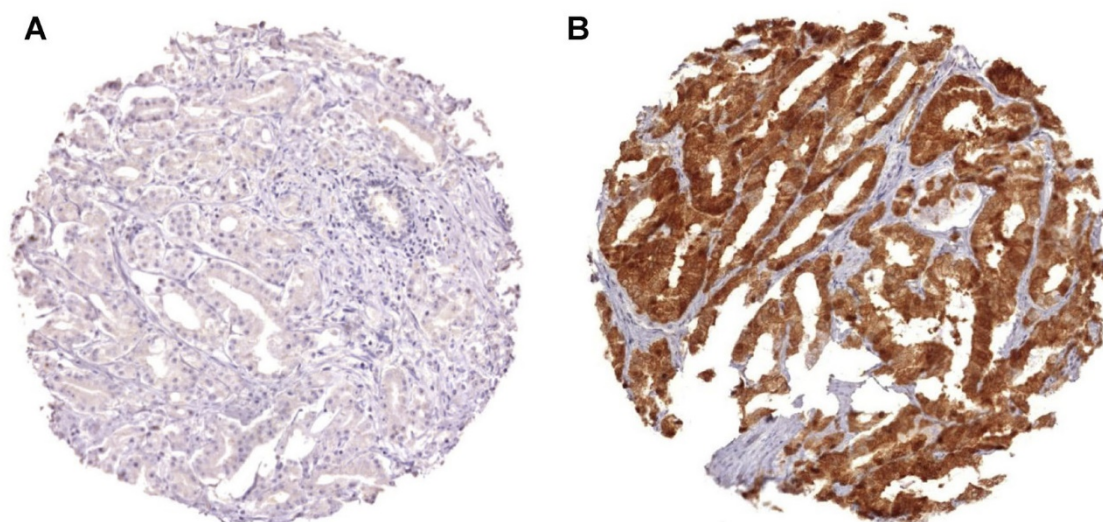
## RESULTS

### Technical Aspects

A total of 2,391 of 11,152 (21.4%) tissue cores in tissue microarray analysis for NY-ESO-1 were non-informative due to the complete lack of tissue or absence of unequivocal cancer cells.

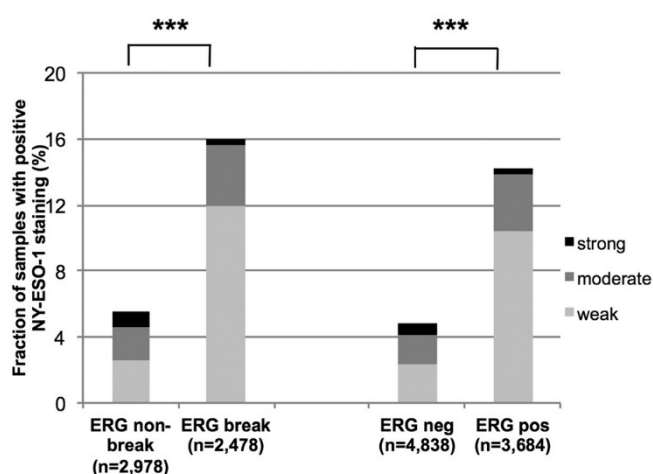
### NY-ESO-1 Expression

NY-ESO-1 expression was absent in benign prostate glands. In prostate cancer, NY-ESO-1 positivity was found 8.8% of our 8,761 interpretable tumors including 5.8% with weak, 2.5% with moderate, and 0.5% with strong expression. Representative images of NY-ESO-1 expression are given in Figure 1. High NY-ESO-1 expression was associated with high pre-operative PSA-levels ( $P = 0.0181$ ), advanced tumor stage, and high Gleason grade ( $P < 0.0001$  each).



**Fig. 1.** Representative elements of (A) absent and (B) strong NY-ESO-1 expression in prostate cancer.





**Fig. 2.** Relationship of NY-ESO-1 expression with ERG-fusion status probed by FISH and IHC (\*\**P* < 0.0001).

database including data on *TMPRSS2-ERG* fusion status obtained by FISH in 5,456 patients and by IHC in 8,522 tumors for which NY-ESO-1 expression was also available. NY-ESO-1 immunostaining was tightly linked to presence of *TMPRSS2-ERG* rearrangement and ERG protein expression (*P* < 0.0001 each, Fig. 2). Accordingly, associations with tumor phenotype and clinical cancer features were analyzed separately for ERG positive and negative subgroups (Table II). In 4,838 ERG negative cancers, high NY-ESO-1 expression was significantly associated with high pre-operative PSA-level (*P* = 0.0035), advanced tumor stage (*P* < 0.0001), high Gleason grade (*P* < 0.0001), and positive lymph nodal status (*P* = 0.0098). High NY-ESO-1 staining was only significantly associated with advanced Gleason grade (*P* < 0.0001) in 3,684 ERG positive prostate cancers.

**Relationship With *TMPRSS2-ERG* Rearrangement and ERG Protein Expression**

To evaluate whether NY-ESO-1 expression is associated with *ERG* status, we used our pre-existing

**Association With Key Genomic Deletions in ERG Positive and ERG Negative Prostate Cancers**

Earlier studies had provided evidence for distinct molecular subgroups of prostate cancers defined by

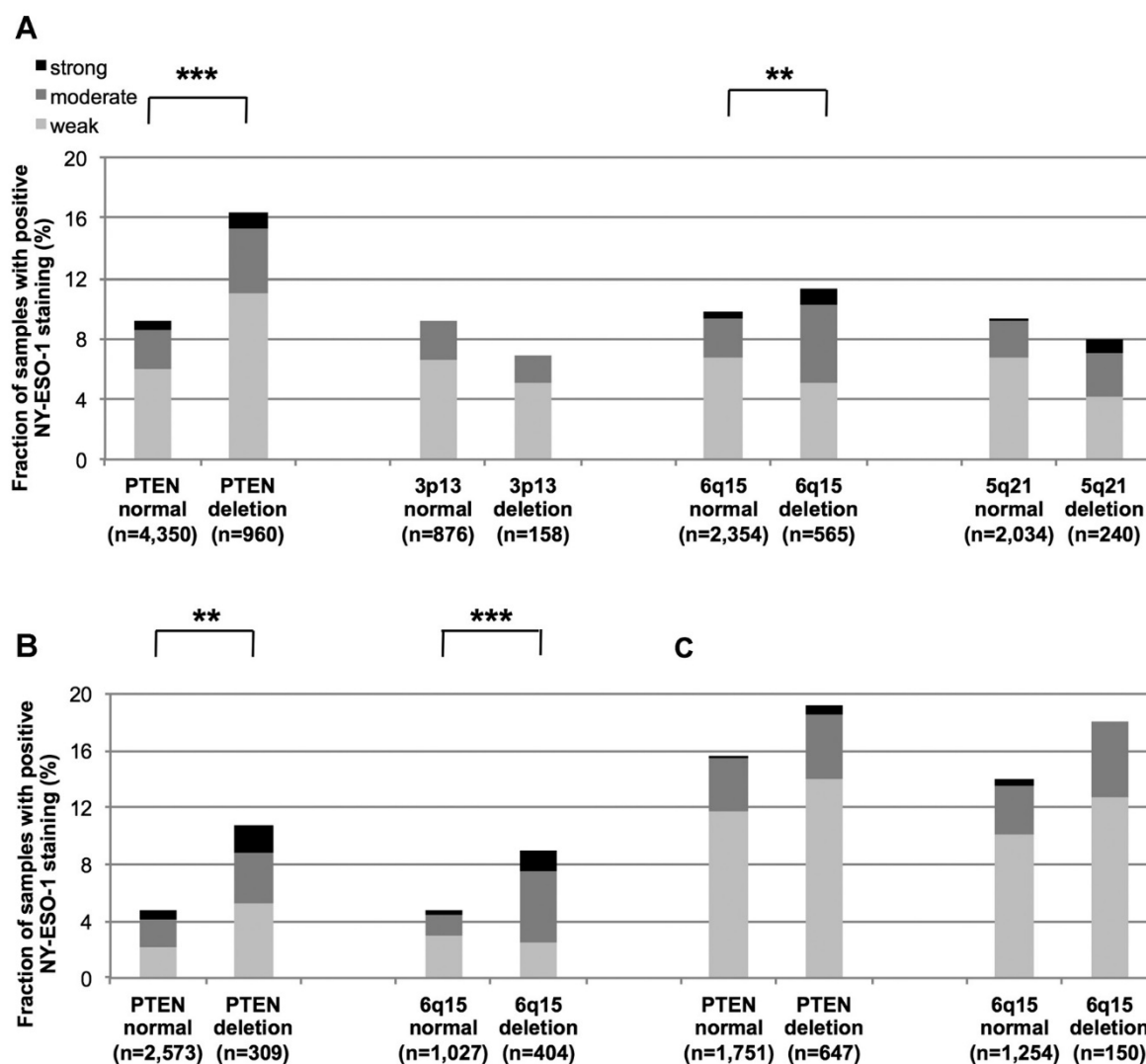
**TABLE II. Associations Between NY-ESO-1 Expression Results and ERG Positive and ERG Negative Prostate Cancer Phenotype**

Parameter	NY-ESO-1 IHC result											
	n	In ERG positive prostate cancers				P-value	n	In ERG negative prostate cancers				P-value
		Evaluable	Negative (%)	Weak (%)	Moderate (%)			Strong (%)	Evaluable	Negative (%)	Weak (%)	
All cancers	3,684	85.86	10.37	3.5	0.27	4,838	95.16	2.32	1.86	0.66		
PSA pre-operative												
<4	509	84.28	11.98	3.73	0	0.174	503	95.03	2.58	1.39	0.99	0.0035
4-10	2,274	86.72	9.59	3.47	0.22		2,875	95.65	2.33	1.53	0.49	
10-20	631	84.63	10.94	3.8	0.63		1,050	95.62	1.43	2.29	0.67	
>20	221	83.26	14.03	2.26	0.45		365	90.41	4.11	3.84	1.64	
Tumor stage												
pT2	2,217	86.47	10.55	2.75	0.23	0.0636	3,277	96.03	1.95	1.68	0.34	<0.0001
pT3a	979	84.58	9.81	5.31	0.31		976	94.77	2.05	2.05	1.13	
pT3b	449	85.08	11.14	3.34	0.45		542	90.59	4.98	2.58	1.85	
pT4	22	95.45	4.55	0	0		26	96.15	3.85	0	0	
Gleason grade												
≤3+3	839	90.23	7.99	1.67	0.12	<0.0001	1,101	96.91	2.36	0.73	0	<0.0001
3+4	2,192	85.49	10.86	3.38	0.27		2,715	96.21	1.62	1.66	0.52	
4+3	513	81.09	12.48	6.04	0.39		745	90.87	4.3	3.36	1.48	
≥4+4	118	83.05	8.47	7.63	0.85		255	89.41	3.92	4.31	2.35	
Lymph node metastasis												
N0	2,040	84.36	10.98	4.22	0.44	0.585	2,767	94.15	2.53	2.53	0.8	0.0098
N+	215	85.58	10.23	4.19	0		245	90.61	4.08	2.04	3.27	
Surgical margin												
Negative	2,897	85.95	10.32	3.38	0.35	0.2134	3,892	95.43	2.18	1.75	0.64	0.2453
Positive	724	86.05	10.5	3.45	0		861	93.73	3.02	2.44	0.81	

*TMPRSS2-ERG* fusions and several genomic deletions. Others and us had described a strong link of *PTEN* and 3p13 deletions to ERG positivity and of 5q21 and 6q15 deletions to ERG negativity [31–33,36–38]. To study, whether NY-ESO-1 expression might be particularly linked to one of these genomic deletions, NY-ESO-1 data were compared with pre-existing findings on deletions at *PTEN*, 3p13, 6q15, and 5q21. In the analysis of all tumors, deletions at *PTEN* and 6q15, but not deletions at 3p13 and 5q21 were significantly linked to high NY-ESO-1 expression (*PTEN*:  $P < 0.0001$  and 6q15:  $P = 0.0036$ , Fig. 3A). A subsequent subgroup analysis of ERG positive and negative cancers revealed, that these associations retained statistical significance in ERG negative cancers only (*PTEN*:  $P = 0.0012$  and 6q15:  $P = 0.0005$ , Fig. 3B,C).

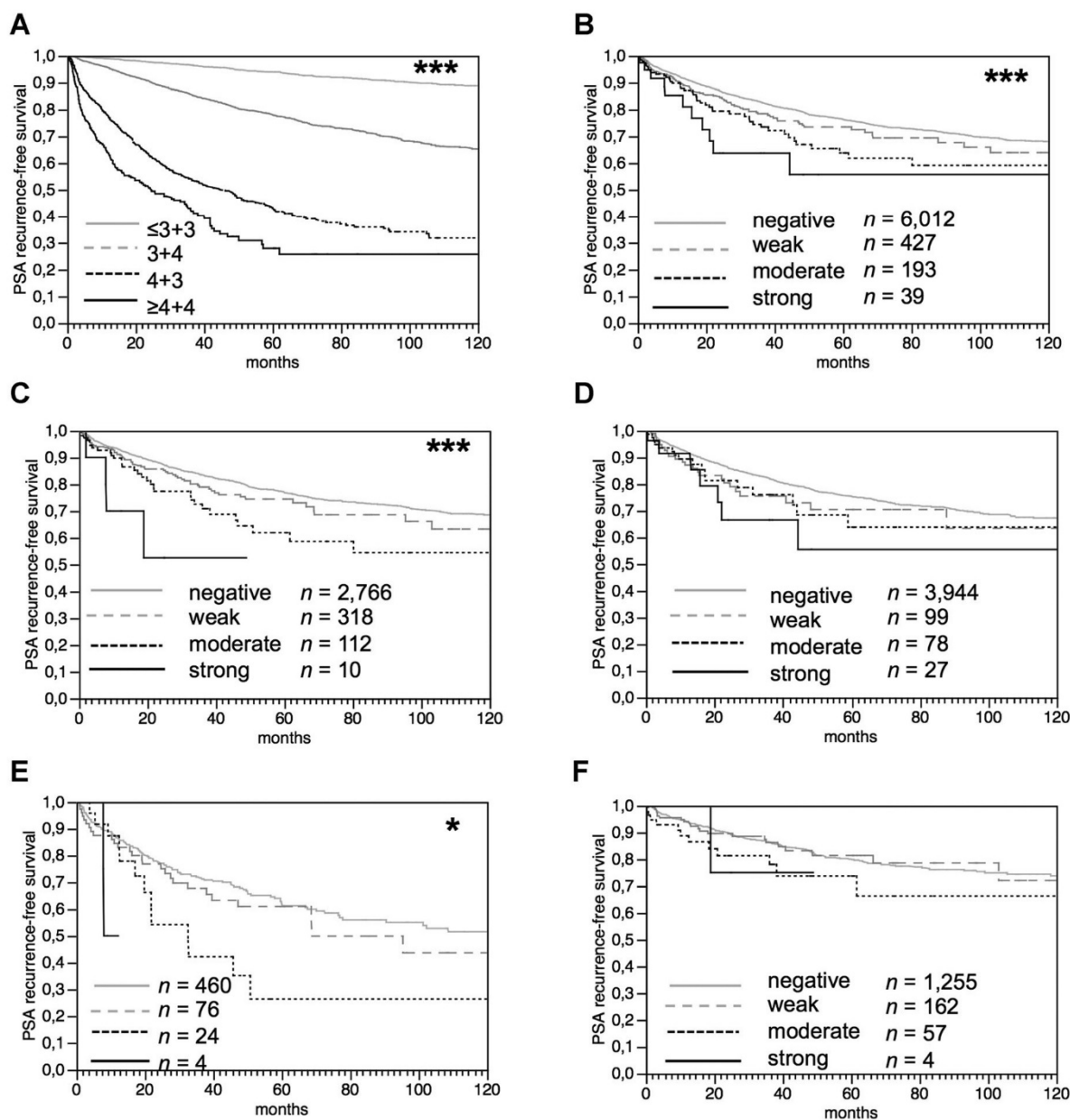
### Clinical Impact of NY-ESO-1

Follow-up data were available for 7,571 patients with informative NY-ESO-1 data. High-level NY-ESO-1 expression was linked to early PSA recurrence in the analysis of all cancers ( $P = 0.0004$ , Fig. 4B). This association hold true in the subset of 3,206 ERG positive prostate cancers ( $P = 0.0002$ , Fig. 4C), while no significant difference was seen with respect to PSA recurrence in 4,148 ERG negative tumors ( $P = 0.0912$ , Fig. 4D). A further subsequent analysis including the *PTEN* deletion status in ERG positive prostate cancers revealed that NY-ESO-1 expression was still prognostic relevant in the subgroup of 564 ERG positive/*PTEN*-deleted cancers ( $P = 0.0149$ , Fig. 4E), while NY-ESO-1 expression was unrelated to PSA recurrence in 1,478 ERG positive/*PTEN* non-deleted cancers ( $P = 0.3343$ , Fig. 4F).



**Fig. 3.** NY-ESO-1 expression versus deletions of *PTEN* ( $***P < 0.0001$ ), 3p13 ( $P = 0.6565$ ), 6q15 ( $**P = 0.0036$ ), and 5q21 ( $P = 0.1292$ ) in all prostate cancers (**A**). Relationship of NY-ESO-1 expression with *PTEN* and 6q15 deletions in (**B**) ERG negative ( $**P = 0.0012$  and  $***P = 0.0005$ ) and (**C**) ERG positive ( $P = 0.1455$  and  $P = 0.3111$ ) prostate cancers.





**Fig. 4.** Relationship of Gleason grade with biochemical recurrence (\*\* $P < 0.0001$ ) (**A**). Association of NY-ESO-1 expression with biochemical recurrence in (**B**) all cancers ( $n = 7,571$ ; \*\* $P = 0.0004$ ), (**C**) ERG positive cancers ( $n = 3,206$ ; \*\* $P = 0.0002$ ), (**D**) ERG negative cancers ( $n = 4,148$ ;  $P = 0.0912$ ), (**E**) *PTEN*-deleted ERG positive cancers ( $n = 564$ ; \* $P = 0.0149$ ), and (**F**) *PTEN* non-deleted ERG positive cancers ( $n = 1,478$ ;  $P = 0.3343$ ).

### Multivariate Analysis

Four multivariate analyses were performed evaluating the clinical relevance of NY-ESO-1 expression in different scenarios (Table III). Scenario 1 was utilizing all post-operatively available parameters including pT, pN, margin status, pre-operative PSA value, and Gleason grade obtained on the resected prostate. Scenario 2 was utilizing all post-operatively available parameters with the exception of nodal status. The

rational for this approach was that lymphadenectomy is not a routine procedure in the surgical therapy of prostate cancer and that excluding pN in multivariate analysis increases case numbers. The next two scenarios tried to better model the pre-operative situation. Scenario 3 included the NY-ESO-1 expression, pre-operative PSA, clinical stage (cT), and the Gleason grade obtained on the prostatectomy specimen. However, the pre-operative determination of a tumors Gleason grade is subject to sampling errors and

**TABLE III. Multivariate Analysis Including NY-ESO-1 Expression Status in (A) All Cancers, (B) ERG Positive, and (C) ERG Negative Prostate Cancers**

Scenario (n)	P-value							
	Pre-operative PSA-level	pT stage	cT stage	Gleason grade prostatectomy	Biopsy Gleason grade	N status	R status	NY-ESO-1
<b>A</b>								
1 (n = 4,512)	<0.0001	<0.0001	—	<0.0001	—	<0.0001	<0.0001	0.5735
2 (n = 7,405)	<0.0001	<0.0001	—	<0.0001	—	—	<0.0001	0.611
3 (n = 7,268)	<0.0001	—	<0.0001	<0.0001	—	—	—	0.2533
4 (n = 7,153)	<0.0001	—	<0.0001	—	<0.0001	—	—	0.1712
<b>B</b>								
1 (n = 1,897)	0.0345	<0.0001	—	<0.0001	—	0.0344	0.0007	0.0804
2 (n = 3,135)	0.0008	<0.0001	—	<0.0001	—	—	<0.0001	0.0569
3 (n = 3,050)	<0.0001	—	<0.0001	<0.0001	—	—	—	0.0616
4 (n = 2,996)	<0.0001	—	<0.0001	—	<0.0001	—	—	0.0465
<b>C</b>								
1 (n = 2,500)	<0.0001	<0.0001	—	<0.0001	—	<0.0001	0.0116	0.6867
2 (n = 4,056)	<0.0001	<0.0001	—	<0.0001	—	—	0.0002	0.9192
3 (n = 4,012)	<0.0001	—	<0.0001	<0.0001	—	—	—	0.8676
4 (n = 3,956)	<0.0001	—	<0.0001	—	<0.0001	—	—	0.7015

therefore results in under grading in more than one third of cases [39]. Because the post-operative Gleason grade thus varies from the pre-operative Gleason grade, another multivariate analysis was added as scenario 4. In this scenario, the pre-operative Gleason grade obtained on the original biopsy was combined with pre-operative PSA, clinical stage, and NY-ESO-1 expression. The scenarios including pre-operative parameters suggest a tendency towards NY-ESO-1 representing an independent predictor of prognosis in ERG positive prostate (Table III).

## DISCUSSION

The results of this study demonstrate that NY-ESO-1 is tightly linked to the subset of ERG positive (and to a lesser extent) PTEN and 6q15 deleted prostate cancers.

At the selected experimental conditions, NY-ESO-1 staining was absent in benign prostate glands and present in 8.8% of interpretable prostate cancers with unfavorable tumor phenotype. These data are generally in accordance with previous IHC studies, reporting NY-ESO-1 expression in about 10% of analyzed prostate cancers [21,22]. In these studies, NY-ESO-1 was expressed in 3% of 66 localized, in 15% of 48 hormone refractory [22], and in 10% of 39 different morphologically confirmed prostate cancers [21] suggesting NY-ESO-1 expression to represent a rather late event in prostate cancer progression [22]. The concordance of our prevalence data with earlier studies indirectly also

validates our TMA approach for the purpose of this study. Data from previous studies have demonstrated that our TMA containing more than 10,000 prostate cancer specimens generally represents a suitable system for assessing potential prognostic markers. Recently, we had successfully validated established prognostic biomarkers in prostate cancer such as nuclear p53 accumulation [40], CRISP3 expression [35] and deletions at 8p [41], *PTEN* [33] and 6q [32]. Data described on NY-ESO-1 mRNA expression in prostate cancer were generally somewhat higher than in IHC studies and ranged from 10% to 39% in prostate cancer [23,24,42,43]. The association found between NY-ESO-1 expression and unfavorable tumor phenotype was in accordance with one earlier study [22].

Utilizing the extensive molecular database attached to our prostate cancer cohort, we were also able to assess the relationship of NY-ESO-1 expression with important other molecular features of prostate cancer. About half of prostate cancers carry gene fusions linking the androgen-regulated gene *TMPRSS2* with transcription factors of the *ETS* family [44] resulting in androgen regulation and overexpression of ERG. Our data demonstrate that NY-ESO-1 expression occurred about three times more frequent in ERG positive than in ERG negative cancers. Since two independent approaches for ERG fusion detection (i.e., IHC and FISH) revealed this striking association, a false positive association due to inefficient immunostaining for both NY-ESO-1 and ERG in a subset of damaged non-reactive tissues can be largely excluded. Studies

comparing the expression profiles of ERG negative and ERG positive prostate cancers did not identify NY-ESO-1 as a direct ERG target gene [45–47], suggesting that the strong link between these genes might result from a particular selection advantage of cancer cells with simultaneous expression of NY-ESO-1 and ERG. The biological role of cancer testis antigens, including NY-ESO-1, in both germline and cancer tissues are poorly understood. It has been shown that the process of cancerous growth resembles germ cell development in several instances, including unlimited proliferation capacity, implantation, meiosis, and migration in germ cells that are reflected by invasion, development of aneuploidy, and metastasis in cancer cells [48]. That also ERG is normally involved in tissue development raises the possibility that co-expression of ERG and NY-ESO-1 activates cellular programs that cooperatively facilitate cancer development. Interactions of ERG and NY-ESO-1 dependent processes are also supported by several studies reporting epigenetic modification of genes and histones that are involved in regulation of both cancer testis antigen expression [48–51] and ERG activation [52,53] in prostate cancer.

Given the strong link of NY-ESO-1 expression with *TMPRSS2-ERG* fusions, we were further interested in the relationship of NY-ESO-1 expression with other key genomic alterations in prostate cancer. Earlier studies analyzing genomic alterations of prostate cancers had demonstrated, that deletions of 6q15 and 5q21 define subgroups of ERG negative cancers while deletions of *PTEN* and 3p13 characterize subgroups of ERG positive cancer [31–33,36–38]. Interestingly, our study identified an accumulation of NY-ESO-1 expression in *PTEN*- and 6q15-deleted ERG negative tumors. Although, no obvious functional link between *PTEN* inactivation and expression of NY-ESO-1 could be retrieved from the literature, it seems likely that activation of certain “germ cell features” (including for example invasive potential) by NY-ESO-1 further increased increases the malignant potential of *PTEN* defective cancer cells. A similar cooperative effect may also apply for 6q15 deletion; however, the target gene(s) of this deletion and the functional consequences are currently not fully established.

NY-ESO-1 was related to the clinical course in all cancers as well as in the subset of ERG positive prostate cancers in this study. This could be expected based on the association of NY-ESO-1 expression with advanced tumor stage found by us and others [22]. The limitation of this prognostic role to ERG positive cancers further emphasizes a biologically relevant—either direct or indirect—interplay between ERG activation and NY-ESO-1 expression. However, multivariate analysis using multiple different models to work around the issue of analyzing biomarkers needed for

pre-therapeutic decision-making on post-therapeutic cancer specimens did not suggest relevant clinical importance of NY-ESO-1 expression as a prognostic feature.

It is obvious, that the clinical relevance of NY-ESO-1 expression lies in its possible role as an immunogenic therapeutic target. Recently, clinical vaccine trials have already utilized NY-ESO-1 as a therapeutic target in prostate cancer patients [2,25–27]. The vaccination with cholesterol-bearing hydrophobized pullulan (CHP-NY-ESO-1) resulted in induction or increase of NY-ESO-1 antibody [26,27] and CD4+ and/or CD8+ T cell responses [25]. Moreover, vaccine approaches with recombinant NY-ESO-1 protein and CpG as adjuvant also induced NY-ESO-1 antibody and/or CD4+ and/or CD8+ T-cell responses [2]. Our data suggest that the potential utility of NY-ESO-1 as therapeutic target in prostate cancers may be especially relevant in the subset in ERG positive tumors. This is primarily because NY-ESO-1 expression is more frequent in these tumors. However, the different impact of NY-ESO-1 expression on prognosis in ERG positive and negative cancers would also be consistent with a significant interaction between these molecular features. This also bears a potential for ERG positive and ERG negative cancers reacting differently towards anti-NY-ESO-1 immunotherapy.

## CONCLUSIONS

The results of this study show that NY-ESO-1 is strongly linked to molecular subgroups of prostate cancer, such as *TMPRSS2-ERG* fusions and *PTEN* deletions. As these alterations substantially alter various cell functions, it is possible that they may affect cells reactivity towards NY-ESO-1 immunotherapy. The associations of NY-ESO-1 expression with tumor phenotype and biochemical recurrence are only marginal.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Julia Schumann, S nje Seekamp, and Inge Brandt for excellent technical assistance.

## REFERENCES

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61(2):69–90.
2. Karbach J, Neumann A, Atmaca A, Wahle C, Brand K, von Boehmer L, Knuth A, Bender A, Ritter G, Old LJ, Jager E. Efficient in vivo priming by vaccination with recombinant NY-ESO-1 protein and CpG in antigen naive prostate cancer patients. *Clin Cancer Res* 2011;17(4):861–870.
3. Ademuyiwa FO, Bshara W, Attwood K, Morrison C, Edge SB, Ambrosone CB, O'Connor TL, Levine EG, Miliotto A, Ritter E,

- Ritter G, Gnjatic S, Odunsi K. NY-ESO-1 cancer testis antigen demonstrates high immunogenicity in triple negative breast cancer. *PLoS One* 2012;7(6):e38783.
4. Perez D, Hauswirth F, Jager D, Metzger U, Samartzis EP, Went P, Jungbluth A. Protein expression of cancer testis antigens predicts tumor recurrence and treatment response to imatinib in gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer* 2011;128(12):2947–2952.
  5. Svobodova S, Browning J, MacGregor D, Pollara G, Scolyer RA, Murali R, Thompson JF, Deb S, Azad A, Davis ID, Cebon JS. Cancer-testis antigen expression in primary cutaneous melanoma has independent prognostic value comparable to that of Breslow thickness, ulceration and mitotic rate. *Eur J Cancer* 2011;47(3):460–469.
  6. Jungbluth AA, Antonescu CR, Busam KJ, Iversen K, Kolb D, Coplan K, Chen YT, Stockert E, Ladanyi M, Old LJ. Monophasic and biphasic synovial sarcomas abundantly express cancer/testis antigen NY-ESO-1 but not MAGE-A1 or CT7. *Int J Cancer* 2001;94(2):252–256.
  7. Akcakanat A, Kanda T, Koyama Y, Watanabe M, Kimura E, Yoshida Y, Komukai S, Nakagawa S, Odani S, Fujii H, Hatakeyama K. NY-ESO-1 expression and its serum immunoreactivity in esophageal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;54(1):95–100.
  8. Odunsi K, Jungbluth AA, Stockert E, Qian F, Gnjatic S, Tammela J, Intengan M, Beck A, Keitz B, Santiago D, Williamson B, Scanlan MJ, Ritter G, Chen YT, Driscoll D, Sood A, Lele S, Old LJ. NY-ESO-1 and LAGE-1 cancer-testis antigens are potential targets for immunotherapy in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2003;63(18):6076–6083.
  9. Stockert E, Jager E, Chen YT, Scanlan MJ, Gout I, Karbach J, Arand M, Knuth A, Old LJ. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J Exp Med* 1998;187(8):1349–1354.
  10. Sugita Y, Wada H, Fujita S, Nakata T, Sato S, Noguchi Y, Jungbluth AA, Yamaguchi M, Chen YT, Stockert E, Gnjatic S, Williamson B, Scanlan MJ, Ono T, Sakita I, Yasui M, Miyoshi Y, Tamaki Y, Matsuura N, Noguchi S, Old LJ, Nakayama E, Monden M. NY-ESO-1 expression and immunogenicity in malignant and benign breast tumors. *Cancer Res* 2004;64(6):2199–2204.
  11. Fujita S, Wada H, Jungbluth AA, Sato S, Nakata T, Noguchi Y, Doki Y, Yasui M, Sugita Y, Yasuda T, Yano M, Ono T, Chen YT, Higashiyama M, Gnjatic S, Old LJ, Nakayama E, Monden M. NY-ESO-1 expression and immunogenicity in esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(19):6551–6558.
  12. Jager E, Gnjatic S, Nagata Y, Stockert E, Jager D, Karbach J, Neumann A, Rieckenberg J, Chen YT, Ritter G, Hoffman E, Arand M, Old LJ, Knuth A. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(22):12198–12203.
  13. Gnjatic S, Jager E, Chen W, Altorki NK, Matsuo M, Lee SY, Chen Q, Nagata Y, Atanackovic D, Chen YT, Ritter G, Cebon J, Knuth A, Old LJ. CD8(+) T cell responses against a dominant cryptic HLA-A2 epitope after NY-ESO-1 peptide immunization of cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(18):11813–11818.
  14. Valmori D, Dutoit V, Ayyoub M, Rimoldi D, Guillaume P, Lienard D, Lejeune F, Cerottini JC, Romero P, Speiser DE. Simultaneous CD8+ T cell responses to multiple tumor antigen epitopes in a multi-peptide melanoma vaccine. *Cancer Immun* 2003;3:15.
  15. Shackleton M, Davis ID, Hopkins W, Jackson H, Dimopoulos N, Tai T, Chen Q, Parente P, Jefford M, Masterman KA, Caron D, Chen W, Maraskovsky E, Cebon J. The impact of imiquimod, a Toll-like receptor-7 ligand (TLR7L), on the immunogenicity of melanoma peptide vaccination with adjuvant Flt3 ligand. *Cancer Immun* 2004;4:9.
  16. Davis ID, Chen W, Jackson H, Parente P, Shackleton M, Hopkins W, Chen Q, Dimopoulos N, Luke T, Murphy R, Scott AM, Maraskovsky E, McArthur G, MacGregor D, Sturrock S, Tai TY, Green S, Cuthbertson A, Maher D, Miloradovic L, Mitchell SV, Ritter G, Jungbluth AA, Chen YT, Gnjatic S, Hoffman EW, Old LJ, Cebon JS. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(29):10697–10702.
  17. Valmori D, Souleimanian NE, Tosello V, Bhardwaj N, Adams S, O'Neill D, Pavlick A, Escalon JB, Cruz CM, Angiulli A, Angiulli F, Mears G, Vogel SM, Pan L, Jungbluth AA, Hoffmann EW, Venhaus R, Ritter G, Old LJ, Ayyoub M. Vaccination with NY-ESO-1 protein and CpG in Montanide induces integrated antibody/Th1 responses and CD8 T cells through cross-priming. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(21):8947–8952.
  18. Jager E, Karbach J, Gnjatic S, Neumann A, Bender A, Valmori D, Ayyoub M, Ritter E, Ritter G, Jager D, Panicali D, Hoffman E, Pan L, Oettgen H, Old LJ, Knuth A. Recombinant vaccinia/fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral and cellular NY-ESO-1-specific immune responses in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(39):14453–14458.
  19. Old LJ. Cancer vaccines 2003: Opening address. *Cancer Immun* 2003;3(Suppl 2):1.
  20. Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: Potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci* 2009;100(11):2014–2021.
  21. Jung V, Fischer E, Imig J, Kleber S, Nuber N, Reinshagen F, Kamradt J, Grobholz R, Knuth A, Renner C, Wadle A. Yeast-based identification of prostate tumor antigens provides an effective vaccine platform. *Anticancer Res* 2010;30(3):895–902.
  22. Fossa A, Berner A, Fossa SD, Hernes E, Gaudernack G, Smeland EB. NY-ESO-1 protein expression and humoral immune responses in prostate cancer. *Prostate* 2004;59(4):440–447.
  23. Nakada T, Noguchi Y, Satoh S, Ono T, Saika T, Kurashige T, Gnjatic S, Ritter G, Chen YT, Stockert E, Nasu Y, Tsushima T, Kumon H, Old LJ, Nakayama E. NY-ESO-1 mRNA expression and immunogenicity in advanced prostate cancer. *Cancer Immun* 2003;3:10.
  24. Gati A, Lajmi N, Derouiche A, Marrakchi R, Chebil M, Benammar-Elgaaied A. NY-ESO-1 expression and immunogenicity in prostate cancer patients. *Tunis Med* 2011;89(10):779–783.
  25. Uenaka A, Wada H, Isobe M, Saika T, Tsuji K, Sato E, Sato S, Noguchi Y, Kawabata R, Yasuda T, Doki Y, Kumon H, Iwatsuki K, Shiku H, Monden M, Jungbluth AA, Ritter G, Murphy R, Hoffman E, Old LJ, Nakayama E. T cell immunomonitoring and tumor responses in patients immunized with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan (CHP) and NY-ESO-1 protein. *Cancer Immun* 2007;7:9.
  26. Kawabata R, Wada H, Isobe M, Saika T, Sato S, Uenaka A, Miyata H, Yasuda T, Doki Y, Noguchi Y, Kumon H, Tsuji K, Iwatsuki K, Shiku H, Ritter G, Murphy R, Hoffman E, Old LJ, Monden M, Nakayama E. Antibody response against NY-ESO-1 in CHP-NY-ESO-1 vaccinated patients. *Int J Cancer* 2007;120(10):2178–2184.
  27. Kawada J, Wada H, Isobe M, Gnjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA, Okazaki N, Uenaka A, Nakamura Y, Fujiwara S, Mizuno N,



- Saika T, Ritter E, Yamasaki M, Miyata H, Ritter G, Murphy R, Venhaus R, Pan L, Old LJ, Doki Y, Nakayama E. Heteroclitic serological response in esophageal and prostate cancer patients after NY-ESO-1 protein vaccination. *Int J Cancer* 2012;130(3):584–592.
28. Erbersdobler A, Fritz H, Schnoger S, Graefen M, Hammerer P, Huland H, Henke RP. Tumour grade, proliferation, apoptosis, microvessel density, p53, and bcl-2 in prostate cancers: Differences between tumours located in the transition zone and in the peripheral zone. *Eur Urol* 2002;41(1):40–46.
  29. Mirlacher M, Simon R. Recipient block TMA technique. *Methods Mol Biol* 2010;664:37–44.
  30. Minner S, Enodien M, Sirma H, Luebbe AM, Krohn A, Mayer PS, Simon R, Tennstedt P, Muller J, Scholz L, Brase JC, Liu AY, Schluter H, Pantel K, Schumacher U, Bokemeyer C, Steuber T, Graefen M, Sauter G, Schlomm T. ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clin Cancer Res* 2011;17(18):5878–5888.
  31. Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, Masser S, Mader M, Kluth M, Bachmann F, Huland H, Steuber T, Graefen M, Schlomm T, Minner S, Sauter G, Sirma H, Simon R. CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer Res* 2013;73(9):2795–2805.
  32. Kluth M, Hesse J, Heidl A, Krohn A, Steurer S, Sirma H, Simon R, Mayer PS, Schumacher U, Grupp K, Izbicki JR, Pantel K, Dikomey E, Korbel JO, Plass C, Sauter G, Schlomm T, Minner S. Genomic deletion of MAP3K7 at 6q 12–22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2: ERG fusions. *Mod Pathol* 2013;26(7):975–983.
  33. Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, Mayer PS, De Silva C, Meyer-Komblum M, Kotschau D, Tennstedt P, Huang J, Gerhauser C, Mader M, Kurtz S, Sirma H, Saad F, Steuber T, Graefen M, Plass C, Sauter G, Simon R, Minner S, Schlomm T. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *Am J Pathol* 2012;181(2):401–412.
  34. Minner S, Wittmer C, Graefen M, Salomon G, Steuber T, Haese A, Huland H, Bokemeyer C, Yekebas E, Dierlamm J, Balabanov S, Kilic E, Wilczak W, Simon R, Sauter G, Schlomm T. High level PSMA expression is associated with early PSA recurrence in surgically treated prostate cancer. *The Prostate* 2011;71(3):281–288.
  35. Grupp K, Kohl S, Sirma H, Simon R, Steurer S, Becker A, Adam M, Izbicki J, Sauter G, Minner S, Schlomm T, Tsourlakis MC. Cysteine-rich secretory protein 3 overexpression is linked to a subset of PTEN-deleted ERG fusion-positive prostate cancers with early biochemical recurrence. *Mod Pathol* 2013;26(5):733–742.
  36. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E, Reva B, Antipin Y, Mitsiades N, Landers T, Dolgalev I, Major JE, Wilson M, Socci ND, Lash AE, Heguy A, Eastham JA, Scher HI, Reuter VE, Scardino PT, Sander C, Sawyers CL, Gerald WL. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 2010;18(1):11–22.
  37. Lapointe J, Li C, Giacomini CP, Salari K, Huang S, Wang P, Ferrari M, Hernandez-Boussard T, Brooks JD, Pollack JR. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res* 2007;67(18):8504–8510.
  38. Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, Drier Y, Cibulskis K, Sivachenko AY, Sboner A, Esgueva R, Pflueger D, Sougnez C, Onofrio R, Carter SL, Park K, Habegger L, Ambrogio L, Fennell T, Parkin M, Saksena G, Voet D, Ramos AH, Pugh TJ, Wilkinson J, Fisher S, Winckler W, Mahan S, Ardlie K, Baldwin J, Simons JW, Kitabayashi N, Macdonald TY, Kantoff PW, Chin L, Gabriel SB, Gerstein MB, Golub TR, Meyerson M, Tewari A, Lander ES, Getz G, Rubin MA, Garraway LA. The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature* 2010;470(7333):214–220.
  39. Epstein JI, Feng Z, Trock BJ, Pierorazio PM. Upgrading and downgrading of prostate cancer from biopsy to radical prostatectomy: Incidence and predictive factors using the modified Gleason grading system and factoring in tertiary grades. *Eur Urol* 2012;61(5):1019–1024.
  40. Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, Jessen B, Kollermann J, Minner S, Passow-Drolet A, Mirlacher M, Milde-Langosch K, Graefen M, Haese A, Steuber T, Simon R, Huland H, Sauter G, Erbersdobler A. Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod Pathol* 2008;21(11):1371–1378.
  41. El Gammal AT, Bruchmann M, Zustin J, Isbarn H, Hellwinkel OJ, Kollermann J, Sauter G, Simon R, Wilczak W, Schwarz J, Bokemeyer C, Brummendorf TH, Izbicki JR, Yekebas E, Fisch M, Huland H, Graefen M, Schlomm T. Chromosome 8p deletions and 8q gains are associated with tumor progression and poor prognosis in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16(1):56–64.
  42. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(5):1914–1918.
  43. Priklér L, Scandella E, Men Y, Engeler DS, Diener PA, Gillessen S, Ludewig B, Schmid HP. Adaptive immunotherapy of the advanced prostate cancer—Cancer testis antigen (CTA) as possible target antigens. *Aktuelle Urol* 2004;35(4):326–330.
  44. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005;310(5748):644–648.
  45. Gupta S, Iljin K, Sara H, Mpindi JP, Mirtti T, Vainio P, Rantala J, Alanen K, Nees M, Kallioniemi O. FZD4 as a mediator of ERG oncogene-induced WNT signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2010;70(17):6735–6745.
  46. Brase JC, Johannes M, Mannsperger H, Falth M, Metzger J, Kacprzyk LA, Andrasiuk T, Gade S, Meister M, Sirma H, Sauter G, Simon R, Schlomm T, Beissbarth T, Korf U, Kuner R, Sultmann H. TMPRSS2–ERG-specific transcriptional modulation is associated with prostate cancer biomarkers and TGF-beta signaling. *BMC Cancer* 2011;11:507.
  47. Jhavar S, Brewer D, Edwards S, Kote-Jarai Z, Attard G, Clark J, Flohr P, Christmas T, Thompson A, Parker M, Shepherd C, Stenman UH, Marchbank T, Playford RJ, Woodhouse C, Ogden C, Fisher C, Kovacs G, Corbishley C, Jameson C, Norman A, DeBono J, Bjartell A, Eeles R, Cooper CS. Integration of ERG gene mapping and gene-expression profiling identifies distinct categories of human prostate cancer. *BJU Int* 2009;103(9):1256–1269.
  48. Costa FF, Le Blanc K, Brodin B. Concise review: Cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. *Stem Cells* 2007;25(3):707–711.
  49. Cho HJ, Caballero OL, Gnjjatic S, Andrade VC, Colleoni GW, Vettore AL, Outtz HH, Fortunato S, Altorki N, Ferrera CA, Chua R, Jungbluth AA, Chen YT, Old LJ, Simpson AJ. Physical interaction of two cancer-testis antigens, MAGE-C1 (CT7) and NY-ESO-1 (CT6). *Cancer Immun* 2006;6:12.

50. Glazer CA, Smith IM, Ochs MF, Begum S, Westra W, Chang SS, Sun W, Bhan S, Khan Z, Ahrendt S, Califano JA. Integrative discovery of epigenetically derepressed cancer testis antigens in NSCLC. *PLoS ONE* 2009;4(12):e8189.
51. Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2005;5(8):615–625.
52. Kron K, Trudel D, Pethe V, Briollais L, Fleshner N, van der Kwast T, Bapat B. Altered DNA methylation landscapes of polycomb-repressed loci are associated with prostate cancer progression and ERG oncogene expression in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19(13):3450–3461.
53. Kacprzyk LA, Laible M, Andrasiuk T, Brase JC, Borno ST, Falth M, Kuner R, Lehrach H, Schweiger MR, Sultmann H. ERG induces epigenetic activation of Tudor domain-containing protein 1 (TDRD1) in ERG rearrangement-positive prostate cancer. *PLoS ONE* 2013;8(3):e59976.



## **2 Einleitung**

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung des Mannes in den Industrieländern. In den letzten 15-20 Jahren hat dieser in Deutschland den Lungenkrebs abgelöst und steht nun an erster Stelle mit ca. 65.000 Neuerkrankungen pro Jahr (RKI, Publication Krebsbericht in Deutschland 2009/2010). Schätzungsweise jeder neunte Mann erkrankt im Laufe seines Lebens an einem Prostatakarzinom. Eine in der Onkologie besondere Eigenschaft des Prostatakarzinoms ist die Existenz von Karzinomen die keinen Einfluss auf die Lebenserwartung des Trägers haben, sog. klinisch insignifikante Karzinome (Franks et al. 1954; Sakr et al. 1994). Diese insignifikanten Karzinome sind sehr häufig aufzutreffen und mit den heutigen Mitteln nicht 100% unterscheidbar zu den Karzinomen der Prostata, welche das Leben des Mannes gefährden. Trotz hoher Karzinomprävalenz liegt das Risiko, ein klinisch relevantes Prostatakarzinom zu entwickeln, bei lediglich 9%. Nur 3% der Patienten sterben ursachenspezifisch an ihrem Tumor. Dieses geringe Risiko gemessen an der Prävalenz bedeutet dennoch in Relation zur Population eine hohe karzinomspezifische Sterblichkeit. In Deutschland starben im Jahr 2011 mehr als 13.000 Männer an einem Prostatakarzinom. Es steht an 6. Stelle als Todesursache von Männern und ist hinter dem Bronchialkarzinom (ca. 29.000 Sterbefälle) die häufigste tumorassoziierte Todesursache (Statistisches Bundesamt 2012). Der höchste Risikofaktor für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms ist das Alter. So beträgt die Wahrscheinlichkeit 1:45 in der Altersgruppe 40–59 Jahre und 1:7 für Männer im Alter von 60–79 Jahren an Prostatakrebs zu erkranken (Siesling et al. 2003; Jemal et al. 2004).

Da die heute etablierten Prognosemarker wie das Gleason Grading oder das Tumorstadium nicht ausreichen, um die hoch aggressiven Tumoren zu unterscheiden, kommt es häufig zu einer invasiven Übertherapie der Patienten mit den damit einhergehenden Nebenwirkungen. Es ist daher zwingend notwendig, molekulare prognostisch-relevante Marker zu identifizieren, die eine Unterscheidung in indolente und aggressive Karzinome ermöglichen.

Das Tumor-Hoden Antigen NY-ESO-1 ist solch ein vielversprechender Marker. NY-ESO-1 ist ein CT-Protein (Cancer/Testis), welches in einer Vielzahl von Tumoren exprimiert und somit eine autologe, zelluläre Immunantwort hervorruft. Dieses

geschieht im normalen Hoden sowie in einem geringen Maß in der Plazenta, in den Eierstöcken und im Uterus.

Über die NY-ESO-1 Funktion ist noch nicht viel bekannt. Die NY-ESO-1 Expression ist in Melanom, Mamma-, Blasen-, Lungen-, Leber und Prostata Tumoren beschrieben worden (Chen et al., 1997). Bezüglich des Prostatakarzinomes wurde beschrieben, dass in ca. 10% der Fälle eine NY-ESO-1 Expression auftrat (Fossa et al., 2004; Jung et al., 2010). Desweiteren wurden auch Autoantikörper in einer Untergruppe von Prostatakrebspatienten festgestellt (Fossa et al., 2004; Gati et al., 2011; Nakada et al., 2003). In den klinischen Phase-1-Studien an Prostatakrebspatienten mit hormonrefraktären Karzinomen konnte gezeigt werden, dass durch eine NY-ESO-1 Impfung sich NY-ESO-1 Autoantikörper herbeiführen lassen. Dort wurden CD4- und CD8-Zellreaktionen hervorgerufen (Kawabata et al., 2007; Kawada et al., 2012; Uenaka et al., 2007).

Während diese Daten darauf hinzuweisen scheinen, dass die Anti-NY-ESO-1-Immuntherapie ein hohes Potenzial hat, ist noch wenig über die molekulare Epidemiologie von NY-ESO-1 beim Prostatakrebs bekannt. Um mehr über die Prävalenz der NY-ESO-1-Proteinexpression bei unbehandeltem Prostatakrebs sowie deren Zusammenhang mit dem Tumorphänotyp, PSA-Rezidiven und molekularen Untergruppen des Prostatakrebs zu erfahren, wurde ein bestehender Tissue-Micro array mit Proben von mehr als 10.000 Patienten mit klinischem Follow-up sowie einer dazugehörigen molekularen Datenbank herangezogen. Unsere Daten zeigen, dass die hohe NY-ESO-1-Proteinexpression ein prognostischer Marker bei ERG-Fusions-positiven Prostatakarzinomen ist.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Gewebeproben**

Für die Untersuchung von molekularen Markern ist es erforderlich, diese Veränderungen an tausenden Patientenproben zu untersuchen, wozu es standardisierter Analysemethoden und umfangreiche Biobanken bedarf. Hier hat sich die Tissue-microarray-Technik (TMA) als wertvolles Werkzeug durchgesetzt (Fleischmann et al. 2008; Köllermann et al. 2008; Schlomm et al. 2007b, 2008). Diese Technik erlaubt die simultane Analyse von mehreren tausend paraffin-fixierten

Tumorproben mittels Immunhistochemie oder FISH-Analyse in einem einzelnen Experiment. Der in dieser Arbeit verwendete TMA besteht aus 11.152 Prostatatumorgewebeproben von Patienten, an denen in der Zeit von 1992 bis 2011 eine Prostataektomie in der Urologie oder Martini-Klinik des UKE's durchgeführt wurde. Zur Herstellung des TMAs wurde pro Patient aus einem repräsentativen Tumorblock eine im Durchmesser 0,6 mm große Stanze entnommen. Weitere Information zum Patientenkollektiv sind in der beigefügten Publikation zu finden.

### **3.2 Immunhistochemie**

Die Immunhistochemie (IHC) ist ein Verfahren zur speziellen Markierung von Proteinen mittels spezifischer Antikörper. Mit Hilfe verschiedener Detektionssysteme können so Proteine zum Beispiel anhand einer stabilen Färbung lichtmikroskopisch semiquantifiziert werden.

Im Falle von NY-ESO-1 wurde ein primärer Antikörper von der Maus benutzt. Danach wurden die Objektträger entparaffinisiert, mit einem Tris-EDTA-Puffer behandelt und ca. 5min in einem Autoklaven wärmebehandelt. Die dadurch gebundenen Antikörper wurden dann entsprechend mit dem EnVision Kit (Dako) sichtbar gemacht. Für NY-ESO-1 haben wir folgendes Bewertungssystem verwendet: Die Färbungsintensität der gestanzten Gewebeproben (Spots) wurde in 0, 1+, 2+ und 3+ eingeteilt. Desweiteren wurden das entsprechende Areal für jeden einzelnen Gewebespot festgehalten. Aus diesen beiden Parametern wurde ein Vergleichswert (Score) sowie eine Abschlussbewertung erstellt (Minner et al.; 2011b, Grupp et al., 2013).

## **4 Resultate**

### **4.1 Technische Aspekte**

Es wurden insgesamt 11.152 Gewebesots im TMA Verfahren analysiert. Davon waren ca. 2.391 Spots für unsere Studie nicht aussagekräftig, da entweder kein Tumor enthalten oder das gestanzte Gewebe zu sehr beschädigt gewesen war.

### **4.2 Die NY-ESO-1-Expression**

In 8,8% von 8.761 der analysierbaren Gewebesots wurde eine nachweisbare NY-ESO-1 Expression beobachtet. Diese 8,8% setzen sich wie folgt zusammen: Ein

schwacher positiver Wert lag bei 5,8%, ein mittelstarker bei 2,5% und ein starker bei 0,5% vor. In den benignen Prostatadrüsen wurde keine NY-ESO-1 Expression beobachtet. Die Ergebnisse der Arbeit sind der beigefügten Publikation detailliert zusammengefasst. Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind:

1. Die NY-ESO-1 Expression ist deutlich mit der Gruppe der ERG-positiven Tumoren assoziiert.
2. Die NY-ESO-1 Expression ist assoziiert mit einem schlechten Tumorphänotyp, vor allem in der Untergruppe der ERG-negativen Tumoren.
3. Die NY-ESO-1 Expression ist assoziiert mit dem Auftreten eines PSA-Rezidivs in der Gruppe der ERG-positiven Tumoren.
4. Die NY-ESO-1 Expression ist assoziiert mit Deletionen von PTEN und 6q15 in der Gruppe der ERG-negativen Tumoren.
5. Die prognostische Relevanz der NY-ESO-1 Expression ist nicht unabhängig von den etablierten prä- und postoperativen Parametern beim Prostatakarzinom

## **5 Diskussion**

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die NY-ESO-1 Expression eng mit der Untergruppe ERG-positiver Tumoren und (in geringerem Maße) auch mit den Untergruppen der PTEN und 6q15 deletierten Tumoren beim Prostatakrebs zusammenhängt.

Unter den gewählten experimentellen Bedingungen konnten wir keine immunohistochemische NY-ESO-1 Färbung in benignen (gutartigen) Prostatadrüsen erkennen, jedoch aber in 8,8% der Prostatakarzinomfälle mit einem ungünstigen Tumorphänotyp. Unsere Daten stimmen im Allgemeinen mit vorherigen IHC-Studien überein, welche von einer NY-ESO-1 Expression in etwa 10% der analysierten Prostatakrebsfällen berichteten (Fossa et al., 2004; Jung et al., 2010). In diesen Studien wurde NY-ESO-1 in 3 % von 66 lokalisierten, in 15 % von 48 hormonrefraktären (Fossa et al., 2004) und in 10 % von 39 unterschiedlichen

morphologisch bestätigten Prostatakrebsfällen exprimiert (Jung et al., 2010). Das lässt darauf schließen, dass die NY-ESO-1 Expression ein eher spätes Ereignis in der Progression des Prostatakrebses ist (Fossa et al., 2004).

Die Daten, die zur NY-ESO-1-mRNA-Expression beim Prostatakrebs vorliegen, waren im Allgemeinen etwas höher als in den IHC-Studien und reichten von 10 % bis 39 % (Chen et al., 1997; Gati et al., 2011; Nakada et al., 2003; Prikler et al., 2004). Der in der vorliegenden Studie festgestellte Zusammenhang zwischen der NY-ESO-1-Expression und einem ungünstigen Tumorphänotyp stimmte mit einer früheren Studie überein (Fossa et al., 2004).

Über 10.000 publizierte Studien haben bisher vielversprechende molekulare Marker für das Prostatakarzinom besprochen, von denen sich jedoch bisher keiner in der klinischen Routine durchsetzen konnte. Erklärungen für dieses ernüchternde Ergebnis sind die zu geringen Stichprobengrößen und fehlende Follow-up der meisten molekularen Studien, nicht standardisierte Versuchsprotokolle und subjektive Auswertekriterien (Schlomm et al. 2007a). Die Ergebnisse vorheriger Studien am Institut für Pathologie haben gezeigt, dass die Verwendung unseres Prostata-Prognose-TMAs mit mehr als 10.000 Fällen ein adäquates Probenkollektiv zur Identifizierung und Validierung von potentiell prognostisch relevanten Markern darstellt. So konnten bereits eine Reihe von putativen molekularen Prognosemarkern validiert werden. Dazu zählen zum Beispiel, die nukleäre Akkumulation von p53 (Schlomm et al. 2008, Kluth et al. 2014), die Expression von CRISP3 (Grupp et al. 2013) und Deletionen von PTEN (Krohn et al. 2012), 6q (Kluth et al. 2013) und 5q (Burkhardt et al., 2013).

Durch die von uns aufgebaute, zum TMA zugehörige umfangreiche molekulare Datenbank konnten wir neben der prognostischen Relevanz außerdem die Beziehung zwischen der NY-ESO-1-Expression und wichtigen anderen molekularen Eigenschaften des Prostatakarzinoms untersuchen. Ungefähr die Hälfte aller Prostatakarzinome sind charakterisiert durch die Genfusion TMPRSS2:ERG. Durch diese Fusion gelangt der Transkriptionsfaktor ERG unter die Kontrolle des Promotors des androgenregulierten Genes TMPRSS2 und wird somit in den Prostatakrebszellen exprimiert (Tomlins et al., 2005). Unsere Daten haben gezeigt, dass die NY-ESO-1 Expression 3-mal häufiger in ERG-positiven als in ERG-negativen Krebsfällen vorkommt. Da zwei unabhängige Vorgehensweisen verwendet

wurden (IHC-und FISH-Analyse), kann ausgeschlossen werden, dass diese Assoziation durch eine ineffiziente immunohistochemische Färbung herbeigeführt wurde. Studien, welche die Expressionsprofile von ERG-negativen und ERG-positiven Prostatakrebsfällen analysierten und miteinander verglichen, sind zum Ergebniss gekommen, dass NY-ESO-1 kein direktes ERG-Zielgen ist. (Brase et al., 2011; Gupta et al., 2010; Jhavar et al., 2009), Das lässt vermuten, dass die gleichzeitige Expression von NY-ESO-1 und ERG in einem Selektionsvorteil für die betroffenen Krebszellen resultiert. Die biologische Rolle der Tumor-Hoden-Antigene wie NY-ESO-1 in Keim- und Krebsgewebe ist bisher nicht geklärt. Studien haben gezeigt, dass der Prozess des Krebswachstums dem der Keimzellenentwicklung in mehrerer Hinsicht ähnelt. Dieses beinhaltet unter anderem die unbegrenzte Proliferation, die Implantation, Meiose und Migration der Keimzellen. Diese spiegeln sich in Invasion, Entwicklung von Aneuploidie (numerische Abweichung des sonst festgelegten Chromosomensatzes) und Metastasierung der Krebszellen wieder (Simpson et al., 2005). Dass auch ERG normalerweise an der Gewebeentwicklung beteiligt ist, erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass eine Ko-Expression von ERG und NY-ESO-1 zelluläre Programme aktiviert, die kooperativ die Krebsentwicklung fördern. Interaktionen zwischen ERG- und NY-ESO-1-abhängigen Vorgängen werden außerdem durch mehrere Studien gestützt, die von epigenetischen Modifikationen von Genen und Histonen berichten, die an der Regulierung der Tumor-Hoden-Antigen-Expression (Cho et al., 2006; Costa et al., 2007; Glazer et al., 2009; Simpson et al., 2005) sowie an der ERG-Aktivierung (Kacprzyk et al., 2013; Kron et al., 2013) bei Prostatakrebs beteiligt sind.

Auf Grund der deutlichen Assoziation der NY-ESO-1-Expression mit der TMPRSS2:ERG-Fusion war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit zu prüfen, ob die NY-ESO-1-Expression mit weiteren wichtigen genomischen Veränderungen beim Prostatakrebs auftritt. Frühere Studien haben gezeigt, dass bestimmte Deletionen häufiger in ERG-negativen oder ERG-positiven Tumoren vorkommen. So kommen Deletionen im Bereich 6q15 und 5q21 vor allem in ERG-negativen Tumoren und die Deletionen von 3p13 und PTEN in den ERG-positiven Tumoren vor (Berger et al., 2010; Burkhardt et al., 2013; Kluth et al., 2013; Krohn et al., 2012; Lapointe et al., 2007; Taylor et al., 2010). Bemerkenswerterweise hat unsere Studie eine gehäufte NY-ESO-1-Expression bei ERG-negativen Tumoren mit *PTEN*- oder 6q15-Deletion identifiziert. Zwar konnte der Literatur kein offensichtlicher funktioneller



Zusammenhang zwischen PTEN-Inaktivierung und der Expression von NY-ESO-1 entnommen werden. Es erscheint aber wahrscheinlich, dass die Aktivierung bestimmter „Keimzelleigenschaften“ (einschließlich z.B. des invasiven Potenzials) durch NY-ESO-1 das maligne Potenzial von Krebszellen mit PTEN-Defekt weiter erhöht. Einen ähnlichen kooperativen Effekt könnte auch mit der 6q15-Deletion vorliegen, allerdings ist/sind das/die Zielgen(e) dieser Deletion sowie die funktionellen Konsequenzen derzeit noch nicht vollständig erforscht.

In dieser Studie konnten wir eine Verbindung zwischen einer erhöhten NY-ESO-1 Expression und einem ungünstigen klinischen Verlauf sowohl in allen Tumoren ermitteln als auch in der Untergruppe der ERG-positiven Tumoren finden. Basierend auf der Assoziation zwischen der NY-ESO-1-Expression und einem fortgeschrittenem Tumorstadium in der Studie unserer und anderer Arbeitsgruppen, war dieses zu erwarten (Fossa et al., 2004). Die Einschränkung der prognostischen Relevanz insbesondere auf ERG-positive Tumoren deutet noch stärker auf eine biologisch relevante direkte oder indirekte Interaktion zwischen der ERG-Aktivierung und der NY-ESO-1-Expression hin. Um die klinische Prognoserelevanz der NY-ESO-1-Expression zu klären, wurden verschiedene multivariate Analysen durchgeführt. Hier zeigte sich allerdings, dass NY-ESO-1 weder in der Kombination mit prätherapeutischen Parametern (z.B. Gleason Grad in der Biopsiestanze) noch in der Kombination mit posttherapeutischen Parametern (z.B. pathologisches Tumorstadium) einen relevanten Vorhersagewert hatte.

Offensichtlich besteht die klinische Relevanz der NY-ESO-1-Expression in ihrer möglichen Rolle als immunogenes therapeutisches Ziel. Kürzlich wurde in klinischen Impfstudien bereits NY-ESO-1 als therapeutisches Ziel bei Prostatakrebspatienten eingesetzt (Kawada et al., 2012; Karbach et al., 2011; Kawabata et al., 2007; Uenaka et al., 2007). Unsere Daten deuten darauf hin, dass die potenzielle Verwendbarkeit von NY-ESO-1 als therapeutisches Ziel bei Prostatakrebs in der Untergruppe ERG-positiver Tumoren besonders relevant sein könnte. Dies liegt vor allem daran, dass die NY-ESO-1-Expression bei solchen Tumoren häufiger ist. Allerdings würde die unterschiedliche Auswirkung der NY-ESO-1-Expression auf die Prognose bei ERG-positivem und -negativem Krebs auch zu einer signifikanten Interaktion zwischen diesen molekularen Eigenschaften passen. Dieses birgt das Potenzial, dass ERG-

positive und ERG-negative Krebsformen unterschiedlich auf eine Anti-NY-ESO-1-Immuntherapie reagieren.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass NY-ESO-1 eng mit molekularen Untergruppen des Prostatakrebses, wie der TMPRSS2:ERG-Fusion und PTEN-Deletionen zusammenhängt. Da die Veränderungen grundlegend die Zellfunktionen verändern, ist es möglich, dass diese die Zellreaktivität in Richtung NY-ESO-1-Immuntherapie beeinflussen. Der Zusammenhang zwischen der NY-ESO-1-Expression und dem Tumorphänotyp sowie dem biochemischen Rezidiv sind jedoch nur marginal.

## **6 Zusammenfassung**

NY-ESO-1 wurde als therapeutischer Impfstoff beim Prostatakrebs vorgeschlagen. Die vorliegende Studie sollte daher den Zusammenhang zwischen der NY-ESO-1-Expression und dem Tumorphänotyp, dem biochemischen Rezidiv und molekularer Untergruppen bei hormonnaiven Prostatakarzinomen klären. Dazu wurde ein Tissue-Microarray mit 11.152 Prostatakrebsproben analysiert. 8,8 % der 8.761 interpretierbaren Tumoren waren NY-ESO-1-positiv, darunter 5,8 % mit schwacher, 2,5 % mit mittelstarker und 0,5 % mit starker Expression. In den benignen Prostatadrüsen wurde keine NY-ESO-1 Expression beobachtet. Die NY-ESO-1-Expression war deutlich assoziiert mit der Untergruppe der ERG-Fusions-positiven Tumoren ( $p < 0,0001$ ). Vor allem in ERG-positiven Tumoren war die NY-ESO-1-Expression mit einem frühen biochemischen Rezidiv ( $p = 0,0002$ ) und einem hohen Gleason-Grad ( $p < 0,0001$ ) assoziiert. Dieser Zusammenhang war bei den ERG-negativen Tumoren deutlich geringer. In den ERG-negativen Tumoren gab es einen Zusammenhang zwischen der NY-ESO-1-Expression und Deletionen von *PTEN* ( $p = 0,0012$ ) sowie 6q15 ( $p = 0,0005$ ). Unsere Beobachtungen lassen folglich auf einen engen Zusammenhang zwischen der NY-ESO-1-Expression und einer ERG-Aktivierung und auch *PTEN*- und 6q15-Deletionen beim Prostatakarzinom schließen. Die Auswirkungen dieser Interaktionen auf die Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens auf eine mögliche Immuntherapie sollten auf jeden Fall geklärt werden. Die prognostische Auswirkung der NY-ESO-1-Expression auf die Prognose der Prostatakarzinom-Patienten hingegen ist eher gering und zusätzlich nicht unabhängig von den bereits etablierten klinisch-pathologischen Parametern.

## 7 Abstract

NY-ESO-1 has been suggested as therapeutic cancer vaccine in prostate cancer. To explore the relationship of NY-ESO-1 with tumor phenotype, biochemical recurrence and molecular subgroups in hormone-naïve prostate cancers, a tissue microarray containing 11,152 prostate cancer samples was analyzed. NY-ESO-1 expression was absent in benign prostate glands. In prostate cancer, NY-ESO-1 positivity was found 8.8% of our 8,761 interpretable tumors including 5.8% with weak, 2.5% with moderate, and 0.5% with strong expression. There was a threefold higher rate of NY-ESO-1 expression in *ERG* fusion positive tumors than in *ERG* negative cancers ( $p < 0.0001$ ). There was a significant association with early PSA recurrence, which was largely limited to *ERG* positive cancers. Within the *ERG* positive subgroup, high NY-ESO-1 expression was associated with early biochemical recurrence ( $p = 0.0002$ ) and high Gleason grade ( $p < 0.0001$ ). In *ERG* negative cancers, NY-ESO-1 expression was also linked to *PTEN* ( $p = 0.0012$ ) and 6q15 deletions ( $p = 0.0005$ ). In conclusion, our observations indicate a tight link of NY-ESO-1 expression to *ERG* activation and (to a lesser extent) *PTEN*- and 6q15-deletions in prostate cancer. The impact of these interactions on the likelihood of response to immunotherapy is unclear. The prognostic impact of NY-ESO-1 expression is little and not independent of histologic variables.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Berger, M.F., Lawrence, M.S., Demichelis, F., Drier, Y., Cibulskis, K., Sivachenko, A.Y., Sboner, A., Esgueva, R., Pflueger, D., Sougnez, C., Onofrio, R., Carter, S.L., Park, K., Habegger, L., Ambrogio, L., Fennell, T., Parkin, M., Saksena, G., Voet, D., Ramos, A.H., Pugh, T.J., Wilkinson, J., Fisher, S., Winckler, W., Mahan, S., Ardlie, K., Baldwin, J., Simons, J.W., Kitabayashi, N., Macdonald, T.Y., Kantoff, P.W., Chin, L., Gabriel, S.B., Gerstein, M.B., Golub, T.R., Meyerson, M., Tewari, A., Lander, E.S., Getz, G., Rubin, M.A., Garraway, L.A., 2010. The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature*. 470, 214-220.
2. Brase, J.C., Johannes, M., Mannsperger, H., Falth, M., Metzger, J., Kacprzyk, L.A., Andrasiuk, T., Gade, S., Meister, M., Sirma, H., Sauter, G., Simon, R., Schlomm, T., Beissbarth, T., Korf, U., Kuner, R., Sultmann, H., 2011. TMPRSS2-ERG -specific transcriptional modulation is associated with prostate cancer biomarkers and TGF-beta signaling. *BMC cancer*. 11, 507.
3. Burkhardt, L., Fuchs, S., Krohn, A., Masser, S., Mader, M., Kluth, M., Bachmann, F., Huland, H., Steuber, T., Graefen, M., Schlomm, T., Minner, S., Sauter, G., Sirma, H., Simon, R., 2013. CHD1 Is a 5q21 Tumor Suppressor Required for ERG Rearrangement in Prostate Cancer. *Cancer research*. 73, 2795-2805.
4. Burkhardt, L., Grupp, K., Habermann, M., Sirma, H., Simon, R., Steurer, S., Hube-Magg, C., Prien, K., Jedrzejewska, K., Salomon, G., Heinzer, H., Wilczak, H., Kluth, M., Izbicki, J. R., Sauter, G., Minner, S., Schlomm, T. and Tsourlakis, M. C. 2013. High nuclear karyopherin  $\alpha$  2 expression is a strong and independent predictor of biochemical recurrence in prostate cancer patients treated by radical prostatectomy.
5. Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., Old, L.J., 1997. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 1914-1918.
6. Cho, H.J., Caballero, O.L., Gnjatic, S., Andrade, V.C., Colleoni, G.W., Vettore, A.L., Outtz, H.H., Fortunato, S., Altorki, N., Ferrera, C.A., Chua, R., Jungbluth, A.A., Chen, Y.T., Old, L.J., Simpson, A.J., 2006. Physical interaction of two cancer-testis antigens, MAGE-C1 (CT7) and NY-ESO-1 (CT6). *Cancer immunity*. 6, 12.
7. Costa, F.F., Le Blanc, K., Brodin, B., 2007. Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. *Stem cells*. 25, 707-711.
8. Epstein, J.I., Feng, Z., Trock, B.J., Pierorazio, P.M., 2012. Upgrading and downgrading of prostate cancer from biopsy to radical prostatectomy: incidence and predictive factors using the modified Gleason grading system and factoring in tertiary grades. *European urology*. 61, 1019-1024.

9. Fleischmann A, Schlomm T, Huland H, Köllermann J, Simon P, Mirlacher M, Salomon G, Chun FH, Steuber T, Simon R, Sauter G, Graefen M, Erbersdobler A (2008) Distinct subcellular expression patterns of neutral endopeptidase (CD10) in prostate cancer predict diverging clinical courses in surgically treated patients. *Clin Cancer Res* 14: 7838–7842.
10. Fossa, A., Berner, A., Fossa, S.D., Hernes, E., Gaudernack, G., Smeland, E.B., 2004. NY-ESO-1 protein expression and humoral immune responses in prostate cancer. *Prostate*. 59, 440-447.
11. Franks LM Latent carcinoma of the prostate. *J Pathol Bacteriol* 68: 603 (1954).
12. Gati, A., Lajmi, N., Derouiche, A., Marrakchi, R., Chebil, M., Benammar-Elgaaied, A., 2011. NY-ESO-1 expression and immunogenicity in prostate cancer patients. *Tunis Med*. 89, 779-783.
13. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Krebs in Deutschland 2009/2010, Robert Koch Institut, Seite 16:  
[http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.rki.de%2FKrebs%2FDE%2FContent%2FPublikationen%2FKrebs\\_in\\_Deutschland%2Fkid\\_2013%2Fkrebs\\_in\\_deutschland\\_2013.pdf%3Bjsessionid%3D3BCF609F0A37EDB696377CC78BF4A5DB.2\\_cid363%3F\\_\\_blob%3DpublicationFile&date=2014-11-12](http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.rki.de%2FKrebs%2FDE%2FContent%2FPublikationen%2FKrebs_in_Deutschland%2Fkid_2013%2Fkrebs_in_deutschland_2013.pdf%3Bjsessionid%3D3BCF609F0A37EDB696377CC78BF4A5DB.2_cid363%3F__blob%3DpublicationFile&date=2014-11-12)
14. Glazer, C.A., Smith, I.M., Ochs, M.F., Begum, S., Westra, W., Chang, S.S., Sun, W., Bhan, S., Khan, Z., Ahrendt, S., Califano, J.A., 2009. Integrative discovery of epigenetically derepressed cancer testis antigens in NSCLC. *PLoS one*. 4, e8189.
15. Grupp, K., Kohl, S., Sirma, H., Simon, R., Steurer, S., Becker, A., Adam, M., Izbicki, J., Sauter, G., Minner, S., Schlomm, T., Tsourlakis, M.C., 2013. Cysteine-rich secretory protein 3 overexpression is linked to a subset of PTEN-deleted ERG fusion-positive prostate cancers with early biochemical recurrence. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 26, 733-742.
16. Grupp, K., Kohl, S., Sirma, H., Simon, R., Steurer, S., Becker, A., Adam, M., Izbicki, J., Sauter, G., Minner, S., Schlomm, T., Tsourlakis, M.C. 2013. Cysteine-rich secretory protein 3 overexpression is linked to a subset of PTEN-deleted ERG fusion-positive prostate cancers with early biochemical recurrence.
17. Grupp, K., Ospina-Klinck, D., Koop, C., Wilczak, W., Adam, M., Simon, R., Sauter, G., Izbicki, J., Graefen, M., Huland, H., Steurer, S., Schlomm, T., Minner, S., Quaas, A., 2013. NY-ESO-1 expression is tightly linked to TMPRSS2-ERG fusion in prostate cancer. *PubMed.*, 5-6.
18. Grupp, K., Roettger, L., Kluth, M., Hube-Magg, C., Simon, R., Lebok, P., Minner, S., Tsourlakis M.C., Koop, C., Graefen, M., Adam, M., Haese, A., Wittmer, C., Sauter, G., Wilczak, W., Huland, H., Schlomm, T., Steurer, S., Krech, T. 2015. Expression of DNA ligase IV is linked to poor prognosis and characterizes a subset of prostate cancers harboring TMPRSS2:ERG fusion and PTEN deletion.

19. Gupta, S., Iljin, K., Sara, H., Mpindi, J.P., Mirtti, T., Vainio, P., Rantala, J., Alanen, K., Nees, M., Kallioniemi, O., 2010. FZD4 as a mediator of ERG oncogene-induced WNT signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer research*. 70, 6735-6745.
20. Jemal, A, Tiwari RC, Murray T et al. Cancer statistics 2004. *CA Cancer J Clin* 54: 8 (2004).
21. Jhavar, S., Brewer, D., Edwards, S., Kote-Jarai, Z., Attard, G., Clark, J., Flohr, P., Christmas, T., Thompson, A., Parker, M., Shepherd, C., Stenman, U.H., Marchbank, T., Playford, R.J., Woodhouse, C., Ogden, C., Fisher, C., Kovacs, G., Corbishley, C., Jameson, C., Norman, A., De-Bono, J., Bjartell, A., Eeles, R., Cooper, C.S., 2009. Integration of ERG gene mapping and gene-expression profiling identifies distinct categories of human prostate cancer. *BJU international*. 103, 1256-1269.
22. Jung, V., Fischer, E., Imig, J., Kleber, S., Nuber, N., Reinshagen, F., Kamradt, J., Grobholz, R., Knuth, A., Renner, C., Wadle, A., 2010. Yeast-based Identification of Prostate Tumor Antigens Provides an Effective Vaccine Platform. *Anticancer Research*. 30, 895-902.
23. Kacprzyk, L.A., Laible, M., Andrasiuk, T., Brase, J.C., Borno, S.T., Falth, M., Kuner, R., Lehrach, H., Schweiger, M.R., Sultmann, H., 2013. ERG induces epigenetic activation of Tudor domain-containing protein 1 (TDRD1) in ERG rearrangement-positive prostate cancer. *PloS one*. 8, e59976.
24. Karbach, J., Neumann, A., Atmaca, A., Wahle, C., Brand, K., von Boehmer, L., Knuth, A., Bender, A., Ritter, G., Old, L.J., Jager, E., 2011. Efficient in vivo priming by vaccination with recombinant NY-ESO-1 protein and CpG in antigen naive prostate cancer patients. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 17, 861-870.
25. Kawabata, R., Wada, H., Isobe, M., Saika, T., Sato, S., Uenaka, A., Miyata, H., Yasuda, T., Doki, Y., Noguchi, Y., Kumon, H., Tsuji, K., Iwatsuki, K., Shiku, H., Ritter, G., Murphy, R., Hoffman, E., Old, L.J., Monden, M., Nakayama, E., 2007. Antibody response against NY-ESO-1 in CHP-NY-ESO-1 vaccinated patients. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 120, 2178-2184.
26. Kawada, J., Wada, H., Isobe, M., Gnjatic, S., Nishikawa, H., Jungbluth, A.A., Okazaki, N., Uenaka, A., Nakamura, Y., Fujiwara, S., Mizuno, N., Saika, T., Ritter, E., Yamasaki, M., Miyata, H., Ritter, G., Murphy, R., Venhaus, R., Pan, L., Old, L.J., Doki, Y., Nakayama, E., 2012. Heteroclitic serological response in esophageal and prostate cancer patients after NY-ESO-1 protein vaccination. *Int J Cancer*. 130, 584-592.
27. Kluth, M., Harasimowicz, S., Burkhardt, L., Grupp, K., Krohn, A., Prien, K., Gjoni, J., Haß, T., Galal, R., Graefen, M., Haese, A., Simon, R., Hühne-Simon, J., Koop, C., Korb, J., Weischenfeld, J., Huland, H., Sauter, G., Quaas, A., Wilczak, W., Tsourlakis, M.C., Minner, S., Schlomm, T. 2014. *Clinical*



- significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer.
28. Kluth, M., Hesse, J., Heini, A., Krohn, A., Steurer, S., Sirma, H., Simon, R., Mayer, P.S., Schumacher, U., Grupp, K., Izbicki, J.R., Pantel, K., Dikomey, E., Korbel, J.O., Plass, C., Sauter, G., Schlomm, T., Minner, S., 2013. Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions. *Mod Pathol*.
  29. Köllermann J, Schlomm T, Bang H, Schwall GP, von Eichel-Streiber C, Simon R, Schostak M, Huland H, Berg W, Sauter G, Klocker H, Schrattenholz A (2008) Expression and prognostic relevance of annexin A3 in prostate cancer. *Eur Urol* 54: 1314–1323.
  30. Krohn, A., Diedler, T., Burkhardt, L., Mayer, P.S., De Silva, C., Meyer-Kornblum, M., Kotschau, D., Tennstedt, P., Huang, J., Gerhäuser, C., Mader, M., Kurtz, S., Sirma, H., Saad, F., Steuber, T., Graefen, M., Plass, C., Sauter, G., Simon, R., Minner, S., Schlomm, T., 2012. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *The American journal of pathology*. 181, 401-412.
  31. Krohn, A., Diedler, T., Burkhardt, L., Mayer, P.S., De Silva, C., Meyer-Kornblum, M., Kotschau, D., Tennstedt, P., Huang, J., Gerhäuser, C., Mader, M., Kurtz, S., Sirma, H., Saad, F., Steuber, T., Graefen, M., Plass, C., Sauter, G., Simon, R., Minner, S., Schlomm T. 2012. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer.
  32. Kron, K., Trudel, D., Pethe, V., Briollais, L., Fleshner, N., van der Kwast, T., Bapat, B., 2013. Altered DNA Methylation Landscapes of Polycomb-Repressed Loci Are Associated with Prostate Cancer Progression and ERG Oncogene Expression in Prostate Cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 19, 3450-3461.
  33. Lapointe, J., Li, C., Giacomini, C.P., Salari, K., Huang, S., Wang, P., Ferrari, M., Hernandez-Boussard, T., Brooks, J.D., Pollack, J.R., 2007. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer research*. 67, 8504-8510.
  34. Minner, S., Wittmer, C., Graefen, M., Salomon, G., Steuber, T., Haese, A., Huland, H., Bokemeyer, C., Yekebas, E., Dierlamm, J., Balabanov, S., Kilic, E., Wilczak, W., Simon, R., Sauter, G., Schlomm, T., 2011b. High level PSMA expression is associated with early PSA recurrence in surgically treated prostate cancer. *The Prostate*. 71, 281-288.
  35. Nakada, T., Noguchi, Y., Satoh, S., Ono, T., Saika, T., Kurashige, T., Gnjatic, S., Ritter, G., Chen, Y.T., Stockert, E., Nasu, Y., Tsushima, T., Kumon, H., Old, L.J., Nakayama, E., 2003. NY-ESO-1 mRNA expression and immunogenicity in advanced prostate cancer. *Cancer Immun*. 3, 10.

36. Prikler, L., Scandella, E., Men, Y., Engeler, D.S., Diener, P.A., Gillessen, S., Ludewig, B., Schmid, H.P., 2004. [Adaptive immunotherapy of the advanced prostate cancer - cancer testis antigen (CTA) as possible target antigens]. *Aktuelle Urol.* 35, 326-330.
37. Sakr WA, Grignon DJ, Crissman JD et al. High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases. *In Vivo* 8: 439 (1994).
38. Schlomm T, Erbersdobler A, Mirlacher M, Sauter G (2007a). Molecular staging of prostate cancer in the year 2007. *World J Urol* 25: 19–30.
39. Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, Jessen B, Köllermann J, Minner S, Passow-Drolet A, Mirlacher M, Milde-Langosch K, Graefen M, Haese A, Steuber T, Simon R, Huland H, Sauter G, Erbersdobler A. (2008). Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod Pathol* 21: 1371–1380.
40. Schlomm T, Kirstein P, Iwers L, Daniel B, Steuber T, Walz J, Chun FH, Haese A, Köllermann J, Graefen M, Huland H, Sauter G, Simon R, Erbersdobler A (2007b) Clinical significance of epidermal growth factor receptor protein overexpression and gene copy number gains in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 13: 6579–6584.
41. Siesling, S, van Dijck JA, Visser O et al. Trends in incidence of and mortality from cancer in The Netherlands in the period 1989- 1998. *Eur J Cancer* 39: 2521 (2003).
42. Simpson, A.J., Caballero, O.L., Jungbluth, A., Chen, Y.T., Old, L.J., 2005. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature reviews. Cancer.* 5, 615-625.
43. Statistisches Bundesamt, Sterbefälle männlich 2012 nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10:  
<http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.destatis.de%2FDE%2FZahlenFakten%2FGesellschaftStaat%2FGesundheit%2FTodesursachen%2FTabellen%2FSterbefaelleMaennlich.html&date=2014-11-12>
44. Taylor, B.S., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., Carver, B.S., Arora, V.K., Kaushik, P., Cerami, E., Reva, B., Antipin, Y., Mitsiades, N., Landers, T., Dolgalev, I., Major, J.E., Wilson, M., Socci, N.D., Lash, A.E., Heguy, A., Eastham, J.A., Scher, H.I., Reuter, V.E., Scardino, P.T., Sander, C., Sawyers, C.L., Gerald, W.L., 2010. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer cell.* 18, 11-22.
45. Tomlins, S.A., Rhodes, D.R., Perner, S., Dhanasekaran, S.M., Mehra, R., Sun, X.W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., Lee, C., Montie, J.E., Shah, R.B., Pienta, K.J., Rubin, M.A., Chinnaiyan, A.M., 2005. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science.* 310, 644-648.

- 
46. Uenaka, A., Wada, H., Isobe, M., Saika, T., Tsuji, K., Sato, E., Sato, S., Noguchi, Y., Kawabata, R., Yasuda, T., Doki, Y., Kumon, H., Iwatsuki, K., Shiku, H., Monden, M., Jungbluth, A.A., Ritter, G., Murphy, R., Hoffman, E., Old, L.J., Nakayama, E., 2007. T cell immunomonitoring and tumor responses in patients immunized with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan (CHP) and NY-ESO-1 protein *Cancer immunity*. 7, 9.

## **9 Erklärung des Eigenanteils an der Publikation**

### Eigenanteil:

- Mitarbeit bei der Erstellung der TMA Prognosearrays
- Auswertung der Ergebnisse (IHC-Analyse und statistische Auswertung)
- Literaturrecherche zum Protein NY-ESO-1
- Mitarbeit bei der Verfassung des Manuskripts

### Anteil der Co-Autoren:

- Ausführung der IHC-Analysen sowie Mitarbeit bei der Verfassung des Manuskripts: Katharina Grupp, Maria Christina Tsourlakis, Stefan Steurer und Waldemar Wilczak
- Datenakquisition, Datenbankgenerierung und statistische Analysen: Ronald Simon, Jakob Robert Izbicki, Markus Graefen, Hartwig Huland, Maike Adam und Christina Koop
- Studien-Design und -Koordination sowie fachliche Revision des Manuskripts: Ronald Simon, Guido Sauter, Thorsten Schlomm, Alexander Quaas und Sarah Minner

## **10 Danksagung**

Mein ganz großer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Guido Sauter, Direktor des Institutes für Pathologie mit den Sektionen Molekularpathologie und Zytopathologie, der mir dieses äußerst interessante Forschungsprojekt vorschlug.

Die Ausführung der labortechnischen Untersuchungen sowie Koordinierung erfolgte mit dem Team des TMA Labors. Hier möchte ich Christina Koop meinen besonderen Dank aussprechen.

Ferner bedanke ich mich bei den medizinischen Technischen Laboratoriumsassistentinnen, die mir stets bei allen Fragen sehr hilfreich und freundlich zur Seite standen und mich bei den laborchemischen Analysen unterstützten. Ganz besonders danke ich Janett Lütgens, Inge Brandt sowie Sünje Seekamp.

Von Frau Dr. med. Katharina Grupp und Herrn PD Dr. rer. Nat. Ronald Simon erfuhr ich Hilfe im Rahmen der IHC Analysen, bei der Datenaquisition, Datenbankgenerierung und statistischen Analysen, wofür ich mich ganz herzlich bedanke.

Mein ganz besonderer Dank gilt Martina Kluth, die mir stets mit Rat und Tat sowie wertvollen Denkanstößen zur Seite stand.

Die Mitarbeiter des Institutes für Pathologie mit den Sektionen Molekularpathologie und Zytopathologie unterstützten mich in jeder Hinsicht. Ohne deren Engagement wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen.

---

Von ganzem Herzen dank ich meiner Familie sowie Lisa, die mir während meiner Studienzzeit immer zur Seite standen. Ich erfuhr unendliche Motivation, sie zeigten Verständnis und gaben mir die Kraft, alle Höhen und Tiefen in dieser Zeit durchzustehen.

## ***11 Eidesstattliche Erklärung***

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommen Stellen einzeln nach Ausgabe (auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe. Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:.....