

**Immunhistochemie der Carboxypeptidase A1 (CPA1) ist hoch sensitiv und
spezifisch für das Azinuszellkarzinom des Pankreas (ACC).**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Medizin (Dr. med.)
an der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Hendrina de los Angeles Contreras Riera
aus El Tigre/Venezuela

2025

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Guido Sauter
Gutachter:in der Dissertation: PD Dr. Andreas Block
Vorsitz der Prüfungskommission: PD Dr. Andreas Block
Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Ronald Simon
Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Elke Oetjen

Datum der mündlichen Prüfung: 08.01.2026

Inhaltsverzeichnis

1	Fragestellung	4
2	Einleitung	4
3	Material und Methode	6
3.1	Tissue Microarray (TMA) Technik	6
3.2	TMA-Planung	7
1.1.	TMA-Produktion	9
3.3	TMA für das CPA1 Projekt	11
3.4	Immunohistochemie	12
3.5	CPA1 Immunhistochemie	13
3.6	Statistik	14
4	Ergebnisse	15
4.1	Technische Aspekte	15
4.2	CPA1 in Normalgewebe	15
4.3	CPA1 in Tumoren	17
4.4	CPA1 Heterogenität in Azinuszellkarzinomen	24
5	Diskussion	26
6	Zusammenfassung	31
7	Summary	32
8	Literaturverzeichnis	33
9	Abkürzungsverzeichnis	36
10	Abbildungsverzeichnis	37
11	Tabellenverzeichnis	37
12	Erklärung des Eigenanteils	38
13	Eidesstattliche Erklärung	39
14	Danksagung	40

1 Fragestellung

Ziel der Arbeit ist es, durch eine standardisierte immunhistochemische Analyse von 15.000 Gewebeproben von 132 verschiedenen Tumor-Entitäten, sowie von 76 verschiedenen Normalgeweben, die Spezifität und Sensitivität der CPA1-Immunhistochemie als Diagnoseparameter für das Azinuszellkarzinom des Pankreas festzustellen.

2 Einleitung

Das Azinuszellkarzinom (ACC) des Pankreas ist eine seltene Krebsart, die von den Azinuszellen des Pankreas ausgeht und <2 % aller Pankreasneoplasien ausmacht ¹. Die meisten ACCs treten als reine ACCs auf, aber auch gemischte Karzinome mit >25% zusätzlicher Zelltypen kommen vor, darunter das gemischt azinär-endokrine Karzinom (MAEC) und das gemischt azinär-duktales Karzinom (MADC) ². Eine kürzlich durchgeführte Analyse von 57.804 Patienten mit Pankreaskarzinom, die sich einer chirurgischen Resektion unterzogen, ergab ein medianes Gesamtüberleben (mOS) von 67,5 Monaten und ein 5-Jahres-Gesamtüberleben (OS) von 51% für ACC ³. In Fallberichten erreichte das OS bis zu 123 Monate ⁴. Dementsprechend ist die Prognose des ACC deutlich besser als die 22% 5-Jahres-OS von resezierten duktales Adenokarzinomen, aber deutlich schlechter als die 84% 5-Jahres-OS von neuroendokrinen Tumoren des Pankreas ³. Erhebliche Unterschiede in den molekularen Veränderungen zwischen diesen Tumorentitäten sind wahrscheinlich für deutliche Unterschiede in der Krebsaggressivität und auch im Ansprechen auf die Chemotherapie verantwortlich ⁵. Eine genaue Unterscheidung dieser Pankreastumorentitäten durch den Pathologen ist daher von großer Bedeutung. Aufgrund seines recht breiten morphologischen Spektrums mit morphologischen und immunhistochemischen Überschneidungen mit neuroendokrinen Tumoren, kann das ACC für Pathologen eine schwierige Diagnose darstellen, und es kommt sowohl bei histologischen als auch bei zytologischen Proben nicht selten zu Fehldiagnosen ⁶⁻⁸. Die korrekte Diagnose in Fällen mit nicht-prototypischer Morphologie erfordert die Verwendung von immunhistochemischen Markern wozu u.a. Antikörper gegen Trypsin, Chymotrypsin, BCL-10, Zytokeratin 19 und Zytokeratin 7 empfohlen wurden ⁹. Keiner dieser Antikörper ist jedoch 100% sensitiv und spezifisch für das ACC ^{10, 11}.

Carboxypeptidase A1 (CPA1) ist eine Zink-Metalloprotease, die durch das CPA1-Gen auf dem langen Arm von Chromosom 7 (7q32.2) kodiert wird. Es handelt sich um ein 34,6 kDa großes Protein, das in den Azinuszellen des Pankreas gebildet wird. Es ist an der Zymogenhemmung beteiligt und spaltet bevorzugt C-terminale verzweigtkettige und aromatische Aminosäuren aus Nahrungsproteinen ¹². Mutationen des CPA1-Gens wurden mit chronischer Pankreatitis in Verbindung gebracht ^{13, 14}. Erhöhte CPA1-Serumproteinspiegel wurden bei Patienten mit Pankreaskrebs beschrieben ¹⁵. Aufgrund der Expression von CPA1 in Azinuszellen könnte der immunhistochemische CPA1-Nachweis eine sichere Diagnose eines ACC ermöglichen. In einer kürzlich durchgeführten Studie, in der 14 ACC, 5 MAEC sowie 80 nicht-azinäre Pankreastumoren analysiert wurden,

fanden Said et al. tatsächlich 100% Sensitivität und 95% Spezifität einer positiven CPA1-Immunfärbung für ACC ¹⁶.

Um das Potenzial der CPA1-Immunfärbung zur Sicherung der Diagnose von pankreatischen ACC weiter beurteilen zu können, ist eine umfassende Untersuchung der CPA1-Immunfärbung in nicht-pankreatischen Tumorarten erforderlich. In dieser Studie wurde daher die CPA1-Expression in mehr als 15.680 Tumorgewebe-proben von 132 verschiedenen Tumorarten und -subtypen, sowie 76 verschiedenen nicht neoplastischen Gewebetypen, mittels Immunhistochemie in einem TMA-Format (Tissue Microarray) analysiert.

3 Material und Methode

3.1 Tissue Microarray (TMA) Technik

Die Tissue Microarray Methode wurde 1997 von der Arbeitsgruppe von Prof. Olli Kallioniemi, (damals: National Human Genom Research Institut, Bethesda, Maryland, USA) und Prof. Guido Sauter (damals: Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel, Schweiz) entwickelt und 1998 erstmals publiziert ¹⁷.

Das Verfahren beinhaltet die Entnahme von Gewebezyllindern aus tumorhaltigen Paraffinblöcken und die organisierte Einbringung dieser Zylinder in leere Paraffin-Empfänger-Blöcke an definierten Positionen, wobei ein Empfänger-Paraffinblock mehr als 600 verschiedene Tumor-Zylinder aufnehmen kann. Von TMA-Blöcken angefertigte Schnitte enthalten dann von allen Tumoren des Empfänger-Blocks eine 0,6 mm durchmessende Gewebescheibe, welche sowohl morphologisch beurteilt, als auch mittels *in situ* Methoden wie Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), RNA-in-situ-Hybridisierung oder Immunhistochemie (IHC) untersucht werden können. Da pro Schnittpräparat bis zu 600 verschiedene Tumoren zur Untersuchung gelangen können, führt die TMA-Methode zu einer massiven Beschleunigung von wissenschaftlichen Untersuchungen an den Geweben und gleichzeitig zu einer erheblichen Kostenreduktion. Im Gegensatz zu Studien, bei denen ein Tumor pro Gewebeschnitt zur Untersuchung gelangt, führt die Untersuchung von 600 Tumoren auf einem einzigen Schnitt zu einer Reduktion der benötigten Reagenzien-Menge um einen Faktor von circa 600.

Der Hauptvorteil der TMA-Methode liegt indessen in der maximalen Standardisierung der gesamten Analyse. Da für eine TMA-Studie ein(e) Medizinisch-Technische(r) Angestellte(r) (MTA) typischerweise alle benötigten Schnittpräparate an einen Tag herstellt und die gleichen Schnittpräparate an einem der folgenden Tage alle färbt, ist auch die für die Qualität der immunhistochemischen Färbung wichtige Schnittlagerungszeit (Abstand zwischen Schnittherstellung und immunhistochemischen Färbung) für alle Tumoren konstant und kurz. Neben den klassischen Färbeparametern wie Inkubationszeit, Antikörperkonzentration und Inkubationstemperatur - welche auch in Immun-Färbeautomaten standardisiert werden können - sind auch weichere Laborparameter, z.B. die wie Raumtemperatur während der Schnittlagerung bei TMA-Studien, absolut identisch. Ebenfalls identisch ist die pro Tumor zur Untersuchung gelangende Gewebemenge (Durchmesser: 0,6 mm pro Tumor). In konventionellen Großschnittstudien fließen meistens sowohl große Präparate von Tumorsektionen und kleine Biopsien mit ein. Studien haben gezeigt, dass die Menge von untersuchtem Gewebe die Wahrscheinlichkeit auf ein positives Farbergebnis bei immunhistochemischen Untersuchungen erhöht ¹⁸. Ein weiterer wesentlicher Vorteil des TMA-Verfahren ist, dass Vorgaben des Datenschutzes gut umgesetzt werden können. Jedes einzelne Tumorgewebsfragment in TMA-Schnitt ist durch seine Koordinate im TMA-Block definiert, so dass die Notwendigkeit entfällt, Parameter wie beispielsweise die Biopsienummer zu verwenden, die eine potenzielle Re-Identifizierung des Patienten ermöglichen. Solche Identifikations-Nummern können nach Fertigstellung eines TMA-Blocks entweder ausgeblendet (Pseudonymisierung) oder definitiv gelöscht (Anonymisierung) werden. Das größte Hindernis für die Durchführung von TMA-Studien ist die Verfügbarkeit von geeigneten TMAs, beziehungsweise ihre Herstellung, da die TMA-Herstellung mit einem sehr erheblichen Aufwand verbunden ist.

Der Prozess der TMA-Herstellung lässt sich in die folgenden Unterprozessen aufteilen:

1. Identifikation potenziell geeigneter Fälle
2. Qualitätskontrolle und Markierung der ausgewählten Schnittpräparate
3. TMA-Planung
4. TMA-Produktion

Identifikation potenziell geeigneter Fälle

Die Identifikation möglicher Fälle beginnt mit einer Volltextsuche im Pathologie Informationssystem. Dazu werden das Ursprungsorgan und der Tumortyp als Suchbegriffe verwendet in Kombination mit Suchbegriffen, welche sicherstellen, dass keine Kleinbiopsien, sondern in wesentlichen Operationspräparate identifiziert werden. Um dieser Anforderung gerecht zu werden, werden typischerweise zusätzlichen Suchbegriffe wie pT1, pT2, pT3 oder pT4 verwendet.

Qualitätskontrolle und Schnittmarkierung

Ziel dieses Prozessteils ist die Identifikation von Tumoren, welche eine eindeutige, sichere Diagnose aufweisen, eine ausreichend große Tumormenge beinhalten damit auch multiple TMA-Blöcke hergestellt werden können und von denen die verfügbaren Paraffinblöcke dick genug sind, um ausreichend lange Stenzen aus dem Tumormaterial entnehmen zu können. Die Länge der Stenzen definiert die Zahl der TMA-Schnitte, welche letztlich Anteile des entsprechenden Tumors enthalten werden.

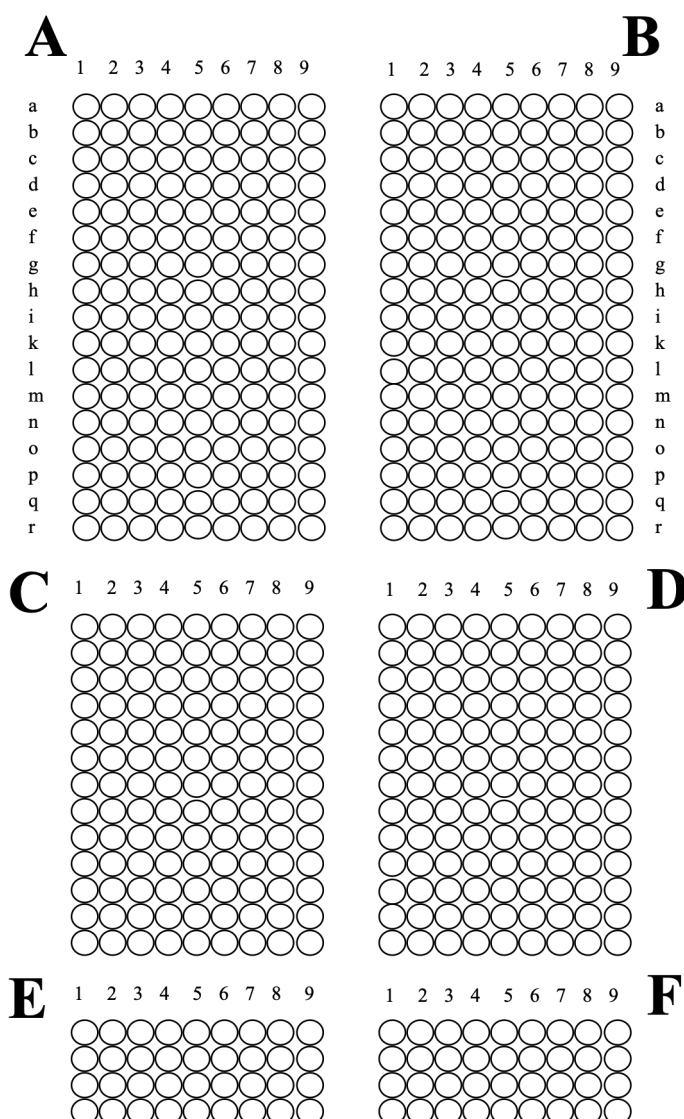
Die Identifikation geeigneten Fälle beginnt mit einer Inspektion der Diagnosetexte. Dabei können Diagnoseunsicherheiten erkannt werden und auch Tumoren, welche durch ausgedehnte Nekrosen, bzw. einem Mangel an vitalem Tumorgewebe gekennzeichnet sind. Derartige Tumoren werden ohne Inspektion der histologischen Schnitte von TMA-Projekten ausgeschlossen. Von den verbliebenen Kandidaten werden alle gefärbten Schnitte aus dem Archiv hervorgeholt und von einem Pathologen inspiziert. Der Tumorschnitt mit der größten Tumormenge - und gegebenenfalls ein oder zwei weitere Schnitte als Reserve - werden mit einem Filzstift markiert. Dabei umkreist der Pathologe die für die TMA-Herstellung geeigneten Tumorbereiche. Diese sollte mindestens eine Fläche von einem Quadratzentimeter ausmachen. Von diesen Schnitten werden die korrespondierenden Paraffinblöcke aus dem Archiv zusammengesammelt und von einer/einem erfahrenen MTA auf Brauchbarkeit überprüft. Kriterien hierfür sind das Fehlen von Beschädigungen und eine ausreichende Blockdicke ($\geq 2,0$ mm).

3.2 TMA-Planung

Sobald alle für ein neues TMA-Projekt identifizierten Gewebe bekannt sind, wird der genaue Aufbau des zu konstruierenden TMAs definiert. Zu jedem TMA wird eine Excel-Datei angelegt, in welcher der Biopsienummer eines jeden Tumors eine Zeile und eine spezifische Position im Koordinatensystem des TMAs zugeordnet wird. Die am UKE hergestellten TMA-Blöcke sind prinzipiell immer gleich aufgebaut. Sie bestehen aus sechs Sektoren, welche zur besseren Orientierbarkeit ungleich groß und asymmetrisch aufgebaut sind. Die Sektoren werden mit Großbuchstaben von A bis F definiert. In jeden einzelnen Sektor werden die Zeilen mit Zahlen

von 1 bis 9 und die Spalten mit Kleinbuchstaben von a bis maximal r bezeichnet. Der typische Aufbau eines UKE TMA-Blockes ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Abbildung 1: Das Layout eines typischen TMA-Blockes.



Nach Herstellung des TMAs werden die Biopsienummern, welche für die Zuordnung der Schnitte und Blöcke unverzichtbar waren, entweder aus der Excel-Datei ausgeblendet (Pseudonymisierung) oder definitiv gelöscht (Anonymisierung). Ein Beispiel eines TMA-File mit TMA-Koordinaten und assoziierten klinischen und pathologischen Daten ist in Tabelle 1 dargestellt. Die Entfernung der Biopsienummer aus dem Datenfile ist wichtig, denn ihre Kenntnis könnte einem Hacker, beim erfolgreichen Eindringen in das Pathologie-Informationssystem, Einblick in die Klarnamen der betroffenen Patienten ermöglichen.

Tabelle 1: Ausschnitt aus der Datentabelle (verwendete Software MS Excel)

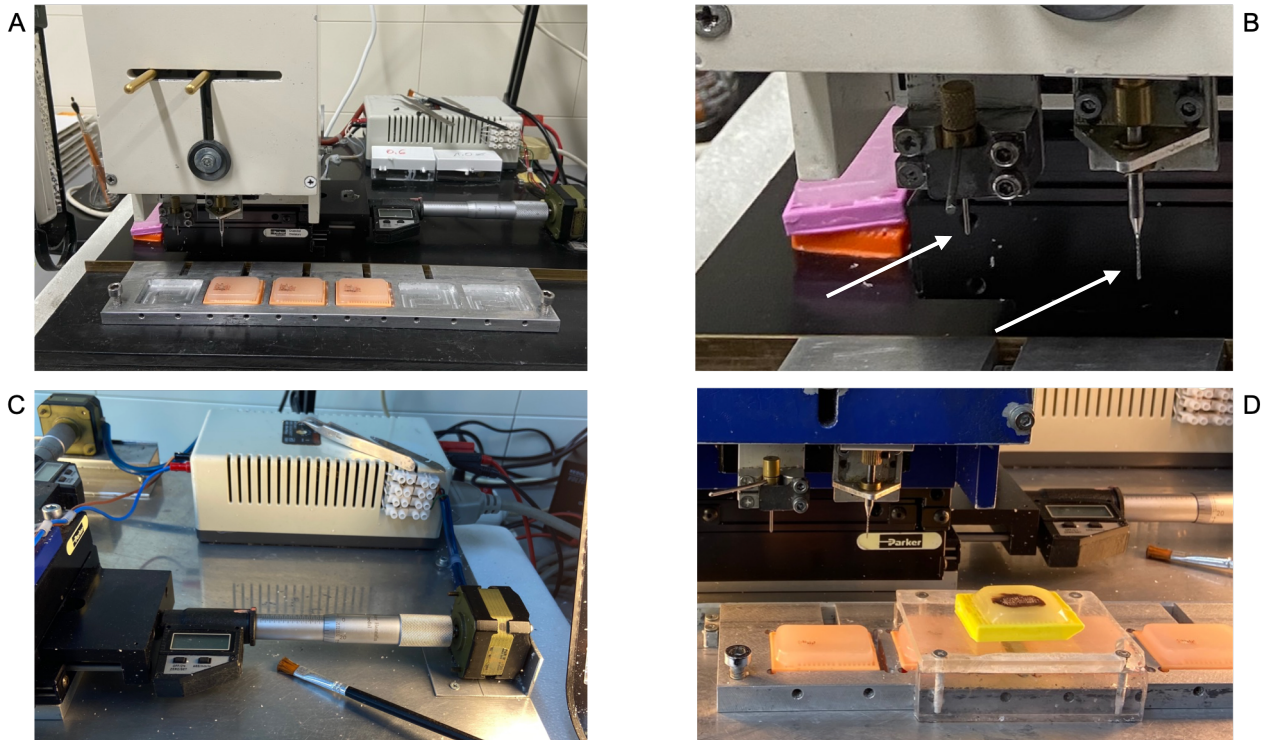
Array Name	Array Block	Koordinate	Tumortyp	Geschlecht	pT RED	pN RED	pM RED	Grad RED	OS months	OS cens	CPA1 #3354 2021-01-14 INT	CPA1 #3354 2021-01-14 %	CPA1 Kommentar	CPA1 #3354 2021-01-14 RES 30-70
BLA 4.1	A	A 1a	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT3	pN+	pMx	3			0	0		negative
BLA 4.1	A	A 1b	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT3			3	75	0	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 1c	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT4	pN+	pMx	3	4	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 1d	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT2	pN+	pMx	3			0	0		negative
BLA 4.1	A	A 1e	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT2	pN0	pMx	3	15	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 1f	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT3	pN+	pMx	3	8	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 1g	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT3	pN+	pMx	3	9	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 1h	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT4	pN0	pMx	3	9	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 1i	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT3	pN0	pMx	3	37	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 1k	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT3	pN0	pMx	3	52	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 1l	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT4			3	4	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 1m	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT3	pN0	pMx	3	24	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 1n	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT4	pN0	pMx	3			0	0		negative
BLA 4.1	A	A 1o	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT1	pN0	pMx	3	47	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 1p	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT2	pN0	pMx	3	1	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 1q	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT4	pN0	pMx	3	7	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 1r	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT3	pN+	pMx	3	9	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 2a	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT3	pN0	pMx	3	25	0	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 2b	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT2	pN0	pMx	3	46	0	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 2c	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT4	pN0	pMx	3	46	0	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 2d	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT3	pN0	pMx	3	37	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 2e	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m		pN0	pMx	3	45	0	0	0	no tumor	
BLA 4.1	A	A 2f	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT4	pN0	pMx	3	74	0	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 2g	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT3	pN0	pMx	3			0	0		negative
BLA 4.1	A	A 2h	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT2	pN0	pMx	3	34	0	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 2i	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT4			3	9	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 2k	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT4	pN0	pMx	3	28	0	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 2l	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT2	pN0	pMx	3			0	0		negative
BLA 4.1	A	A 2m	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m		pN0	pMx	3	1	0	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 2n	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT3			3	12	0	0	0	no tumor	
BLA 4.1	A	A 2o	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT3	pN+	pMx	3	38	0	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 2p	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT2	pN+	pMx	3	77	0	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 2q	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT3	pN0	pMx	3	22	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 2r	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT2	pN0	pMx	3			0	0		negative
BLA 4.1	A	A 3a	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT3	pN+	pMx	3	42	0	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 3b	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT3	pN+	pMx	3	13	0	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 3c	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT2	pN0	pMx	3	8	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 3d	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT2	pN0	pMx	3	31	0	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 3e	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT1	pN0	pMx	3	22	0	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 3f	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT2	pN+	pMx	3	21	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 3g	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT3	pN0	pMx	3			0	0	no tissue	
BLA 4.1	A	A 3h	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT3	pN0	pMx	3	39	0	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 3i	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT3	pN+	pMx	3	4	1	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 3k	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT3	pN0	pMx	3	12	0	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 3l	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	m	pT2	pN0	pMx	3	4	0	0	0		negative
BLA 4.1	A	A 3m	Urothelial carcinoma, pT2-4 G3	w	pT3	pN0	pMx	3	73	0	0	0		negative

Nach Abschluss der TMA-Planung werden die Tumorblöcke (sogenannte Spenderblöcke) zusammen mit den korrespondierenden HE-Schnitten, auf denen die Tumorfläche mit Filzstift markiert worden war, in der Reihenfolge der geplanten Einbringung in den TMA-Empfänger-Block sortiert.

1.1. TMA-Produktion

Für die TMA-Herstellung wird ein von Mitarbeitenden des Instituts für Pathologie hergestellter halbautomatischer Tissue Arrayer verwendet. Die wichtigsten Komponenten des UKE-Arrayers (Abbildung 2A) sind ein Umschaltmechanismus, der es ermöglicht, an einer exakt definierten Position wechselweise einen Bohrer oder aber eine Hohlneedle zum Einsatz zu bringen (Abbildung 2B), ein elektrischer Schrittmotor, der es ermöglicht, die Umschaltvorrichtung jeweils um eine Position vorwärts oder zurück zu bewegen (Abbildung 2C), ein Mehrfach-Blockhalter, der es ermöglicht bis zu sechs leere Empfängerblöcke parallel zu bearbeiten und ein Blockpodest, welches bei Bedarf über die Empfängerblöcke gelegt werden kann, sodass oberhalb des Empfängerblocks Gewebe aus dem Spendenblock entnommen werden kann (Abbildung 2D).

Abbildung 2: TMA Arrayer. A) Gesamtansicht des Arrayers mit Mehrfach-Blockhalter aus Aluminium für 6 TMA-Blöcke (im Bild sind 3 Positionen belegt), B) Hohl-nadel (Pfeil links) und Bohrer (Pfeil rechts) im verschiebbaren Stanzkopf. C) Schrittmotor, der den Stanzkopf in die Position für die nächste Stanze bewegt. D) Mehrfachblockhalter mit aufgesetztem Blockpodest.



Die Prozedur der TMA-Herstellung beginnt mit der Bohrung eines 0,6 mm messenden Loches in das erste Replikat des leeren Empfängerblocks. Hierfür wird der elektrische Bohrer verwendet, dessen äußerer Durchmesser 0,6 mm beträgt. Danach wird das Blockpodest über den Empfängerblock gelegt, die Umschaltvorrichtung vom „Bohrer“ auf „Nadel“ umgeschaltet und es wird mit der Hohl-nadel (innerer Durchmesser 0,6 mm) ein Gewebezyylinder aus dem Tumorblock entnommen, welcher für die Position A1a vorgesehen ist. Die Identifikation von tumorhaltigen Gewebeanteilen auf dem Spendenblock wird durch Abgleich zwischen dem Block und dem eingezeichneten HE-Schnitt bewerkstelligt (Abbildung 3).



Abbildung 3: Tumorhaltiger Spenderblock mit dazugehörigem HE-Schnitt.

Das aus den Spenderblöcken entfernte Gewebe kann dann mittels eines Stahldrahtes aus der Hohlneedle in das vorgefertigte Loch hineingestoßen werden. Dabei wird darauf geachtet, dass die obere Begrenzung des Zylinders exakt auf dem Niveau der Empfängerblock-Oberfläche zu liegen kommt.

Danach wird der Mehrfach-Blockhalter von Position 1 auf Position 2 umplatziert (Abbildung 2D) und die Prozedur wird wiederholt. Dabei wird aus dem Spenderblock eine weitere Stanze entnommen und in ein vorgefertigtes Loch an Position A1a eingefügt. Bei der Entnahme des zweiten Zylinders und bei allen weiteren Zylindern wird darauf geachtet, dass das Material aus unmittelbarer Umgebung des ersten Bohrloches stammt, um mögliche Einflüsse einer intratumoralen Heterogenität auf die UKE TMAs zu minimieren. Je weiter entnommene Tumorstanzes im Tumor voneinander entfernt liegen, desto größer ist das Risiko, biologisch unterschiedliche Tumorphyspopulations zu erfassen.

Unter Verwendung eines einzigen Mehrfachreplikahalters können auf diese Art und Weise bis zu sechs, weitgehend identische Replikate eines TMAs hergestellt werden. Sofern Bedarf besteht, noch mehr Kopien eines TMAs herzustellen, können ein zweiter, dritter oder vierter Mehrfach-Blockhalter hinzugenommen werden, sodass wahlweise 6, 12, 18 oder 24 Replikate eines TMAs hergestellt werden können. Nach Befüllung aller A1a Positionen der in Arbeit befindlichen TMAs wird der elektrische Schrittmotor betätigt und die Umschaltvorrichtung auf die Position A1b bewegt. Danach wird mit dem zweiten Spenderblock die gleiche Prozedur bis zur Befüllung des letzten Replikatempfängerblockes durchgeführt. Auf gleiche Weise werden sämtliche weiteren Tumoren eines Projektes nach und nach bearbeitet.

3.3 TMAs für das CPA1 Projekt

Für das vorliegende Projekt wurden ein Normalgewebe TMA und zwei Sets von Tumor TMAs verwendet. Der Normalgewebe TMA beinhaltete jeweils acht verschiedene Proben von 76 unterschiedlichen Organkategorien. Eine Liste der dabei untersuchten Gewebetypen ist in Tabelle 2 dargestellt. Der Multitumor-TMA beinhaltete insgesamt 15.680 Tumormproben von 132 verschiedenen Tumorkategorien. Die genaue Zusammensetzung des Tumor TMAs ist in Tabelle 4 dargestellt. Die genannten Tumoren waren auf insgesamt 51 TMA-Blöcken verteilt, wobei pro TMA-Block zwischen 80 und 602 Tumorgewebepproben vorhanden waren. Der Pankreas-Heterogenitäts-TMA enthielt jeweils 6 Proben aus dem Primärtumor und jeweils bis zu 3 Proben aus den Lymphknoten Metastasen von 224 Patienten, die im UKE zwischen 1994 und 2010 aufgrund eines Pankreaskarzinoms behandelt wurden.

Tabelle 2: Normalgewebe-Array (NTA 10)

Nr.	Organ/Gewebe Typ	n	Nr.	Organ/Gewebe Typ	n
1	Nebenniere	8	40	Lymphknoten	8
2	Analkanal, Haut	8	41	Mundhöhle	8
3	Analkanal, Übergangsschleimhaut	8	42	Eierstock, Gelbkörper	8
4	Aorta, Endothel	8	43	Eierstock, Follikelzyste	8
5	Aorta, Media	8	44	Eierstock, Stroma	8
6	Appendix, Schleimhaut	8	45	Bauchspeicheldrüse	8

Nr.	Organ/Gewebe Typ	n	Nr.	Organ/Gewebe Typ	n
7	Appendix, Muskelwand	8	46	Nebenschilddrüse	8
8	Knochenmark	8	47	Ohrspeicheldrüse	8
9	Brust	8	48	Penis, Corpus spongiosum	8
10	Bronchus, Drüsen	8	49	Hypophyse, Hypophysenvorderlappen	8
11	Bronchus, Schleimhaut	8	50	Hypophysenhinterlappen/ Infundibulum	8
12	Kleinhirn, Rinde (Stratum moleculare)	8	51	Plazenta früh, Dezidua	8
13	Kleinhirn, grau (Stratum neuronorum)	8	52	Plazenta, früh	8
14	Großhirn, grau	8	53	Plazenta, reif	8
15	Großhirn, weiß	8	54	Plazenta, reif, Amnion und Chorion	8
16	Colon descendens, Schleimhaut	8	55	Prostata	8
17	Colon descendens, Muskelwand	8	56	Rektum, Schleimhaut	8
18	Zwölffingerdarm, Brunner-Drüse	8	57	Samenblase	8
19	Zwölffingerdarm, Schleimhaut	8	58	Sinus paranasales	8
20	Ektozervix	8	59	Haut	8
21	Endozervix	8	60	Haut, Haarfollikel und Talgdrüsen	8
22	Endometrium, Proliferation	8	61	Milz	8
23	Endometrium, Sekretion	8	62	Magen, Antrum	8
24	Nebenhoden	8	63	Magen, Korpus	8
25	Ösophagus, muskulöse Wand	8	64	Magen, Muskelwand	8
26	Ösophagus, Plattenepithel	8	65	quergestreifter Muskel	8
27	Eileiter, Schleimhaut	8	66	Unterzungendrüse	8
28	Fett	8	67	Unterkieferdrüse	8
29	Gallenblase, Epithel	8	68	Hoden	8
30	Herz	8	69	Thymus	8
31	Ileum, Schleimhaut	8	70	Zunge, Muskel	8
32	Ileum, Muskulatur	8	71	Tonsille	8
33	Niere, Rinde	8	72	Tonsille, Oberflächenepithel	8
34	Niere, Mark	8	73	Schilddrüse	8
35	Niere, Becken, Muskelwand	8	74	Harnblase, Muskelwand	8
36	Niere, Becken, Urothel	8	75	Harnblase, Urothelium	8
37	Lippe, Mundschleimhaut	8	76	Uterus, Myometrium	8
38	Leber	8			
39	Lunge	8			

3.4 Immunohistochemie

Die Immunohistochemie ist ein Verfahren zur Visualisierung von definierten Proteinen an Gewebeschnitten. Wesentlichstes Reagenz des Verfahrens ist ein spezifischer Antikörper, der auf einen Gewebeschnitt aufgebracht wird und dann an sein Zielprotein bindet, sofern dieses auf dem Gewebeschnitt vorhanden ist. Die Bindung dieses sog. Primärantikörpers wird danach mit einem Visualisierungssystem sichtbar gemacht, das auf einem Sekundärantikörper beruht. Dabei handelt es sich um einen Antikörper aus einer anderen Spezies

als der des Primärantikörpers, welcher sich gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers richtet und mit einem Detektionssystem (meist einem Enzym, das eine Farbreaktion katalysiert) kombiniert ist. Für die diagnostische Anwendung von Antikörpern an formalinfixiertem Gewebe müssen zwei wesentliche Aspekte berücksichtigt werden, nämlich die Einflüsse der Formalinfixierung auf Proteine und ihre Reaktivität mit Antikörpern und die biologische Variabilität von verschiedenen Antikörpern gegen ein und dasselbe Zielprotein. Die Fixation von Geweben erfolgt weltweit in der Regel mit Formalin. Die Fixation dient der Verhinderung der Autolyse von Gewebe nach Entnahme aus der Blutversorgung. Formalin induziert hierfür eine Quervernetzung von Proteinen untereinander. Dies führt zu einer sehr guten Präservierung des Gewebes, aber auch zu Veränderungen der Proteinstruktur und verhindert unter Umständen die Zugänglichkeit zahlreicher Epitope, welche deswegen von Antikörpern nach Fixation nicht erkannt werden können. Die formalininduzierten Proteinvernetzungen können zumindest teilweise durch eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER; heat induced epitope retrieval) reversiert werden. Das HIER Verfahren besteht in einer starken Erhitzung der für die Immunohistochemie vorgesehenen Schnitte in einer wässrigen Lösung, wobei Temperaturen von bis zu 100°C oder 121°C (im Autoklav) verwendet werden.

Die biologische Variabilität von Antikörpern ist dadurch bedingt, dass unterschiedliche Hersteller von Antikörpern für ein bestimmtes Zielprotein für die Antikörperproduktion eine Immunantwort in einem Labortier auslösen und danach einen oder mehrere Antikörper für die Erzeugung eines Produktes auswählen. Da es nicht möglich ist, bei diesem Auswahlverfahren primär den am besten geeigneten Antikörper für Anwendung an formalinfixiertem Gewebe zu bestimmen, unterscheiden sich unterschiedliche Antikörperklone immer in ihren Färbereigenschaften, wobei die Unterschiede dramatisch sein können. Häufig kommen auch antikörperspezifische Kreuzreaktivitäten vor. Daten aus der Literatur, welche für ein bestimmtes Zielprotein mit einem Antikörper X erzielt worden sind, können deswegen nicht automatisch für Untersuchungen mit dem Antikörper Y als Maßstab herangezogen werden.

Die internationale Arbeitsgruppe für Antikörpervalidierung (international working group for antibody validation, IWGAV) hat deswegen empfohlen, dass Antikörper, welche für die Anwendung an formalinfixiertem Gewebe verwendet werden sollen, auch spezifisch für diese Anwendung validiert werden sollten. Die von der IWGAV empfohlenen Verfahren sind der Vergleich mit einer zweiten unabhängigen Methode zur Expressionsmessung, oder der Vergleich einer Antikörperfärbung mit der Färbung eines zweiten, unabhängigen Antikörpers gegen das gleiche Zielprotein.

3.5 CPA1 Immunhistochemie

Frisch hergestellte TMA-Schnitte wurden an einem Tag und in einem einzigen Experiment gefärbt. Hierfür wurden die Schnitte zunächst mit Xylol deparaffiniert, mittels einer absteigenden Alkoholreihe dehydriert und für 5 Minuten einer HIER-Prozedur in einem Autoklav bei 121°C in einer Pufferlösung mit pH7,8 (TRIS-EDTA-Puffer) unterzogen. Die im Gewebe immer vorhandene endogene Peroxidase wurde mit einem kommerziellen Reagenz (REAL Peroxidase-Blocking Solution von Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) blockiert, da sie sonst mit dem später nachfolgenden Detektionssystem reagieren würde. Der Primärantikörper für CPA1

(Maus, monoklonal, MSVA 601M, MS Validated Antibodies, Hamburg, Deutschland), wurde bei 37°C für 60 Minuten bei einer Verdünnung von 1:150 appliziert. Zur Visualisierung des gebundenen Antikörpers wurde das kommerzielle Detektionssystem (EnVision Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse kit, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Es besteht aus einem Sekundärantikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist und den Farbstoff Diaminobenzidine (DAB) von Farblos nach Braun umschlagen lässt. Die Schnitte wurden mit Hämalaun gegengefärbt. Zur Auswertung der Schnitte wurden für jeden Tumor-Spot der prozentuale Anteil positiver Tumorzellen und die Färbintensität abgeschätzt (0, 1+,2+,3+). Für statistische Auswertungen wurden die Färbeergebnisse in vier Gruppen kategorisiert (negativ, schwach positiv, mäßig stark positiv, stark positiv). Die Kriterien für die Einteilung der Tumoren in diese Gruppen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: IHC Scoring Kriterien

	Färbeintensität	Tumorzellen Färbung in %
negativ	0	0%
schwach positiv	1+	≤ 70%
schwach positiv	2+	≤ 30%
mäßig stark positiv	1+	> 70%
mäßig stark positiv	2+	31% - 70%
mäßig stark positiv	3+	≤30%
stark positiv	2+	> 70%
stark positiv	3+	> 30%

3.6 Statistik

Statistische Evaluationen wurden mit der Software JMP14 (SAS Institute Inc, Cari, NC, USA) vorgenommen. Mehrfelder-Tests und Chi Quadrat Tests wurden zur Klärung von statistischen Beziehungen zwischen molekularen Befunden und kategorischen Daten verwendet. Ein p-Wert von ≤0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Technische Aspekte

Von 15.680 Tumorgewebeproben waren in unserer TMA-Analyse letztlich 12,274 (87,3%) auswertbar. Ursachen für nicht interpretierbare Gewebeproben waren entweder das Fehlen von eindeutigen Tumorzellen auf den Gewebespots oder das vollständige Fehlen von einzelnen Gewebespots auf den untersuchten TMA-Schnitten. Mindestens vier Gewebeproben waren für jede Normalgewebeskategorie auswertbar.

4.2 CPA1 in Normalgewebe

Eine starke (3+) zytoplasmatische CPA1 Färbung fand sich ausschließlich im Pankreas und die Färbung war insbesondere in azinären Zellen deutlich erkennbar (Abbildung 4A). Allerdings fand sich bei mehreren Präparaten auch in der Umgebung der stark CPA1 positiven azinären Zellen eine Anfärbung von entweder Stroma oder von Gangstrukturen (Abbildung 4B). In allen anderen Normalgewebetypen ließ sich kein CPA1 nachweisen. Dazu gehörten insbesondere Skelettmuskel, Herzmuskel, glatte Muskulatur, Myometrium des Uterus, Corpus spongiosum des Penis, Ovar (einschließlich Corpus Luteum oder Theca, interne Zysten), Fett, Haut (einschließlich Haarfollikeln und Talgdrüsen), nicht-verhornendes Plattenepithel von Lippe, Mundhöhle, Tonsille, Ektozervix oder Ösophagus. Übergangsepithel des Analkanals, Urothel von Nierenbecken und Harnblase, Dezidua, Plazenta, Lymphknoten, Milz, Thymus, Tonsille, Gastrointestinale Schleimhaut (Magen, Duodenum, Ileum, Appendix, Kolon, Rektum), Gallenblase, Leber, Speicheldrüsen (Parotis, Submandibulardrüse, Sublingualdrüse, Brunner Drüsen), Niere, Prostata, Samenblase, Nebenhoden, Hoden, respiratorisches Epithel und Drüsen von Bronchien und paranasalen Sinus, Lunge, Mamma, Endozervix, Endometrium, Eileiter, Follikel, Zysten und Stroma des Ovars, Nebennieren, Nebenschilddrüsen, Kleinhirn, Großhirn und Hypophysen. Beispiele von CPA1 negativen Geweben sind in Abbildung 5 dargestellt. Eine Übersichtsaufnahme des CPA1 gefärbten Normalgewebe TMAs zeigt die Dominanz der CPA1 Färbung im Pankreasgewebe (Abbildung 4C). Zusätzlich findet sich ein CPA1 positiver Spot im Bereich der Thymus Gewebe. An dieser Stelle wurde irrtümlicherweise ein Pankreas Gewebefragment anstelle eines Tonsillen Fragmentes eingesetzt.

Abbildung 4: CPA1-Immunfärbung in normalen Geweben. A) Vergrößerung eines Microarray-Gewebepunkts, der eine starke CPA1-Färbung im Azinusparenchym des Pankreas zeigt. Keine Färbung in den Langerhans-Inseln*. B) Anfärbung von Stroma oder Gangstrukturen (gelbes Rechteck vergrößert) in der Umgebung der stark CPA1 positiven azinären Zellen, C) Überblick über den Microarray für Normalgewebe. Acht Spots des Azinusparenchyms in einer Reihe zeigen eine starke CPA1-Färbung (schwarzes Rechteck). In der Reihe mit dem Thymusgewebe wurde fälschlicherweise Azinusparenchym gestanzt (roter Kreis).

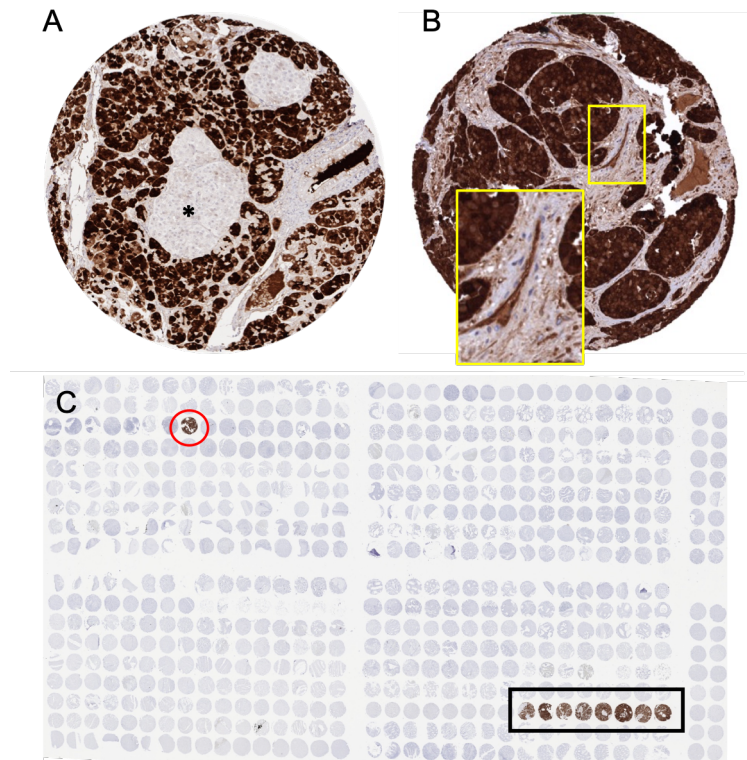
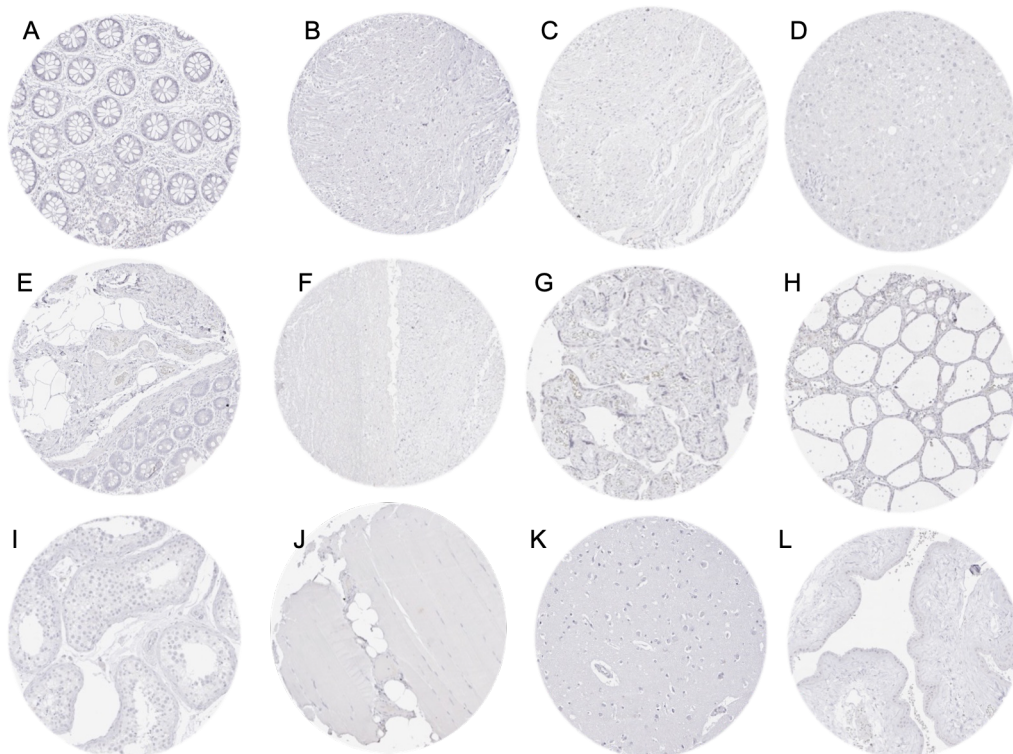


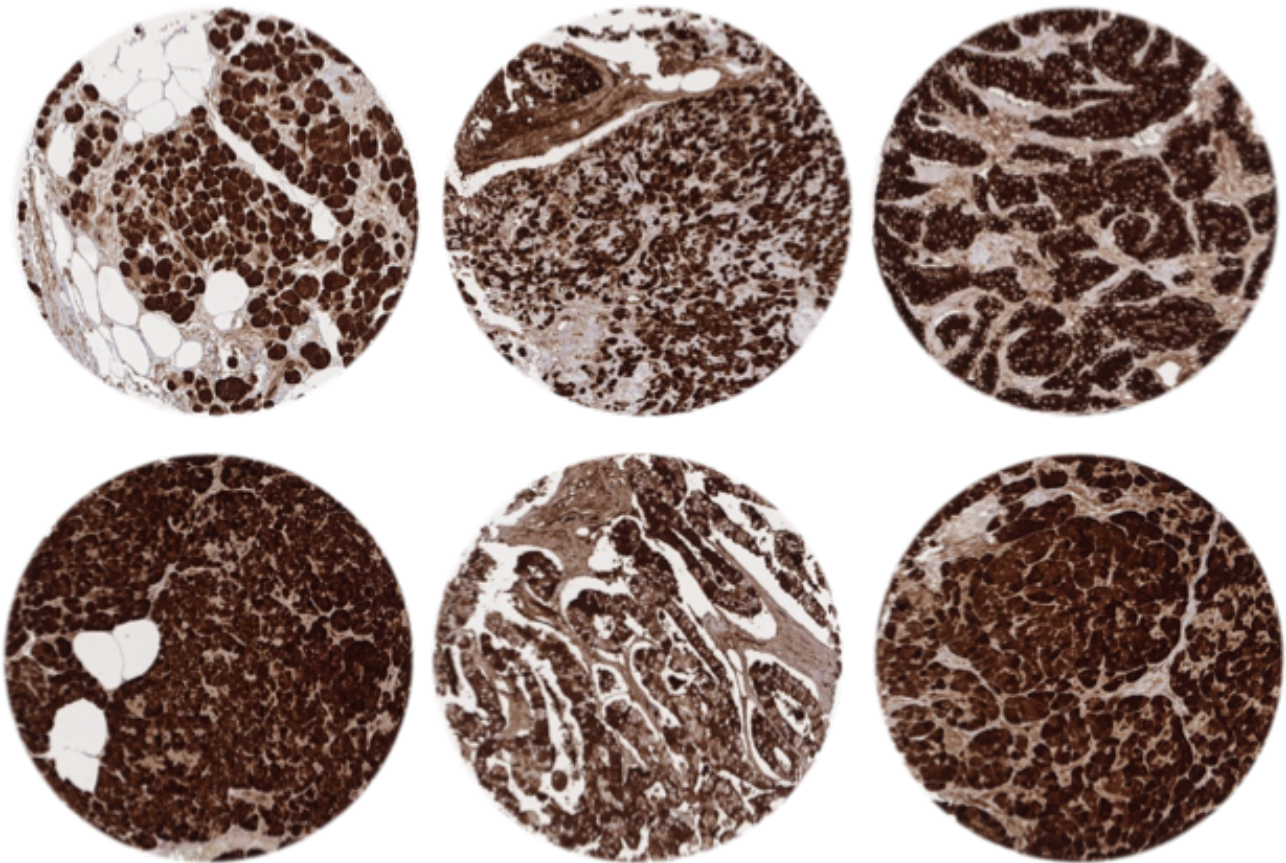
Abbildung 5: Negative CPA1-Immunfärbung in Normalgeweben: A) Colon, B) Appendix, Muskelwand, C) Magen, D) Leber, E), Duodenum, Brunner Drüsen, F), Aorta, Endothelium, G), Plazenta, reif, H), Schilddrüse, I) Hoden, J) Skelettmuskel, K) Plazenta.



4.3 3.3 CPA1 in Tumoren

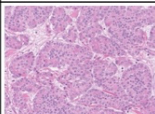
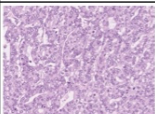
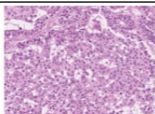
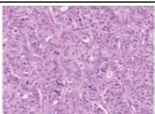
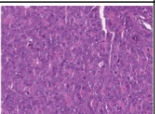
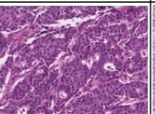
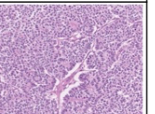
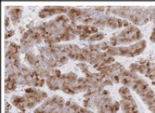
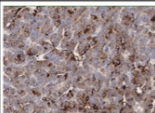
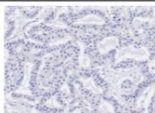
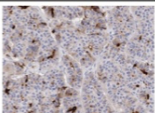
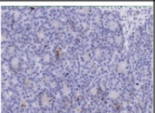
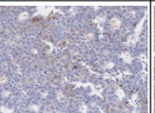
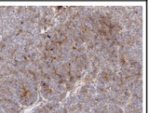
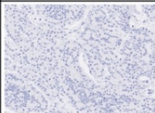
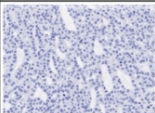
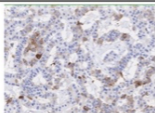
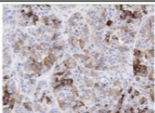
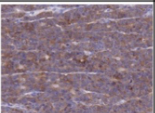
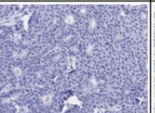
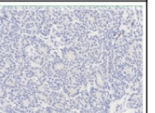
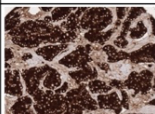
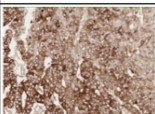
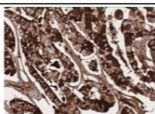
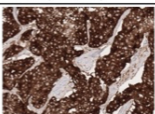
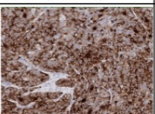
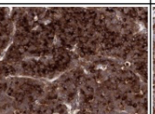
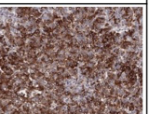
Eine starke zytoplasmatische CPA1 Positivität fand sich in 6 von 6 bereits initial als Azinuszellkarzinom diagnostizierten Tumoren (Abbildung 6).

Abbildung 6: Starke zytoplasmatische CPA1-Immunfärbung in der 6 initial als Azinuszellkarzinomen des Pankreas diagnostizierten Tumoren.



Zusätzlich fand sich eine starke CPA1 Immunfärbung auch in fünf Tumoren, welche ursprünglich als neuroendokrinen Tumoren (n=1) neuroendokrine Karzinome (n=2) oder Adenokarzinome des Pankreas (n=2) klassifiziert worden waren sowie in einem weiteren Tumor, welcher initial als ein neuroendokrines Karzinom des Pankreas (großzellige Variante) beurteilt worden war. Nach ausgedehnter histologischer Re-Evaluierung durch vier verschiedene Pathologen (Sarah Minner, Guido Sauter, Till Clauditz und Frank Jacobsen) wurden alle diese Tumoren letztlich aber als Azinuszellkarzinome oder gemischte azinäre, neuroendokrine Karzinome umklassifiziert. Histologische Bilder und die Ergebnisse weiterer Immunfärbungen dieser schlussendlich zu Azinuszellkarzinomen umklassifizierten Tumoren sind in Abbildung 7 dargestellt.

Abbildung 7: Morphologische und immunhistochemische Befunde von 6 Tumoren, die in dieser Studie reklassifiziert wurden.

	Example of a „straightforward“ acinar cell carcinoma	Case #1	Case #2 *	Case #3 *	Case #4 **	Case #5	Case #6
Hematoxylin eosin staining							
Chymotrypsin immunostaining							
Synaptophysin immunostaining							
Initial diagnosis	Acinar cell carcinoma	Ductal Adenocarcinoma of the pancreas (G3)	Neuroendocrine Tumor (NET, G3)	Neuroendocrine Carcinoma, large cell variant (NEC, G3)	Neuroendocrine Carcinoma, large cell variant (NEC, G3)	Adenocarcinoma of the pancreas	Neuroendocrine Carcinoma (NEC, G3)
CPA1 immunostaining							
Final diagnosis	Acinar cell carcinoma	Acinar cell carcinoma	probably Acinar cell carcinoma – see comment*	probably Acinar cell carcinoma – see comment*	probably Mixed acinar-endocrine carcinoma (MAEC) – see comment*	Acinar cell carcinoma	Acinar cell carcinoma
*Comment: Case #2 and Case #3 do not fulfill the “classic” criteria for a acinar cell carcinoma, but since they show a strong CPA1 immunostaining we would favour the diagnosis acinar cell carcinoma. **Comment: Case #4 shows the typical morphology of a neuroendocrine carcinoma (large cell variant). Since parts of the tumor show moderate to strong CPA1 staining, we would favour the diagnosis mixed acinar-endocrine carcinoma (MAEC).							

Eine eindeutige tumorale CPA1 Färbung fand sich in keinem der 12 262 evaluierten weiteren Tumoren von 134 verschiedenen Tumortypen und Subtypen (Tabelle 4). Zu den untersuchten Tumoren gehörten auch 128 Azinuszellkarzinome von Speicheldrüsen.

Tabelle 4: CPA1-Immunfärbung in Tumoren (Hinweis: Alle reklassifizierten Fälle sind in dieser Tabelle enthalten. Alle positiven Fälle sind grau unterlegt).

		CPA1 Immunfärbung					
		auf TMA (n)	Analysier- bar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
Tumoren der Haut	Pilomatrixom	35	32	100.0	0.0	0.0	0.0
	Basalzellkarzinom	88	56	100.0	0.0	0.0	0.0
	Benigner Naevus	29	26	100.0	0.0	0.0	0.0
	Plattenepithelkarzinom der Haut	90	82	100.0	0.0	0.0	0.0
	Malignes Melanom	48	44	100.0	0.0	0.0	0.0
	Merkellzellkarzinom	46	44	100.0	0.0	0.0	0.0
Kopf Hals Tumoren	Plattenepithelkarzinom des Larynx	110	96	100.0	0.0	0.0	0.0
	Plattenepithelkarzinom des Pharynx	60	46	100.0	0.0	0.0	0.0

		CPA1 Immunfärbung					
		auf TMA (n)	Analysier- bar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
	Plattenepithelkarzinom des Mundbodens	130	118	100.0	0.0	0.0	0.0
	Pleomorphes Adenom der Glandula parotis	50	44	100.0	0.0	0.0	0.0
	Warthin Tumor der Glandula parotis	104	91	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom, NOS (Papilläres Zystadenokarzinom)	14	12	100.0	0.0	0.0	0.0
	Speicheldrüsengangskarzinom	15	12	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenoid-zystisches Karzinom der Speicheldrüse	181	128	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom NOS der Speicheldrüse	109	69	100.0	0.0	0.0	0.0
	Azinuszellkarzinom der Speicheldrüse	180	99	100.0	0.0	0.0	0.0
	Basalzell-Adenokarzinom der Speicheldrüse	25	21	100.0	0.0	0.0	0.0
	Basalzell-Adenom der Speicheldrüse	101	86	100.0	0.0	0.0	0.0
	Epithelial-myoepitheliales Karzinom der Speicheldrüse	53	51	100.0	0.0	0.0	0.0
	Mukoepidermoid-Karzinom der Speicheldrüse	343	239	100.0	0.0	0.0	0.0
	Myoepitheliales Karzinom der Speicheldrüse	21	20	100.0	0.0	0.0	0.0
	Myoepitheliom der Speicheldrüse	11	9	100.0	0.0	0.0	0.0
	Onkozytäres Karzinom der Speicheldrüse	12	12	100.0	0.0	0.0	0.0
	Polymorphes Adenokarzinom, low grade, der Speicheldrüse	41	32	100.0	0.0	0.0	0.0
	Pleomorphes Adenom der Speicheldrüse	53	32	100.0	0.0	0.0	0.0
Tumoren der Lung, Pleura und Thymus	Adenokarzinom der Lunge	246	160	100.0	0.0	0.0	0.0
	Plattenepithelkarzinom der Lunge	130	65	100.0	0.0	0.0	0.0
	Kleinzelliges Karzinom der Lunge	20	16	100.0	0.0	0.0	0.0
	Mesothelium, epitheloid	39	32	100.0	0.0	0.0	0.0
	Mesothelium, anderer Typ	76	63	100.0	0.0	0.0	0.0
	Thymom	29	29	100.0	0.0	0.0	0.0

		CPA1 Immunfärbung					
		auf TMA (n)	Analysier- bar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
Tumoren des weiblichen Genitaltrakts	Plattenepithelkarzinom der Vagina	78	63	100.0	0.0	0.0	0.0
	Plattenepithelkarzinom der Vulva	130	116	100.0	0.0	0.0	0.0
	Plattenepithelkarzinom der Zervix	130	124	100.0	0.0	0.0	0.0
	Endometrioides Endometriumkarzinom	236	223	100.0	0.0	0.0	0.0
	Seröses Endometriumkarzinom	82	72	100.0	0.0	0.0	0.0
	Karzinoid des Endometriums	48	38	100.0	0.0	0.0	0.0
	Endometriumkarzinom, de-diff/undiff.	13	13	100.0	0.0	0.0	0.0
	Endometriumkarzinom, klarzellig	8	7	100.0	0.0	0.0	0.0
	Endometrioides Ovarialkarzinom	110	91	100.0	0.0	0.0	0.0
	Seröses Ovarialkarzinom	559	462	100.0	0.0	0.0	0.0
	Muzinöses Ovarialkarzinom	96	71	100.0	0.0	0.0	0.0
	Klarzelliges Ovarialkarzinom	50	40	100.0	0.0	0.0	0.0
	Karzinoid der Ovarien	47	38	100.0	0.0	0.0	0.0
	Brennertumor	9	9	100.0	0.0	0.0	0.0
Tumoren der Mamma	Mammakarzinom,kein spezieller Typ (NST)	1391	1185	100.0	0.0	0.0	0.0
	Mammakarzinom, lobulär	294	236	100.0	0.0	0.0	0.0
	Mammakarzinom, medullär	26	26	100.0	0.0	0.0	0.0
	Mammakarzinom, tubulär	27	26	100.0	0.0	0.0	0.0
	Mammakarzinom, muzinös	58	44	100.0	0.0	0.0	0.0
	Phylloider Tumor der Brust	50	47	100.0	0.0	0.0	0.0
Tumoren des Verdauungstraktes	Colonadenom, low grade	50	49	100.0	0.0	0.0	0.0
	Colonadenom, high grade	50	49	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom des Kolons	956	721	100.0	0.0	0.0	0.0

		CPA1 Immunfärbung					
		auf TMA (n)	Analysier- bar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
	Adenokarzinom des Magens, diffuser Typ	226	129	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom des Magens, intestinaler Typ	224	134	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom des Magens, gemischter Typ	62	47	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom des Ösopha- gus	133	60	100.0	0.0	0.0	0.0
	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	124	42	100.0	0.0	0.0	0.0
	Analkanal Plattenepithelkarzi- nom	91	78	100.0	0.0	0.0	0.0
	Cholangiozelluläres Karzinom	114	108	100.0	0.0	0.0	0.0
	Hepatozelluläres Karzinom	50	50	100.0	0.0	0.0	0.0
	Duktales Adenokarzinom des Pankreas	662	449	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom der Papilla vateri	119	75	100.0	0.0	0.0	0.0
	Azinuszellkarzinom des Pan- kreas	11	11	0.0	0.0	18.2	81.8
	Gemischt-azinäres endokrines Pankreaskarzinom	1	1	0.0	0.0	0.0	100.0
	Gastrointestinaler Stromatu- mor (GIST)	50	49	100.0	0.0	0.0	0.0
Tumoren der Harn- wege	Urothelkarzinom pT2-4 G3	1207	613	100.0	0.0	0.0	0.0
	Kleinzelliges Harnblasenkarzi- nom	18	18	100.0	0.0	0.0	0.0
	Urothelkarzinom, sarkomatoid	25	24	100.0	0.0	0.0	0.0
	Nierenzellkarzinom, klarzellig	858	759	100.0	0.0	0.0	0.0
	Nierenzellkarzinom, papillär	255	208	100.0	0.0	0.0	0.0
	Nierenzellkarzinom, klarzellig tubulo-papillär	21	19	100.0	0.0	0.0	0.0
	Nierezellkarzinom, chromo- phob	131	118	100.0	0.0	0.0	0.0
	Onkozytom	177	147	100.0	0.0	0.0	0.0
Tumoren des männli- chen Genitaltrakts	Adenokarzinom der Prostata Gleason 3+3	83	79	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom der Prostata Gleason 4+4	80	73	100.0	0.0	0.0	0.0

		CPA1 Immunfärbung					
		auf TMA (n)	Analysier- bar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
	Adenokarzinom der Prostata Gleason 5+5	85	80	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom der Prostata (Rezidiv nach Therapie)	261	231	100.0	0.0	0.0	0.0
	Kleinzelliges Prostatakarzi- nom	17	16	100.0	0.0	0.0	0.0
	Seminom	621	444	100.0	0.0	0.0	0.0
	Embryonales Karzinom (Ho- den)	50	39	100.0	0.0	0.0	0.0
	Dottersacktumor	50	32	100.0	0.0	0.0	0.0
	Teratom	50	44	100.0	0.0	0.0	0.0
	Plattenepithelkarzinom des Penis	80	66	100.0	0.0	0.0	0.0
Tumoren der endokri- nen Organe	Schilddrüsenadenom	114	108	100.0	0.0	0.0	0.0
	Schilddrüsenkarzinom, pa- pillär	392	361	100.0	0.0	0.0	0.0
	Schilddrüsenkarzinom, folliku- lär	158	147	100.0	0.0	0.0	0.0
	Schilddrüsenkarzinom, medullär	107	100	100.0	0.0	0.0	0.0
	Schilddrüsenkarzinom, ana- plastisch	45	43	100.0	0.0	0.0	0.0
	Nebennieren-Adenom	50	44	100.0	0.0	0.0	0.0
	Nebennieren-Karzinom	26	26	100.0	0.0	0.0	0.0
	Phäochromozytom	50	50	100.0	0.0	0.0	0.0
	Neuroendokriner Tumor (NET) des Appendix	22	12	100.0	0.0	0.0	0.0
	Neuroendokriner Tumor (NET), kolorektal	11	10	100.0	0.0	0.0	0.0
	Neuroendokriner Tumor (NET) des Ileum	49	46	100.0	0.0	0.0	0.0
	Neuroendokriner Tumor (NET) der Lunge	19	17	100.0	0.0	0.0	0.0
	Neuroendokriner Tumor (NET) des Pankreas	98	87	100.0	0.0	0.0	0.0
	Neuroendokrines Karzinom (NEC), kolorektal	12	10	100.0	0.0	0.0	0.0
	Neuroendokrines Karzinom (NEC) der Gallenblase	4	4	100.0	0.0	0.0	0.0

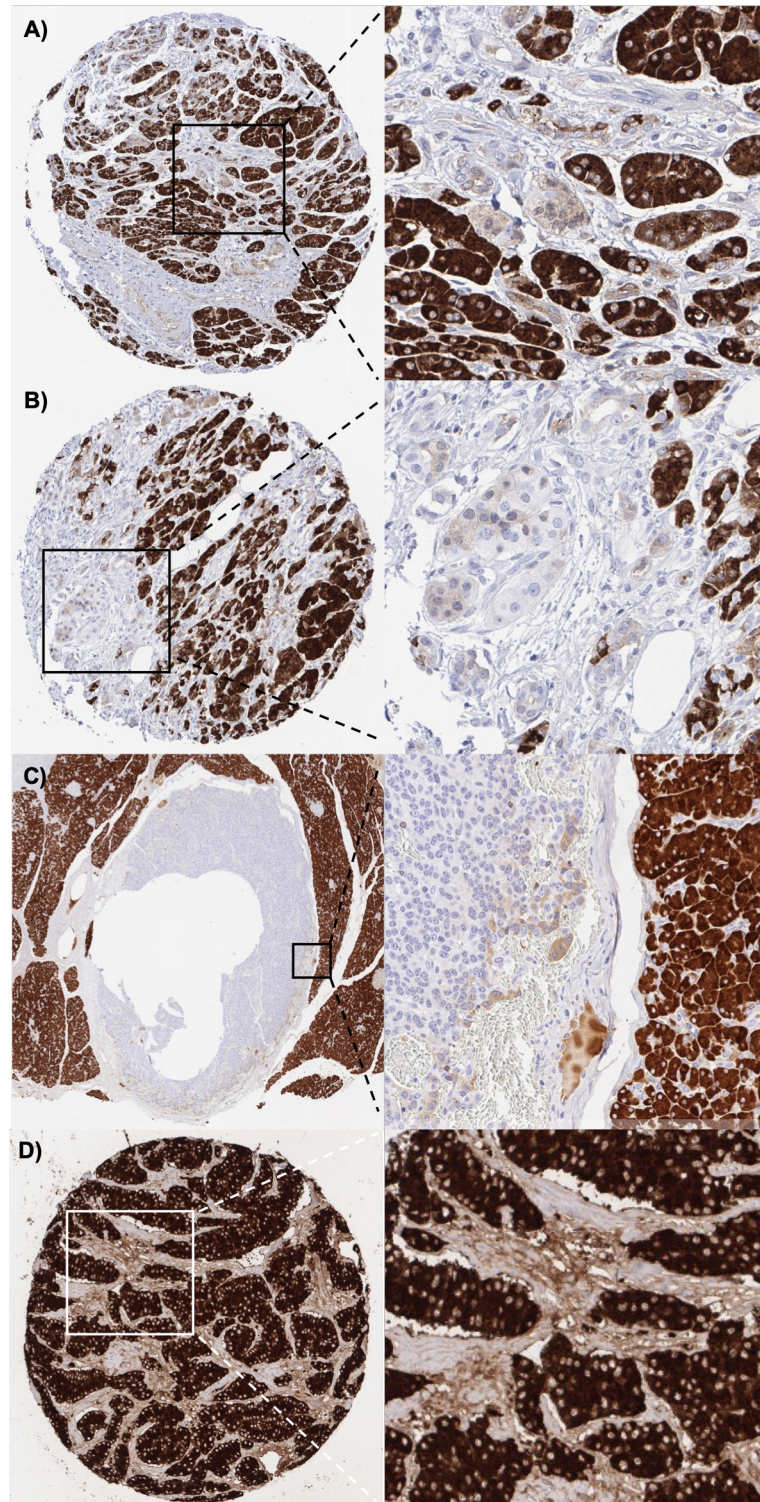
		CPA1 Immunfärbung					
		auf TMA (n)	Analysier- bar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
Tumore des hämato- poetischen und lym- phatischen Gewebes	Neuroendokrines Karzinom (NEC) des Pankreas	14	14	100.0	0.0	0.0	0.0
	Hodgkin-Lymphom	103	76	100.0	0.0	0.0	0.0
	Non Hodgkin-Lymphom	62	54	100.0	0.0	0.0	0.0
	Non Hodgkin-Lymphom, B- CLL	50	30	100.0	0.0	0.0	0.0
	Non Hodgkin-Lymphom, DLCL	114	94	100.0	0.0	0.0	0.0
	Non Hodgkin-Lymphom, Folli- kulär	88	63	100.0	0.0	0.0	0.0
	Non Hodgkin-Lymphom, T- Zell	24	16	100.0	0.0	0.0	0.0
	Mantelzelllymphom	18	13	100.0	0.0	0.0	0.0
	Marginalzonenlymphom	16	10	100.0	0.0	0.0	0.0
	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom (DLCL), Hoden	16	13	100.0	0.0	0.0	0.0
	Burkitt Lymphom	5	1	100.0	0.0	0.0	0.0
Tumore der Weichteile und Knochen	Riesenzell-Sehnenscheiden Tumor	45	44	100.0	0.0	0.0	0.0
	Granularzelltumor	53	44	100.0	0.0	0.0	0.0
	Leiomyom	50	48	100.0	0.0	0.0	0.0
	Leiomyosarkom	87	84	100.0	0.0	0.0	0.0
	Liposarkom	132	129	100.0	0.0	0.0	0.0
	Maligner peripherer Nerven- scheidentumor (MPNST)	13	11	100.0	0.0	0.0	0.0
	Myofibrosarkom	26	26	100.0	0.0	0.0	0.0
	Angiosarkom	73	66	100.0	0.0	0.0	0.0
	Angiomyolipom	91	91	100.0	0.0	0.0	0.0
	Dermatofibrosarcoma protu- berans	21	18	100.0	0.0	0.0	0.0
	Ganglioneurom	14	13	100.0	0.0	0.0	0.0
	Kaposi Sarkom	8	6	100.0	0.0	0.0	0.0

		CPA1 Immunfärbung					
		auf TMA (n)	Analysier- bar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
	Neurofibrom	117	96	100.0	0.0	0.0	0.0
	Sarkom, NOS (not otherwise specified)	75	59	100.0	0.0	0.0	0.0
	Paragangliom	41	37	100.0	0.0	0.0	0.0
	Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)	23	18	100.0	0.0	0.0	0.0
	Rhabdomyosarkom	7	7	100.0	0.0	0.0	0.0
	Schwannom	121	106	100.0	0.0	0.0	0.0
	Synovialsarkom	12	11	100.0	0.0	0.0	0.0
	Osteosarkom	43	35	100.0	0.0	0.0	0.0
	Chondrosarkom	38	17	100.0	0.0	0.0	0.0

4.4 CPA1 Heterogenität in Azinuszellkarzinomen

Zur Klärung der Frage, ob möglicherweise eine fokale CPA1 Expression auch in nicht-azinären Prostatatumoren vorkommen könnte, wurden Großschnitte von 17 duktalem Adenokarzinomen und 20 neuroendokrinen Tumoren des Pankreas zusammen mit einem Heterogenitäts-TMA mit Proben von duktalem Pankreaskarzinomen untersucht. Der Heterogenitäts-TMA beinhaltete je 6 von mehreren verschiedenen Blöcken entnommene Gewebeproben von 224 duktalem Adenokarzinomen des Pankreas. In diesem Heterogenitäts-TMA waren bei 219 von 224 Primärtumoren mindestens 2 von 6 Proben auswertbar, wobei mindestens drei Spots in 206, mindestens vier in 182, mindestens fünf in 134 und alle sechs von 56 Primärtumoren auswertbar waren. Die Zahl auswertbarer Proben reichte von null bis sechs bei Primärtumoren und von null bis drei bei Metastasen. Eine kräftige CPA1 Färbung (aller Proben des entsprechenden Tumors) fand sich im Heterogenitäts-TMA nur in einem Fall eines Azinuszellkarzinoms, welches vorher fälschlicherweise als duktales Adenokarzinom des Pankreas interpretiert worden war. Alle anderen 224 Tumoren zeigten keinerlei CPA1 Anfärbung von Tumorzellen. Es fand sich aber in mehreren Proben eine schwache oder mäßiggradige Anfärbung von Stroma oder auch Tumorzellen in Umgebung von stark CPA1 positiven Pankreasgewebe (Abbildung 8).

Abbildung 8: Beispiele für artifizielle Anfärbung von Gewebestrukturen in der Umgebung von stark CPA1-exprimierenden Zellen. A-B) Schwach angefärbte Zellen von Adenokarzinomen neben stark positivem Pankreas-Normalgewebe. C) Ein CPA1-negativer neuroendokriner Tumor mit einigen „positiven“ Tumorzellen in der Nähe des normalen Pankreasgewebes. D) Starke Anfärbung des Stromas zwischen den Zellen eines Azinuszellkarzinoms.



5 Diskussion

Die Daten dieser Studie zeigen eine nahezu perfekte Sensitivität und Spezifität der CPA1 Immunhistochemie für den Nachweis von Azinuszellkarzinomen des Pankreas.

Angesichts der Größe der durchgeführten Studie war es von zentraler Bedeutung, mit perfekt validierten Antikörpern zu arbeiten. Da die Zielstrukturen der Antikörper, die Proteine, durch die Formalinfixierung in ihrer Struktur verändert werden, ist die Zugänglichkeit der einzelnen Epitope oftmals behindert. Die Validierungsprozesse kommerziell erhältlicher Antikörper beinhalten in der Regel allerdings ausschließlich Untersuchungen an nativen Proteinen, entweder durch ELISA, Western Blot, oder Protein Mikroarrays. Ein Antikörper, der sein Zielprotein an unfixiertem Gewebe spezifisch und sensitiv erkennt, ist deswegen nicht automatisch auch an formalinfixiertem Gewebe anwendbar. Die internationale Arbeitsgruppe für Antikörpervalidierung (international working group for antibody validation, IWGAV) hat deswegen vorgeschlagen, dass die Validierung von Antikörpern, welche an formalinfixiertem Gewebe zur Anwendung kommen sollen, mindestens eines von zwei möglichen Verfahren umfasst. Diese Methoden beinhalten entweder den Vergleich mit einer anderen Methode zur Expressionsmessung, oder aber der Vergleich mit Färberegebnissen, welche mit einem zweiten, unabhängigen Antikörper erzielt werden. Für CPA1 erwies sich die Antikörpervalidierung als besonders einfach, denn drei unabhängige RNA Screeningstudien einschließlich des Phantom 5 Projekts^{19, 20}, des „Genotype Tissue Expression Projects (GTEx)“²¹ und des „The Cancer Genome Atlas (TCGA)“ - zusammengefasst in der Datenbank des Human Protein Atlas²² - zeigen übereinstimmend, dass CPA1 ausschließlich in Pankreasgewebe vorkommt. Die komplette Spezifität für Pankreasgewebe entspricht exakt den Befunden unserer immunhistochemischen Untersuchung von Normalgewebe. Unsere immunhistochemischen Daten machen zudem deutlich, dass die CPA1-Positivität im Wesentlichen den Azinuszellen des Pankreas zuzuordnen ist, während die anderen Strukturen, wie Pankreasgänge oder Zellen der Langerhans-Inseln, keine eindeutige CPA1 Positivität aufweisen. Die Limitierung der CPA1 Expression auf azinäre Pankreaszellen passt auch gut zur Funktion von CPA1, denn das Protein gehört zu den wichtigsten sekretorischen Enzymen des Pankreas. Die komplette Limitierung der immunhistochemisch nachweisbaren CPA1 Expression auf pankreatische Azinuszellen signalisiert, dass die CPA1 Expression im menschlichen Körper tatsächlich auf diesen Zelltyp beschränkt ist. Es ist zwar anzumerken, dass das Fehlen einer messbaren Expression von CPA1-RNA in allen extrapankreatischen Organen die Expression des Gens in kleinen Subpopulationen oder in geringer Menge nicht komplett ausschließt. Da die RNA-Untersuchung von Organen immer eine gleichzeitige Analyse sämtlicher Gewebe- und Zelltypen eines Organs umfasst, können kleine Subpopulationen bei RNA-Untersuchungen in dem Gemisch aller Zelltypen dem Nachweis entgehen. Die ungewöhnlich umfassende Normalgewebsanalyse unserer Studie (76 verschiedene Normalgewebeskategorien wurden untersucht) ergab allerdings keinerlei Hinweise auf die Expression von CPA1 in einer kleinen Subpopulation von 75 untersuchten extra pankreatischen Normalgewebstypen. Das völlige Fehlen von positiven Färbereaktionen in all diesen Organen erbringt auch eine hohe Evidenz für das Fehlen von Kreuzreaktivitäten unseres Antikörpers MSVA-601M. Es ist hervorzuheben, dass die Untersuchung von allen bei adulten Menschen vorkommenden Gewebetypen sicherstellt, dass praktisch alle Proteine des menschlichen Körpers in die Spezifitätsuntersuchung mit eingingen, sodass eine ungewöhnlich hohe Chance besteht, dass Proteine, mit denen unser Antikörper Kreuzreagieren

könnte, in der Untersuchung auch enthalten waren. Die klassische Validierung von Antikörpern erfolgt an KO (knock out)-Zelllinien, wobei Zelllinien vor und nach dem künstlichen Ausknocken des Zielproteins mit dem Antikörper untersucht werden. Das gewünschte Ziel dieses Validierungsexperimentes ist eine sichtbare Western Blot Bande vor dem „Ausknocken“ und der Verlust dieser Western Blot Bande nach dem „Ausknocken“ des Proteins. Während dieses Validierungsverfahren die Bindung eines validierten Antikörpers an sein Zielprotein beweist, werden unerwünschte Kreuzreaktionen des Antikörpers aber in keiner Weise ausgeschlossen, da die verwendete KO-Zelllinie nur einen einzigen Zelltyp abbildet und damit naturgemäß nicht alle im menschlichen Körper vorkommenden Proteine beinhaltet.

In unserer Untersuchung wurden 12,274 menschliche Tumoren von 134 verschiedenen Tumortypen und Subtypen erfolgreich untersucht. Die sehr große Zahl erfolgreich untersuchter Tumoren wurde ermöglicht durch die Anwendung der TMA-Technik und die erheblichen Vorarbeiten, die in früheren Jahren von Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts sowie zahlreichen Doktoranden erbracht wurden. Naturgemäß wäre es einer Einzelperson nicht möglich, eine Kohorte von mehr als 10.000 Tumoren immunohistochemisch zu untersuchen. Zu den Vorteilen des TMA-Verfahrens gehört, neben der hohen Geschwindigkeit und niedrigen Kosten pro durchgeführter Studien, vor allem das hohe Ausmaß der Standardisierung, welches auch die pro Tumor evaluierte Gewebemenge beinhaltet. Die standardisierte, aber kleine Menge an pro Patienten untersuchtem Tumormaterial (Durchmesser 0,6 Millimeter) hatte zu Diskussionen geführt, inwieweit TMA-Untersuchungen zu Ergebnissen ergeben können, welche für die einzelnen Tumore repräsentativ sind ¹⁸. Tatsächlich haben TMA-Studien in der Vergangenheit aber sämtliche bekannten Assoziationen zwischen molekularen Parametern und den klinischen Verlauf von Tumorerkrankungen bestätigt. So wurden bei Mammakarzinomen die prognostische Relevanz des Ki-67-Labeling Index ²³ der HER2 Amplifikation ^{23, 24}, der Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptor ²³, und den Amplifikationen von MYC, MDM2 oder CyclinD1 ²³ in TMA-Studien bestätigt. Beim Harnblasenkarzinom wurde eine prognostische Bedeutung von p53, Ki67-Labeling Index und sogar einem morphologischen Grading am TMA validiert ^{25, 26}. Beim Prostatakarzinom wurde die prognostische Bedeutung des Ki-67-Labeling Index sowie von PTEN-Deletion oder p53-Alterationen am TMA validiert ^{25, 26}. Darüber hinaus wurden zahlreiche neue molekulare Prognoseparameter für das Prostatakarzinom durch die UKE-Arbeitsgruppe an TMAs identifiziert ²⁷⁻³⁶. Nur eine einzige Studie hatte in der Vergangenheit die Nützlichkeit von klassischen traditionellen Großschnitten und TMAs für die Identifikation von Prognosemarker vergleichend an einem großen Patientenkollektiv untersucht. Dabei hatten Torhorst et al. ¹⁸ an mehr als 500 Mammakarzinomen die Expression von ER, PR und p53 sowohl an vier verschiedenen TMAs als auch an Großschnitten der Spenderblöcke für diese TMAs vergleichend untersucht. Für ER und PR fanden sich zwar leicht höhere Positivitätsraten in Großschnitten als an TMAs, aber für alle Daten einen hochsignifikanten Zusammenhang mit der Patientenprognose. Für p53 ergab sich ein anderes Bild. Hier war die Positivität in vier verschiedenen TMAs von 15,2%, 19,5%, 20,9% und 40,1% an Großschnitten aber 42,8%. Da aber nur die TMA ($p=0,001$) aber nicht die Großschnittdaten für p53 mit der Patientenprognose assoziiert waren, folgerten die Autoren, dass an Großschnitten fokale und biologisch irrelevante, möglicherweise artifizielle Befunde zur Identifikation von biologisch irrelevanten p53 Anfärbungen geführt hatten. Somit spricht die Gesamtheit der vorliegenden Literatur dafür, dass prognostisch relevanten Befunde, möglicherweise wegen der Standardisierung der untersuchten Gewebemenge, an TMAs besser identifiziert werden können als an Großschnitten.

Hervorzuheben ist, dass auch normale Großschnitte von Tumoren nur einen sehr kleinen Volumenanteil eines gesamten Tumors zur Untersuchung bringen, sodass auch bei einer Großschnitt-Untersuchung immer eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass kleine Herde mit molekularen Veränderungen nicht identifiziert werden. Bemerkenswert ist auch, dass Gewebesspots von 0,6 mm Durchmesser eine Tumormenge zur Untersuchung bringen, welche der in kleinen Biopsien untersuchbaren Tumormenge ähnelt.

Die immunohistochemische Untersuchung unserer 12,274 Tumoren ergab ein ähnliches „schwarz-weiß“ Bild wie bei der Normalgewebeanalyse und identifizierte 12 stark positive Karzinome und 12,262 komplett negative Tumoren. Es ist bemerkenswert, dass sechs der 12 CPA1 positiven Karzinome ursprünglich nicht als Azinuszellkarzinome des Pankreas klassifiziert worden waren. Basierend auf der hochgradigen CPA1 Expression in normalen Azinuszellen des Pankreas, der absoluten Spezifität unseres Assays für normale Azinuszellen des Pankreas und der Tatsache, dass alle CPA1 positive Tumoren sowohl primäre Neoplasien des Pankreas waren und eine hochgradige CPA1 Positivität zeigten, fühlten wir uns gezwungen die initialen Diagnosen dieser CPA1 positiven Pankreastumoren zu überprüfen. Die Reanalyse ergab für drei dieser sechs Tumoren, Fall 1, 5 und 6, eine eindeutige Reklassifikation zu einem Azinuszellkarzinom, da die Tumoren neben der CPA1 Positivität auch zumindest einige der klassischen Kriterien für die Diagnose eines Azinuszellkarzinoms aufwiesen. Zwei Tumoren (Fall 2 und 3) wurden klassifiziert als „sehr wahrscheinlich Azinuszellkarzinom“, da diese Tumoren neben der starken CPA1 Positivität keines der klassischen histomorphologischen Kriterien eines Azinuszellkarzinoms zeigten und keine oder nur eine fokale schwache Chymotrypsin Positivität aber eine fokale Synaptophysin Färbung aufwiesen. Ein Tumor (Fall 4), welcher initial als neuroendokrines Karzinom (großzellige Variante) klassifiziert worden war, wurde neu zu einem gemischten Azinuszellkarzinom/neuroendokrinen Karzinom klassifiziert, da zwar Anteile des Tumors die typische Morphologie eines neuroendokrinen Karzinoms aber andere eine mäßig-starke bis starke CPA1 Färbung und eine weniger eindeutige Morphologie aufwiesen. Die morphologischen und immunhistologischen Ergebnisse der reklassifizierten Tumoren sind in Abbildung 7 dargestellt. Eine Reklassifikation einer größeren Zahl von Pankreastumoren zu einem Azinuszellkarzinom ist nicht überraschend, da Azinuszellkarzinome des Pankreas bekannterweise stark divergierende morphologische Muster aufweisen. Dass 5 von 11 Azinuszellkarzinomen und ein gemischtes azinäres endokrines Karzinom ursprünglich von den beurteilenden Pathologen nicht korrekt diagnostiziert worden waren, reflektiert somit die bekannten Schwierigkeiten bei der korrekten Erkennung der seltenen pankreatischen Azinuszellkarzinome. Selbst Experten der gastrointestinalen Pathologie sehen diese Tumorentität nur selten. In einer retrospektiven Studie des Instituts für Pathologie am Johns Hopkins waren in 18 Jahren nur 14 pankreatische Azinuszellkarzinome diagnostiziert worden ³⁷. Auch andere Autoren hatten die Schwierigkeiten bei der Erkennung pankreatischer Azinuszellkarzinome beschrieben. In einer Studie von Basturk et al ³⁸ waren 17 von 107 pankreatischen Azinuszellkarzinom initial als wenig differenzierte neuroendokrinen Karzinomen beurteilt worden und erst nachträglich als Azinuszellkarzinome oder gemischte azinäre neuroendokrinen Karzinomen erkannt.

Unsere Daten suggerieren, dass die CPA1 Immunohistochemie bei neu diagnostizierten pankreatischen Tumoren mit nicht eindeutiger Morphologie breit zur Anwendung kommen sollte, um die Wahrscheinlichkeit von klinisch relevanten diagnostischen Fehlklassifikationen von Pankreas Neoplasien zu verhindern. Die hohe

Sensitivität der CPA1 Immunohistochemie für den Nachweis von Azinuszellkarzinom passt zu den Daten einer kürzlichen Studie, bei welcher ein anderer CPA1 Antikörper an einem Kollektiv von Pankreastumoren zum Einsatz kam. Said et al. ¹⁶ beschrieben eine starke diffuse CPA1 Positivität in allen 14 untersuchten Azinuszellkarzinomen und in allen fünf untersuchten Fällen von gemischten Azinuszellkarzinom/neuroendokrinen Karzinomen des Pankreas. Allerdings fanden Said et al. eine CPA1 Positivität auch in zwei von 20 dukталen Adenokarzinomen, 10 von 20 neuroendokrinen Tumoren, 2 von 20 muzinöszystischen Neoplasien und in einem von 20 soliden pseudopapillären Tumoren. Die Autoren beschrieben aber eine 95-prozentige Spezifität ihrer CPA1 Färbung für Azinuszellkarzinome, wenn nur flächenhafte und diffuse Färbungen als CPA1 positiv bewertet wurden ¹⁶.

Obwohl es nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine CPA1 Positivität in nicht-Azinuszellkarzinomen des Pankreas auch diagnostische Grenzfälle betreffen könnte, scheint es wahrscheinlicher, dass Unterschiede im Färbeverhalten der Antikörper und der verwendeten Färbeprotokolle für die Differenzen zwischen unserer Studie und den Daten von Said et al verantwortlich sind ¹⁶.

Die Reklassifizierung von 6 von 12 unserer Azinuszellkarzinome des Pankreas könnte als eine Schwäche unserer Studie interpretiert werden, da die Umklassifizierung offensichtlich einen Einfluss auf die rechnerische Spezifität unseres CPA1 Assays ausübte. Allerdings veränderte sich die Spezifität der CPA1 Immunfärbung für die Azinuszellkarzinome durch die Reklassifikation „nur“ marginal von 99,5 auf 100%. Auch die Sensitivität von 100% für den Nachweis von Azinuszellkarzinomen ist durch die Reklassifikation nicht tangiert.

Die Untersuchung von Großschnitten von 20 neuroendokrinen Tumoren und 17 dukталen Adenokarzinomen und die Analyse eines Pankreas-Adenokarzinom-Heterogenitäts-TMAs (gebildet aus bis zu neun Gewebeproben von 224 Pankreaskarzinomen) ergaben keinerlei Anhaltspunkte für eine fokale CPA1 Expression in nicht-Azinuszellkarzinomen des Pankreas. Allerdings fand sich in einigen dieser Präparate fokal eine schwache CPA1 Anfärbung von nicht- Azinuszellkarzinomen, wobei die „positiven“ Tumorareale in unmittelbarer Nachbarschaft zu stark CPA1 positiven normalen Azinuszellen lagen. Wir interpretieren diese Befunde als Diffusions- oder Kontaminationsartefakte, welche durch einen Influx von CPA1 Protein aus physiologischerweise CPA1 exprimierenden normalen Azinuszellen in das umliegende nicht-CPA1 exprimierende Gewebe bedingt sind. Angesichts der sehr hohen Menge von CPA1 Proteine in normalen Azinuszellen wäre es möglich, dass ein gewisser Proteinausfluss in das umgebende Gewebe bereits in vivo physiologisch erfolgt. Alternativ wäre es denkbar, dass ein geringer Ausfluss von physiologischem CPA1 Protein durch eine hypoxische Gewebeschädigung im Rahmen der intraoperativen oder postoperativen Ischämie des entnommenen Pankreasgewebes erfolgte, also vor dem Einsetzen einer gewebestabilisierenden Formalinfixation. Unabhängig von der Ursache für das Auftreten einer ungewollten Färbung in der unmittelbaren Umgebung von physiologischerweise sehr stark immunhistochemisch positiven Zellen ist dies ein Phänomen, was nicht nur für CPA1 im Pankreas, sondern auch bei anderen Proteinen und in anderen Organen vorkommt. Beispielsweise führt die Thyreoglobulin Anfärbung von Schilddrüsenpräparaten auch regelmäßig zu positiven Färbereaktionen von nicht-Thyreoglobulin exprimierenden Neoplasien innerhalb der Schilddrüse wie beispielsweise von medullären Karzinomen oder gar Lymphomen ³⁹.

Zusammengefasst zeigen die Daten unserer Studie eine außerordentliche Spezifität der CPA1-Immunfärbung für normale und neoplastische Azinuszellen des Pankreas. Aus diesem Grund postulieren wir, dass die CPA1 Immunhistochemie eine Routineprozedur für die Evaluation von Pankreastumoren mit nicht ganz eindeutiger Morphologie darstellen sollte. Unsere Daten zeigen auch die außerordentliche Nützlichkeit von großen Gewebescreening Untersuchungen für die Klärung der Spezifität und diagnostischen Nützlichkeit von Antikörpern.

6 Zusammenfassung

Carboxypeptidase A1 (CPA1) ist eine Zink-Metalloprotease, die in den Azinuszellen des Pankreas produziert wird und eine Rolle bei der Spaltung von Aminosäuren aus Nahrungsproteinen spielt. In dieser Studie wurde der Nutzen der immunhistochemischen CPA1-Färbung für die Diagnose des Azinuszellkarzinoms des Pankreas untersucht. Insgesamt wurden 15.680 Tumorproben von 132 verschiedenen Tumorarten und -subtypen sowie jeweils 8 Proben von 76 verschiedenen Normalgewebetypen mittels Immunhistochemie in einem Tissue-Mikroarray-Format analysiert. CPA1 wurde in den Azinuszellen aller normalen Pankreasproben stark exprimiert, jedoch nicht in anderen normalen Geweben. Eine CPA1-Immunfärbung wurde in 100% von 11 Azinuszellkarzinomen des Pankreas und einem gemischt azinär-endokrinen Karzinom (MAEC) nachgewiesen, jedoch nicht in 449 duktalem Adenokarzinomen des Pankreas, 75 Adenokarzinomen der Ampulla Vateri und 11.739 anderen Tumoren aus 128 verschiedenen extrapankreatischen Tumorentitäten. Eine schwache bis mäßige, diffuse Färbung von Epithel- und Stromazellen des Krebsgewebes in unmittelbarer Nachbarschaft zu nicht-neoplastischen Azinuszellen des Pankreas trat häufig auf und wurde als Ursache für die Diffusion des sehr reichlich vorhandenen CPA1 aus normalen Azinuszellen angesehen, die möglicherweise eine autolytische Zellschädigung erlitten hatten. Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass CPA1 ein hochempfindlicher und weitgehend spezifischer Marker für normale und neoplastische Azinuszellen des Pankreas ist. Die CPA1-Immunhistochemie erleichtert die sonst oft schwierige Diagnose des Pankreas-Azinuszellkarzinoms erheblich.

7 Summary

Carboxypeptidase A1 (CPA1) is a zinc metalloprotease which is produced in pancreatic acinar cells and plays a role in cleaving C-terminal branched-chain and aromatic amino acids from dietary proteins. This study assessed the utility of immunohistochemical CPA1 staining for diagnosing pancreatic acinar cell carcinoma. A total of 15,680 tumor samples from 132 different tumor types and subtypes as well as 8 samples each of 76 different normal tissue types were analyzed by immunohistochemistry in a tissue microarray format. CPA1 was strongly expressed in acinar cells of all normal pancreas samples but not in any other normal tissues. CPA1 immunostaining was detected in 100% of 11 pancreatic acinar cell carcinomas and one mixed acinar endocrine carcinoma (MAEC), but absent in 449 pancreatic ductal adenocarcinomas, 75 adenocarcinomas of the ampulla Vateri, and 11,739 other evaluable cancers from 128 different tumor entities. A weak to moderate diffuse staining of epithelial and stromal cells of cancer tissues immediately adjacent to non-neoplastic pancreatic acinar cells often occurred and was considered to be caused by diffusion of the highly abundant CPA1 from normal acinar cells that may have suffered some autolytic cell damage. In conclusion, our data show that CPA1 is a highly sensitive and largely specific marker for normal and neoplastic pancreatic acinar cells. CPA1 immunohistochemistry greatly facilitates the otherwise often difficult diagnosis of pancreatic acinar cell carcinoma.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Niger M, Prisciandaro M, Antista M, Monica MAT, Cattaneo L, Prinzi N, Manglaviti S, Nichetti F, Brambilla M, Torchio M, Corti F, Pusceddu S, Coppa J, Mazzaferro V, de Braud F, Di Bartolomeo M: One size does not fit all for pancreatic cancers: A review on rare histologies and therapeutic approaches. *World J Gastrointest Oncol* 2020, 12:833-49.
- [2] Klimstra DS, Adsay V: Acinar neoplasms of the pancreas-A summary of 25 years of research. *Semin Diagn Pathol* 2016, 33:307-18.
- [3] Pokrzywa CJ, Abbott DE, Matkowskyj KA, Ronnekleiv-Kelly SM, Winslow ER, Weber SM, Fisher AV: Natural History and Treatment Trends in Pancreatic Cancer Subtypes. *J Gastrointest Surg* 2019, 23:768-78.
- [4] Luo Y, Hu G, Ma Y, Guo N, Li F: Acinar cell carcinoma of the pancreas presenting as diffuse pancreatic enlargement: Two case reports and literature review. *Medicine (Baltimore)* 2017, 96:e7904.
- [5] Lowery MA, Klimstra DS, Shia J, Yu KH, Allen PJ, Brennan MF, O'Reilly EM: Acinar cell carcinoma of the pancreas: new genetic and treatment insights into a rare malignancy. *Oncologist* 2011, 16:1714-20.
- [6] Sigel CS, Klimstra DS: Cytomorphologic and immunophenotypical features of acinar cell neoplasms of the pancreas. *Cancer Cytopathol* 2013, 121:459-70.
- [7] La Rosa S, Adsay V, Albarello L, Asioli S, Casnelli S, Franzi F, Marando A, Notohara K, Sessa F, Vanoli A, Zhang L, Capella C: Clinicopathologic study of 62 acinar cell carcinomas of the pancreas: insights into the morphology and immunophenotype and search for prognostic markers. *Am J Surg Pathol* 2012, 36:1782-95.
- [8] Zernig G, Moshhammer T, Glossmann H: Phosphatidylinositol turnover as a functional probe for neuronal Ca²⁺ channels. *Prog Clin Biol Res* 1988, 252:41-5.
- [9] Chaudhary P: Acinar Cell Carcinoma of the Pancreas: A Literature Review and Update. *Indian J Surg* 2015, 77:226-31.
- [10] Mustafa S, Hruban RH, Ali SZ: Acinar cell carcinoma of the pancreas: a clinicopathologic and cytomorphologic review. *J Am Soc Cytopathol* 2020, 9:586-95.
- [11] Thompson ED, Wood LD: Pancreatic Neoplasms With Acinar Differentiation: A Review of Pathologic and Molecular Features. *Arch Pathol Lab Med* 2020, 144:808-15.
- [12] Quijcho FA, Lipscomb WN: Carboxypeptidase A: a protein and an enzyme. *Adv Protein Chem* 1971, 25:1-78.
- [13] Hegyi E, Sahin-Toth M: Human CPA1 mutation causes digestive enzyme misfolding and chronic pancreatitis in mice. *Gut* 2019, 68:301-12.
- [14] Witt H, Beer S, Rosendahl J, Chen JM, Chandak GR, Masamune A, Bence M, Szmola R, Oracz G, Macek M, Jr., Bhatia E, Steigenberger S, Lasher D, Buhler F, Delaporte C, Tebbing J, Ludwig M, Pilsak C, Saum K, Bugert P, Masson E, Paliwal S, Bhaskar S, Sobczynska-Tomaszewska A, Bak D, Balascak I, Choudhuri G, Nageshwar Reddy D, Rao GV, Thomas V, Kume K, Nakano E, Kakuta Y, Shimosegawa T, Durko L, Szabo A, Schnur A, Hegyi P, Rakonczay Z, Jr., Pfutzer R, Schneider A, Groneberg DA, Braun M, Schmidt H, Witt U, Friess H, Algul H, Landt O, Schuelke M, Kruger R, Wiedenmann B, Schmidt F, Zimmer KP, Kovacs P, Stumvoll M, Bluher M, Muller T, Janecke A, Teich N, Grutzmann R, Schulz HU, Mossner J, Keim V, Lohr M, Ferec C, Sahin-Toth M: Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2013, 45:1216-20.
- [15] Kemik O, Kemik AS, Sumer A, Begenik H, Dulger AC, Purisa S, Tuzun S: Serum procarboxypeptidase A and carboxypeptidase A levels in pancreatic disease. *Hum Exp Toxicol* 2012, 31:447-51.
- [16] Said S, Kurtin PJ, Nasr SH, Graham RP, Dasari S, Vrana JA, Yasir S, Torbenson MS, Zhang L, Mounajjed T, Eric Chen ZM, Lee HE, Wu TT: Carboxypeptidase A1 and regenerating islet-derived 1alpha as new markers for pancreatic acinar cell carcinoma. *Hum Pathol* 2020, 103:120-6.

- [17] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP: Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998, 4:844-7.
- [18] Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Kochli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G: Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 2001, 159:2249-56.
- [19] Lizio M, Abugessaisa I, Noguchi S, Kondo A, Hasegawa A, Hon CC, de Hoon M, Severin J, Oki S, Hayashizaki Y, Carninci P, Kasukawa T, Kawaji H: Update of the FANTOM web resource: expansion to provide additional transcriptome atlases. *Nucleic Acids Res* 2019, 47:D752-D8.
- [20] Lizio M, Harshbarger J, Shimoji H, Severin J, Kasukawa T, Sahin S, Abugessaisa I, Fukuda S, Hori F, Ishikawa-Kato S, Mungall CJ, Arner E, Baillie JK, Bertin N, Bono H, de Hoon M, Diehl AD, Dimont E, Freeman TC, Fujieda K, Hide W, Kaliyaperumal R, Katayama T, Lassmann T, Meehan TF, Nishikata K, Ono H, Rehli M, Sandelin A, Schultes EA, t Hoen PA, Tatum Z, Thompson M, Toyoda T, Wright DW, Daub CO, Itoh M, Carninci P, Hayashizaki Y, Forrest AR, Kawaji H, consortium F: Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas. *Genome Biol* 2015, 16:22.
- [21] Consortium GT: The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet* 2013, 45:580-5.
- [22] Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Ponten F: Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015, 347:1260419.
- [23] Ruiz C, Seibt S, Al Kuraya K, Siraj AK, Mirlacher M, Schraml P, Maurer R, Spichtin H, Torhorst J, Popovska S, Simon R, Sauter G: Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *Int J Cancer* 2006, 118:2190-4.
- [24] Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, Tapia C, Zaharieva B, Novotny H, Spichtin H, Maurer R, Mirlacher M, Kochli O, Zuber M, Dieterich H, Mross F, Wilber K, Simon R, Sauter G: Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res* 2004, 64:8534-40.
- [25] Nocito A, Bubendorf L, Tinner EM, Suess K, Wagner U, Forster T, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knonagel H, Rist M, Anabitarte M, Hering F, Hardmeier T, Schoenenberger AJ, Flury R, Jager P, Fehr JL, Schraml P, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G: Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol* 2001, 194:349-57.
- [26] Moch H, Sauter G, Mihatsch MJ, Gudat F, Epper R, Waldman FM: p53 but not erbB-2 expression is associated with rapid tumor proliferation in urinary bladder cancer. *Hum Pathol* 1994, 25:1346-51.
- [27] Marx A, Koopmann L, Hoflmayer D, Buscheck F, Hube-Magg C, Steurer S, Eichenauer T, Clauditz TS, Wilczak W, Simon R, Sauter G, Izbicki JR, Huland H, Heinzer H, Graefen M, Haese A, Schlomm T, Bernreuther C, Lebok P, Bonk S: Reduced anoctamin 7 (ANO7) expression is a strong and independent predictor of poor prognosis in prostate cancer. *Cancer Biol Med* 2021, 18:245-55.
- [28] Freytag M, Kluth M, Bady E, Hube-Magg C, Makrypidi-Fraune G, Heinzer H, Hoflmayer D, Weidemann S, Uhlig R, Huland H, Graefen M, Bernreuther C, Wittmer C, Tsourlakis MC, Minner S, Dum D, Hinsch A, Luebke AM, Simon R, Sauter G, Schlomm T, Moller K: Epithelial splicing regulatory protein 1 and 2 (ESRP1 and ESRP2) upregulation predicts poor prognosis in prostate cancer. *BMC Cancer* 2020, 20:1220.
- [29] Kind S, Kluth M, Hube-Magg C, Moller K, Makrypidi-Fraune G, Lutz F, Lennartz M, Rico SD, Schlomm T, Heinzer H, Hoflmayer D, Weidemann S, Uhlig R, Huland H, Graefen M, Bernreuther C, Tsourlakis MC, Minner S, Dum D, Hinsch A, Lubke AM, Simon R, Sauter G, Marx A, Polonski A: Increased Cytoplasmic CD138 Expression Is Associated with Aggressive Characteristics in Prostate Cancer and Is an Independent Predictor for Biochemical Recurrence. *Biomed Res Int* 2020, 2020:5845374.
- [30] Bernreuther C, Daghigh F, Moller K, Hube-Magg C, Lennartz M, Lutz F, Rico SD, Fraune C, Dum D, Luebke AM, Eichenauer T, Moller-Koop C, Schlomm T, Wittmer C, Huland H, Heinzer H, Graefen M, Haese A, Burandt E, Tsourlakis MC, Clauditz TS, Hoflmayer D, Izbicki JR, Simon R, Sauter G, Minner S, Steurer S,

Meiners J: Secreted Frizzled-Related Protein 4 (SFRP4) Is an Independent Prognostic Marker in Prostate Cancers Lacking TMPRSS2: ERG Fusions. *Pathol Oncol Res* 2020, 26:2709-22.

[31] Bonk S, Kluth M, Jansen K, Hube-Magg C, Makrypidi-Fraune G, Hoflmayer D, Weidemann S, Moller K, Uhlig R, Buscheck F, Luebke AM, Burandt E, Clauditz TS, Steurer S, Schlomm T, Huland H, Heinzer H, Sauter G, Simon R, Dum D: Reduced KLK2 expression is a strong and independent predictor of poor prognosis in ERG-negative prostate cancer. *Prostate* 2020, 80:1097-107.

[32] Marx A, Schumann A, Hoflmayer D, Bady E, Hube-Magg C, Moller K, Tsourlakis MC, Steurer S, Buscheck F, Eichenauer T, Clauditz TS, Graefen M, Simon R, Sauter G, Izbicki JR, Huland H, Heinzer H, Haese A, Schlomm T, Bernreuther C, Lebok P, Polonski A: Up regulation of the Hippo signalling effector YAP1 is linked to early biochemical recurrence in prostate cancers. *Sci Rep* 2020, 10:8916.

[33] Moller K, Wecker AL, Hoflmayer D, Fraune C, Makrypidi-Fraune G, Hube-Magg C, Kluth M, Steurer S, Clauditz TS, Wilczak W, Simon R, Sauter G, Huland H, Heinzer H, Haese A, Schlomm T, Weidemann S, Luebke AM, Minner S, Bernreuther C, Bonk S, Marx A: Upregulation of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein hnRNP A1 is an independent predictor of early biochemical recurrence in TMPRSS2:ERG fusion-negative prostate cancers. *Virchows Arch* 2020, 477:625-36.

[34] Luebke AM, Ricken W, Kluth M, Hube-Magg C, Schroeder C, Buscheck F, Moller K, Dum D, Hoflmayer D, Weidemann S, Fraune C, Hinsch A, Wittmer C, Schlomm T, Huland H, Heinzer H, Graefen M, Haese A, Minner S, Simon R, Sauter G, Wilczak W, Meiners J: Loss of the adhesion molecule CEACAM1 is associated with early biochemical recurrence in TMPRSS2:ERG fusion-positive prostate cancers. *Int J Cancer* 2020, 147:575-83.

[35] Minner S, Hager D, Steurer S, Hoflmayer D, Tsourlakis MC, Moller-Koop C, Clauditz TS, Hube-Magg C, Luebke AM, Simon R, Sauter G, Gobel C, Weidemann S, Lebok P, Dum D, Fraune C, Izbicki J, Burandt E, Schlomm T, Huland H, Heinzer H, Haese A, Graefen M, Heumann A: Down-Regulation of S100A8 is an Independent Predictor of PSA Recurrence in Prostate Cancer Treated by Radical Prostatectomy. *Neoplasia* 2019, 21:872-81.

[36] Minner S, Lutz J, Hube-Magg C, Kluth M, Simon R, Hoflmayer D, Burandt E, Tsourlakis MC, Sauter G, Buscheck F, Wilczak W, Steurer S, Schlomm T, Huland H, Graefen M, Haese A, Heinzer H, Jacobsen F, Hinsch A, Poos A, Oswald M, Rippe K, Konig R, Schroeder C: Loss of CCAAT-enhancer-binding protein alpha (CEBPA) is linked to poor prognosis in PTEN deleted and TMPRSS2:ERG fusion type prostate cancers. *Prostate* 2019, 79:302-11.

[37] Seth AK, Argani P, Campbell KA, Cameron JL, Pawlik TM, Schulick RD, Choti MA, Wolfgang CL: Acinar cell carcinoma of the pancreas: an institutional series of resected patients and review of the current literature. *J Gastrointest Surg* 2008, 12:1061-7.

[38] Basturk O, Tang L, Hruban RH, Adsay V, Yang Z, Krasinskas AM, Vakiani E, La Rosa S, Jang KT, Frankel WL, Liu X, Zhang L, Giordano TJ, Bellizzi AM, Chen JH, Shi C, Allen P, Reidy DL, Wolfgang CL, Saka B, Rezaee N, Deshpande V, Klimstra DS: Poorly differentiated neuroendocrine carcinomas of the pancreas: a clinicopathologic analysis of 44 cases. *Am J Surg Pathol* 2014, 38:437-47.

[39] Steurer S, Schneider J, Buscheck F, Luebke AM, Kluth M, Hube-Magg C, Hinsch A, Hoflmayer D, Weidemann S, Fraune C, Moller K, Menz A, Bernreuther C, Lebok P, Sauter G, Simon R, Jacobsen F, Uhlig R, Wilczak W, Minner S, Burandt E, Krech RH, Dum D, Krech T, Marx AH, Clauditz TS: Immunohistochemically detectable thyroglobulin expression in extrathyroidal cancer is 100% specific for thyroidal tumor origin. *Ann Diagn Pathol* 2021, 54:151793.

9 Abkürzungsverzeichnis

ACC	Azinuszellkarzinom
MTA	medizinischer-technischer Assistent
TMA	Tissue Microarray
CPA1	Carboxypeptidase A1
MAEC	gemischt azinär-endokrines Karzinom
MADC	gemischt azinär-duktales Karzinom
mOS	mediane Gesamtüberlebensrate
OS	Gesamtüberleben
HIER	heat induced epitope retrieval
IWGAV	international workinggroup for Antibody validation
RNA	Ribonukleinsäure
HER2	Her2-Neu Rezeptor
ER	Östrogenrezeptor
PR	Progesteronrezeptor
HE	Hämatoxilin und Eosin

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Layout eines typischen TMA-Blockes.....	7
Abbildung 2: TMA Arrayer. A) Gesamtansicht des Arrayers mit Mehrfach-Blockhalter aus Aluminium für 6 TMA-Blöcke (im Bild sind 3 Positionen belegt), B) Hohlzylinder (Pfeil links) und Bohrer (Pfeil rechts) im verschiebbaren Stanzkopf. C) Schrittmotor, der den Stanzkopf in die Position für die nächste Stanze bewegt. D) Mehrfachblockhalter mit aufgesetztem Blockpodest.....	9
Abbildung 3: Tumortragender Spenderblock mit dazugehörigem HE-Schnitt.....	9
Abbildung 4: CPA1-Immunfärbung in normalen Geweben. A) Vergrößerung eines Microarray-Gewebepunkts, der eine starke CPA1-Färbung im Azinusparenchym des Pankreas zeigt. Keine Färbung in den Langerhans-Inseln*. B) Anfärbung von Stroma oder Gangstrukturen (gelbes Rechteck vergrößert) in der Umgebung der stark CPA1 positiven azinären Zellen, C) Überblick über den Microarray für Normalgewebe. Acht Spots des Azinusparenchyms in einer Reihe zeigen eine starke CPA1-Färbung (schwarzes Rechteck). In der Reihe mit dem Thymusgewebe wurde fälschlicherweise Azinusparenchym gestanzt (roter Kreis).....	15
Abbildung 5: Negative CPA1-Immunfärbung in Normalgeweben: A) Colon, B) Appendix, Muskelwand, C) Magen, D) Leber, E), Duodenum, Brunner Drüsen, F), Aorta, Endothelium, G), Plazenta, reif, H), Schilddrüse, I) Hoden, J) Skelettmuskel, K) Plazenta.....	15
Abbildung 6: Starke zytoplasmatische CPA1-Immunfärbung in der 6 initial als Azinuszellkarzinomen des Pankreas diagnostizierten Tumoren.....	16
Abbildung 7: Morphologische und immunhistochemische Befunde von 6 Tumoren, die in dieser Studie reklassifiziert wurden.....	17
Abbildung 8: Beispiele für artifizielle Anfärbung von Gewebestrukturen in der Umgebung von stark CPA1-exprimierenden Zellen. A-B) Schwach angefärbte Zellen von Adenokarzinomen neben stark positivem Pankreas-Normalgewebe. C) Ein CPA1-negativer neuroendokriner Tumor mit einigen „positiven“ Tumorzellen in der Nähe des normalen Pankreasgewebes. D) Starke Anfärbung des Stromas zwischen den Zellen eines Azinuszellkarzinoms.....	24

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausschnitt aus der Datentabelle (verwendete Software MS Excel)	8
Tabelle 2: Normalgewebe-Array (NTA 10).....	10-11
Tabelle 3: IHC Scoring Kriterien.....	13
Tabelle 4: CPA1-Immunfärbung in Tumoren (Hinweis: Alle reklassifizierten Fälle sind in dieser Tabelle enthalten. Alle positiven Fälle sind grau unterlegt).....	17-23

12 Erklärung des Eigenanteils

Im Folgenden erkläre ich meinen Eigenanteil zu der Dissertation mit dem Titel „Immunhistochemie der Carboxypeptidase A1 (CPA1) ist hoch sensitiv und spezifisch für das Azinuszellkarzinom des Pankreas (ACC)“.

Theoretische Grundlagen und Literaturrecherche: Die Durchsicht der bestehenden Literatur in der PubMed und die anschließende Einordnung der Literaturdaten in Hinblick auf die Studie wurde von mir selbstständig und eigenverantwortlich durchgeführt.

Methodik: Der Versuchsaufbau für eine sehr groß angelegte TMA-Studie war bereits zu Beginn meiner Promotion etabliert. Das zu untersuchende Protein (CPA1) wurde in Absprache mit meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Guido Sauter gewählt. Das Heraussuchen von duktalem Adenokarzinom, die Herstellung des Heterogenitäts TMAs und die Färbung von Großschnitten habe ich mit Unterstützung von Frau Maren Eisenberg, Frau Laura Behm, Dr. Ria Uhlig und Prof. Dr. med. Till Clauditz durchgeführt.

Datenauswertung und Dateninterpretation: Die mikroskopische Auswertung der Färbeergebnisse erfolgte durch mich, mit der Unterstützung von Dr. Ria Uhlig und Prof. Dr. med. Till Clauditz. Die Ergebnisse der Immunfärbung sind von mir in eine Tabelle protokolliert worden, um sie anschließend für statistischen Berechnungen weiter zu nutzen. Die statistischen Berechnungen wurden von Prof. Dr. rer. nat. Ronald Simon begleitet. Die Nachberechnungen und die Kontrolle der Daten habe ich eigenständig ausgeführt. Dateninterpretation, Schlussfolgerung, Evaluation diagnostischer Relevanz und Erstellung eines Kontexts zur bestehenden Literatur erfolgte im Diskurs mit meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Guido Sauter.

Niederschrift der Dissertation: Die Digitalisierung der gefärbten TMA-Schnitte mit Hilfe des Aperio Scanners wurde von mir eigenständig übernommen. Alle Graphiken, Tabellen und Fotos habe ich eigenverantwortlich erstellt. Die Niederschrift der Dissertation erfolgte eigenständig durch mich, anfänglich mit der Beratung durch meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Guido Sauter.

13 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

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 damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Datum: 16.05.2025

Unterschrift:

14 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Guido Sauter. Ohne die Möglichkeit, diese Doktorarbeit am Institut für Pathologie durchzuführen, die immer anregende und hilfreiche Unterstützung sowie ohne seine ständige Förderung, wäre diese Dissertation nicht entstanden.

Herrn PD Dr. Ronald Simon und besonders Frau Claudia Hube-Magg möchte ich für ihre Unterstützung bei statistischen Fragestellungen sowie bei der Erstellung des Manuskriptes ebenfalls herzlich danken.

Für den Erfahrungsaustausch, die wertvollen Ratschläge sowie für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre danke ich all meinen Kollegen und Kolleginnen.

Und zum Schluss danke ich aus tiefstem Herzen meinem Mann Martin Fehringer für seine endlose Unterstützung, Hilfe, Geduld, Liebe und sein Verständnis.