

INHA-Expression im menschlichen Tumor und Normalgewebe
Eine immunhistochemische Studie im Tissue-Microarray-Format an
12.212 Tumoren

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med)
an der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Nessar Ahmad Noori
aus Kabul

2025
(Jahr der Einreichung bei der Fakultät)

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Guido Sauter

Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Volkmar Müller

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Volkmar Müller

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Ronald Simon

Mitglied der Prüfungskommission: PD. Dr. Marianne Sinn

Datum der mündlichen Prüfung: 17.02.2026

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
2. Material und Methoden	14
2.1 Tissue-Microarray-Technik	14
2.2 Für das INHA-Projekt verwendete TMAs	19
2.3 Immunhistochemie	29
2.4 INHA Immunhistochemie	32
2.5 Statistik	33
3. Ergebnisse	34
3.1 Technische Aspekte	34
3.2 INHA im Normalgewebe	34
3.3 INHA in Karzinomen	47
3.4 INHA, Tumorphänotyp und Prognose	59
3.4.1 INHA und Tumorphänotyp beim Kolonkarzinom.....	59
3.4.2 INHA, Tumorphänotyp und Prognose beim klarzelligen Nierenzellkarzinom	60
3.4.3 INHA und Tumorphänotyp bei neuroendokrinen Tumoren	64
4. Diskussionen	66
5. Zusammenfassung.....	74
6. English Summary	75
7. Abkürzungsverzeichnis	76
8. Literaturverzeichnis	77
9. Danksagung	97
10. Eigenanteilserklärung.....	98
11. Eidesstattliche Erklärung.....	99

1. Einleitung

Inhibin ist ein Proteohormon, das von den männlichen und weiblichen Gonaden produziert wird und eine wesentliche Rolle bei der Inhibition der hypophysären FSH-Sekretion spielt (Makanji et al. 2014; Schwartz und Channing 1977; Keogh et al. 1976). Inhibin ist strukturell ebenso wie sein Gegenspieler Aktivin der TGF-Beta-Superfamilie zuzuordnen (Mason et al. 1985; Makanji et al. 2014; Vale et al. 1986).

Die Namensgebung von Inhibin erfolgte erstmals im Jahr 1932 durch McCullagh (McCullagh 1932). Er hatte in seinem Experiment Ratten kastriert und dabei beobachtet, dass dies unter anderem zu einer Hypertrophie sowie Überfunktion der Hypophyse führte (McCullagh 1932). Er führte diese Wirkung auf ein bis dato unbekanntes Protein, welchem er den Namen „Inhibin“ gab, zurück (McCullagh 1932). 10 Jahre zuvor hatte Mottram & Cramer eine ähnliche Entdeckung gemacht. Auch bei ihnen führte eine Kastration von männliche Ratten, diesmal durch Bestrahlung, zu einer Hypertrophie der Hypophyse (Mottram und Cramer 1923). Später konnten Studien zeigen, dass Inhibin enthaltende Flüssigkeitsextrakte, die aus den weiblichen Follikeln oder Hoden entstammen eine FSH suppressive Wirkung haben (Keogh et al. 1976; Schwartz und Channing 1977). Der erste isolierte Nachweis sowie Charakterisierung von Inhibin gelang dann 1985 parallel von mehreren verschiedenen Arbeitsgruppen (Miyamoto et al. 1985; Rivier et al. 1985; Robertson et al. 1985; Ling et al. 1985).

Inhibin entfaltet seine Wirkung als Heterodimer (32 kDa) (Makanji et al. 2014). Es setzt sich aus einer Alpha-Kette (INHA) (20 kDa) und einer Beta-Kette (INHBB) (13 kDa) zusammen, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Makanji et al. 2014; Ling et al. 1985). Beide Untereinheiten sind Genprodukte aus den gleichnamigen Genen und sind auf Chromosom 2 (INHA & INHBB) bzw. 7 (INHBA) lokalisiert (Barton et al. 1989).

Im menschlichen Körper unterscheidet zwei verschiedenen Formen des Inhibins: Inhibin A (KD) und B(KD) (Makanji et al. 2014; Ling et al. 1985). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Beta-Kette in verschiedenen Varianten vorliegt. Abhängig davon, ob die Synthese von Inhibin mit der Beta-Kette A (INHBA) oder Beta-Kette B erfolgte, spricht man entweder von Inhibin A oder B. Aktivin, der Gegen-

spieler von Inhibin, ist in der Regel ein Homodimer von zwei Beta-Ketten (Ling et al. 1986b; Vale et al. 1986). Die Bezeichnung der Aktivinproteine erfolgt ähnlich wie bei Inhibin in Abhängigkeit der verwendeten Beta-Ketten (Ling et al. 1986a). So existieren Aktivin A, B und diverse weitere Formen (Makanji et al. 2014).

Als Expressionsorte, die die stärkste Inhibinexpression aufweisen, wurden die Granulosa- und Thekazellen der Ovarien (Hillier et al. 1991; Burns et al. 1990) sowie die Sertoli- und Leydigzellen des Hodens identifiziert (Bergh und Cajander 1990; Makanji et al. 2014). Diese sekretieren bei einem hohen FSH-Spiegel im Sinne einer negativen Feedbackschleife vermehrt Inhibin, um die hypophysäre FSH-Freisetzung zu limitieren (Makanji et al. 2014; Keogh et al. 1976). Hier fungiert Inhibin als Antagonist zu Aktivin, indem es mit Aktivin um Rezeptorbindungsstellen konkurriert (Donaldson et al. 1999; Gray et al. 2000; Lebrun und Vale 1997; Makanji et al. 2014). So muss Aktivin, um seine Wirkung zu entfalten, Aktivin Typ 1 und/oder Aktivin Typ 2 Rezeptoren über seine Beta-Ketten binden (Attisano et al. 1996; Cárcamo et al. 1994; Mathews und Vale 1991; Mathews et al. 1992; Makanji et al. 2014). Inhibins Alpha-Kette kann zwar keine Aktivin-Typ 1 oder 2 Rezeptoren binden, dafür jedoch mit einer hohen Affinität eine Bindung mit Betaglykan eingehen (Abbildung 1) (Makanji et al. 2014; Lewis et al. 2000; Chapman et al. 2002). Bei Bindung dimerisiert Betaglykan mit vorhandene Aktivin Typ 2 Rezeptoren (López-Casillas et al. 1991; del Re et al. 2004), welche dann von der Beta-Kette von Inhibin gebunden wird und somit Aktivin zur Bindung nicht mehr zur Verfügung steht (Abbildung 2 und 3) (Donaldson et al. 1999; Lebrun und Vale 1997; Gray et al. 2000).

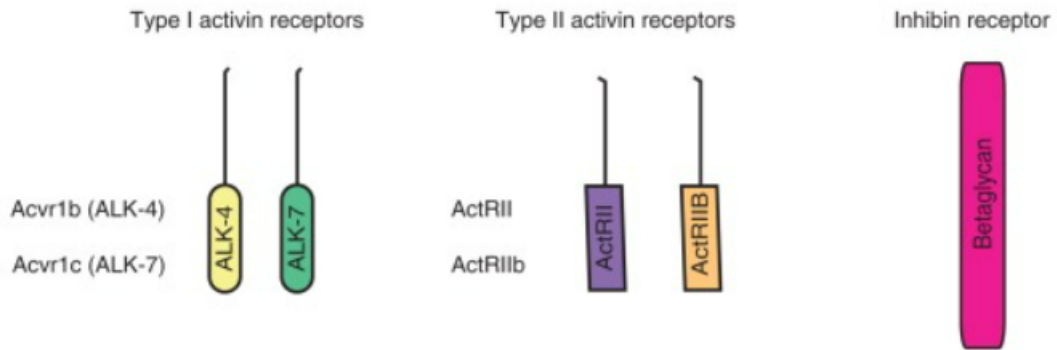


Abbildung 1: Verschiedene Typen von TGF-Beta-Rezeptoren. Diese gehören zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren. INHA kann nur Betaglykan binden. Ausschnitt einer Abbildung von Quelle: (Namwanje und Brown 2016)

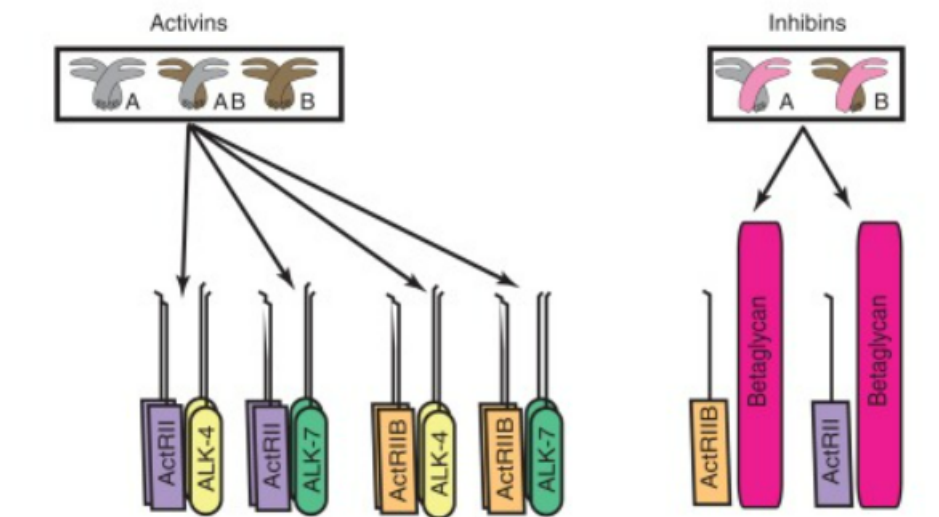


Abbildung 2: Damit die Beta-Einheiten von Aktivin binden können, müssen jeweils ein Dimer von Aktivin Typ 1-Rezeptoren und Typ 2-Rezeptoren miteinander tetramisieren. Die Beta-Einheit von Inhibin hingegen kann auch allein einen Aktivin Typ 2 Rezeptor binden. Ausschnitt einer Abbildung von Quelle: (Namwanje und Brown 2016)

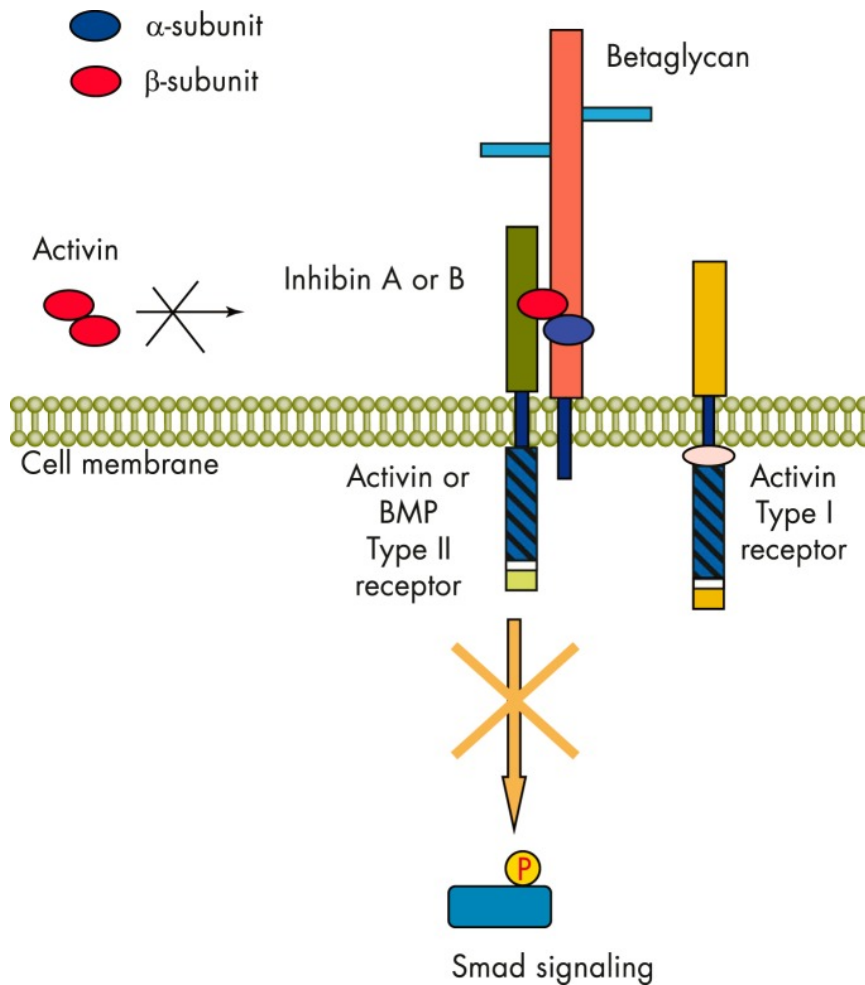


Abbildung 3: Die Dimerisierung von Betaglykan und Aktivin Typ 2-Rezeptoren verhindert die Einleitung des SMAD-Signalwegs, der von Aktivin verwendet wird. Quelle: (Makanji et al. 2014)

Neben der Funktion als Regulator des FSH-Spiegels diskutierten Studien außerdem eine eventuelle Rolle als Tumorsuppressor von Seiten Inhibins (Makanji et al. 2014). So führte ein Knockout von INHA in Mäusen in mehreren Studien bereits nach kürzester Zeit zur Bildung von gonadalen Stromatumoren (Matzuk et al. 1992; Matzuk et al. 1994; Coerver et al. 1996). Eine Studie konnte hierbei einen mehr als zehnfachen Anstieg des Aktivinspiegels feststellen (Matzuk et al. 1994). Auch bei Resektion der Gonaden überlebten die Mäuse nur geringfügig länger, da sie Nebennierenrindentumoren entwickelt hatten (Matzuk et al. 1994). Jedoch ist hier fraglich, ob die Erkenntnisse dieser Experimente auf den Menschen übertragbar sind. So konnten Studien ein unverändertes bzw. erhöhtes Expressionlevel von Inhibin sowohl in gonadalen Stromatumoren (Yamashita et al. 1997; Mom et al. 2007) als auch in der Nebennierenrindentumor (McCluggage et al. 1998; Arola et al. 2000) messen, welches nicht unbedingt auf eine Tumorsuppressor-Funktion von Inhibin hinweist.

Neben den Gonaden gibt es Indizien dafür, dass Inhibin in einer Vielzahl von anderen Organen exprimiert wird. So konnte der Human Protein Atlas eine teils starke RNA-Expression von INHA neben der Nebennierenrinde auch im Herzmuskel, Pankreas, Plazenta und Adenohypophyse detektieren (Tissue expression of INHA - Summary - The Human Protein Atlas 2023). Auch in vielen weiteren Organen fand sich zumindest eine schwache RNA-Expression von Inhibin wie in Abbildung 4 zu sehen ist (Tissue expression of INHA - Summary - The Human Protein Atlas 2023).

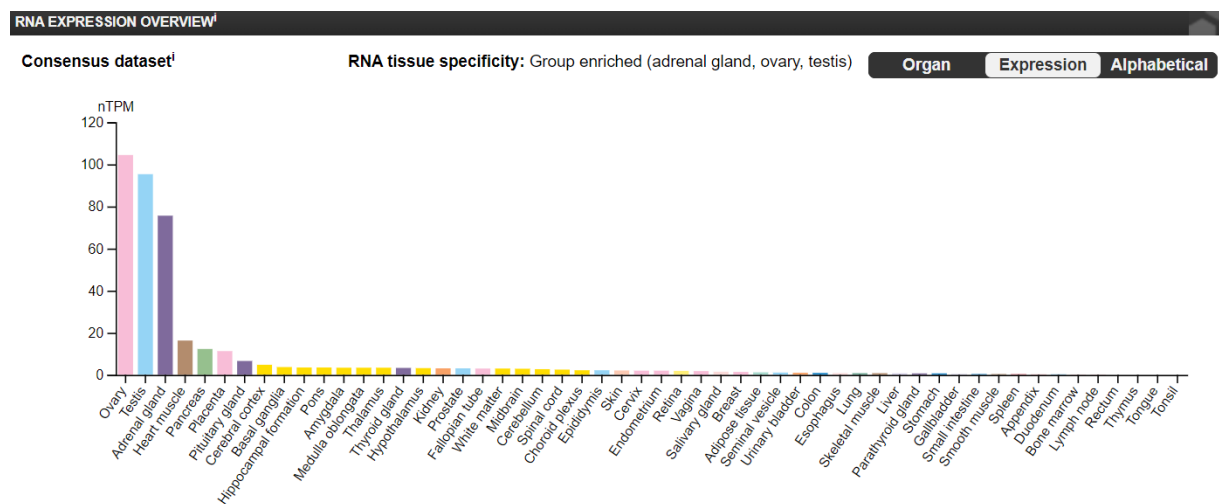


Abbildung 4: RNA-Expression von Inhibin in verschiedenen Normalgeweben. nTPM: Normalized transcripts per million. Quelle: (Tissue expression of INHA - Summary - The Human Protein Atlas 2023)

Die Datenlage bezüglich der Funktion von Inhibin in diesen Organen ist jedoch zum jetzigen Stand, insbesondere im humanen Kontext noch sehr schmal und bedarf noch weiteren Untersuchungen.

Bezüglich Inhibins klinischer Bedeutung existieren bereits mehrere Ansätze (Makanji et al. 2014). So weiß man, dass während einer Schwangerschaft der maternale Inhibin-Spiegel kontinuierlich ansteigt (Muttukrishna et al. 1995). Studien konnten hier zeigen, dass der Anstieg von Inhibin für das Fortbestehen einer Schwangerschaft von Relevanz ist, da die Inzidenz von Aborten mit einem niedrigen Inhibin-Spiegel korrelierte (Makanji et al. 2014; Muttukrishna et al. 2002). Zudem konnte man auch zeigen, dass Patientinnen mit einer häufigen Abortrate in ihrer Anamnese einen erniedrigten Inhibinspiegel im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe aufwiesen (Muttukrishna et al. 2002). Basierend auf diesen Grundlagen, so schlagen einige Arbeiten vor, könnte man beispielsweise Risikopatienten

für einen drohenden Abort nach beispielsweise einer In-Vitro-Fertilisation anhand eines sinkenden oder erniedrigten Inhibinspiegels identifizieren (Makanji et al. 2014; Treetampinich et al. 2000; Hauzman et al. 2004).

Ein weiteres Gebiet, in dem die Messung von Inhibin von Nutzen ist, ist in der Diagnostik eines Down-Syndroms (Makanji et al. 2014). Die Sensitivität vom Triple-Test bestehend aus der Bestimmung von Beta-HCG, Alpha-Fetoprotein und Östriol kann von 59% auf 70% erhöht werden, wenn man zusätzlich Inhibin im Sinne eines Quadrupel-Tests bestimmt (WALD et al. 1996). Studien konnten nämlich zeigen, dass eine Erhöhung des Inhibinspiegels mit dem Vorliegen eines Down-Syndroms korreliert (Makanji et al. 2014; van Lith et al. 1992; Lambert-Messerlian et al. 1996; Spencer et al. 1993).

Darüber hinaus eignet sich Inhibin hervorragend als Prädiktor für das Entstehen einer Praeklampsie (Makanji et al. 2014). Sowohl das Entstehen als auch der Schweregrad einer Praeklampsie ist mit einem erhöhten Inhibinspiegel assoziiert (Makanji et al. 2014; Kang et al. 2008).

Bei den Männern hingegen zeigt Inhibin Potential als Marker für die Spermatogenese (Makanji et al. 2014). So scheint ein erniedrigtes Inhibin mit einer geringeren Spermienzahl und Spermienkonzentration verbunden zu sein (Jensen et al. 1997; Pierik et al. 1998; Kolb et al. 2000; Makanji et al. 2014). Diese Aussage wird unter Anderem davon gestützt, dass Zustände wie das Klinefelter-Syndrom (Pierik et al. 1998), die eine eingeschränkte Spermienfunktion aufweisen, häufig auch einen erniedrigten Inhibinspiegel miteinhergehen (Makanji et al. 2014).

Eine Frage, die jedoch offensteht und noch endgültig zu klären ist, ist, inwiefern Inhibin als Tumormarker in der Immunhistochemie geeignet ist und wenn dies zu bejahen ist, bei welchen Tumorentitäten.

Um dieser Fragestellung nachzugehen haben mehr als 79 Studien in den letzten Jahren die Expression von INHA, welches das Unterscheidungsmerkmal von Inhibin gegenüber Aktivin darstellt, immunhistochemisch an unterschiedlich zusammengesetzten Tumorkohorten untersucht und evaluiert. Die Ergebnisse aller Studien sind in Abbildung 5 und die dazugehörigen Quellen in Tabelle 1 dargestellt.

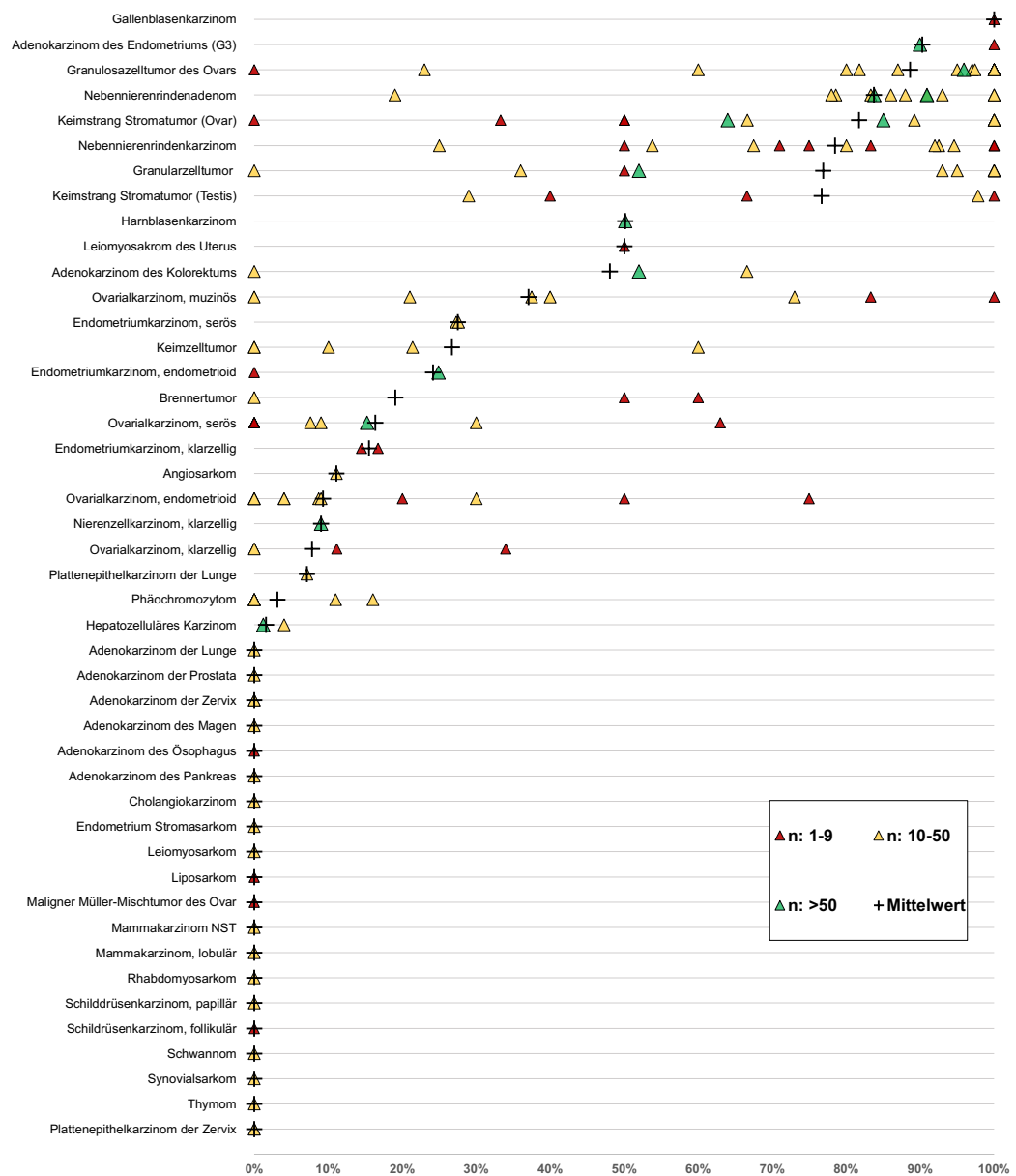


Abbildung 5: Ergebnisse der Literaturanalyse zur Inhibinexpression.

Tabelle 1: Quellenangaben zu den einzelnen Tumorentitäten aus Abbildung 5.

Adenokarzinom der Lunge	(Pan et al. 2005)
Adenokarzinom der Prostata	(Pan et al. 2005; McCluggage und Maxwell 1999)
Adenokarzinom der Zervix	(Mylonas und Dian 2011; Pan et al. 2005)
Adenokarzinom des Endometriums (G3)	(Worbs et al. 2007; Mylonas et al. 2004)
Adenokarzinom des Kolorektums	(He et al. 2021; Pan et al. 2005; McCluggage und Maxwell 1999)
Adenokarzinom des Magen	(Pan et al. 2005; McCluggage und Maxwell 1999)
Adenokarzinom des Ösophagus	(Pan et al. 2005)

Adenokarzinom des Pankreas	(Pan et al. 2005; McCluggage und Maxwell 1999)
Angiosarkom	(Schraith et al. 2003)
Brennertumor	(Ciriş et al. 2004; Movahedi-Lankarani und Kurman 2002; McCluggage et al. 1997; Flemming et al. 1996)
Cholangiokarzinom	(Pan et al. 2005)
Endometrioidkarzinom des Ovars	(Zhao et al. 2008; Zhao et al. 2007; Cathro und Stoler 2005; Ciriş et al. 2004; Zheng et al. 2000; Dionigi et al. 2000; Choi et al. 2000; McCluggage und Maxwell 1999; Zheng et al. 1998; Zheng et al. 1997; McCluggage et al. 1997; Flemming et al. 1996)
Endometrium Stromasarkom	(Chu et al. 2001)
Endometriumkarzinom, endometrioid	(Mylonas et al. 2009; Movahedi-Lankarani und Kurman 2002; Choi et al. 2000; Matias-Guiu et al. 1998)
Endometriumkarzinom, klarzellig	(Mylonas 2010; Mylonas et al. 2009)
Endometriumkarzinom, serös	(Mylonas 2010; Mylonas et al. 2009)
Gallenblasenkarzinom	(Murakata und Ishak 2001)
Granularzelltumor	(An et al. 2015; Chamberlain et al. 2014; Rekhi und Jambhekar 2010; Vered et al. 2009; Bellezza et al. 2008; Parfitt et al. 2006; Le et al. 2004; Zamecnik et al. 2003; Fine und Li 2003; Murakata und Ishak 2001)
Granulosazelltumor des Ovars	(Lambert-Messerlian et al. 2017; Oseto et al. 2014; Geiersbach et al. 2011; Nofech-Mozes et al. 2012; Dong et al. 2011; Anttonen et al. 2005; Cathro und Stoler 2005; Ciriş et al. 2004; Yao et al. 2003; Fine und Li 2003; Movahedi-Lankarani und Kurman 2002; Mayr et al. 2002; Gebhart et al. 2000; Choi et al. 2000; Horny et al. 1999; Burger et al. 1998; Matias-Guiu et al. 1998; Kommoss et al. 1998; Riopel et al. 1998; McCluggage et al. 1997; Stewart et al. 1997; Flemming et al. 1996; Gurusinghe et al. 1995)
Harnblasenkarzinom	(Lee et al. 2015)
Hepatozelluläres Karzinom	(Pan et al. 2005; Renshaw und Granter 1998)
Keimstrang Stromatumor (Ovar)	(Zhang et al. 2018; Stewart et al. 2016; Al-Agha et al. 2011; Guo et al. 2004; Yao et al. 2003; Deavers et al. 2003; Choi et al. 2000; Kommoss et al. 1998; Pelkey et al. 1998b; Zheng et al. 1997; McCluggage et al. 1997; Flemming et al. 1996)
Keimstrang Stromatumor (Testis)	(Kao und Ulbright 2020; Henley et al. 2002; Kommoss et al. 2000; Ulbright et al. 2000; Iczkowski et al. 1998)
Keimzelltumor	(Salonen et al. 2010; Dias et al. 2009; Pan et al. 2005; Kommoss et al. 2000)
Leiomyosarkom des Uterus	(Chu et al. 2001)
Leiomyosarkom	(Schraith et al. 2003)
Liposarkom	(Huang und Antonescu 2002)
Maligner Müller-Mischtumor des Ovars	(Movahedi-Lankarani und Kurman 2002)
Mammakarzinom NST	(Pan et al. 2005)
Mammakarzinom, lobulär	(Pan et al. 2005)
Nebennierenrindenadenom	(Parviainen et al. 2013; Elmoneim et al. 2012; Sangoi und McKenney 2010; Pan et al. 2005; Zhang et al. 2004; Zhang et al. 2003; Jorda et al. 2002; Cho und Ahn 2001; Fogt et al. 1999; Renshaw und Granter 1998; Pelkey et al. 1998a; McCluggage et al. 1998)
Nebennierenrindenkarzinom	(Parviainen et al. 2013; Weissferdt et al. 2014; Elmoneim et al. 2012; Sangoi und McKenney 2010; Pan et al. 2005; Zhang et al. 2004; Zhang et al. 2003; Jorda et

	<i>al. 2002; Cho und Ahn 2001; Fogt et al. 1999; Renshaw und Granter 1998; Pelkey et al. 1998a; McCluggage et al. 1998)</i>
<i>Nierenzellkarzinom, klarzellig</i>	<i>(Sangoi et al. 2011)</i>
<i>Ovarialkarzinom, klarzellig</i>	<i>(Mabuchi et al. 2006; Cathro und Stoler 2005; Ciriş et al. 2004; Movahedi-Lankarani und Kurman 2002; Zheng et al. 2000; Choi et al. 2000; Zheng et al. 1998; Zheng et al. 1997; Flemming et al. 1996; Gurusinghe et al. 1995)</i>
<i>Ovarialkarzinom, muzinös</i>	<i>(Lambert-Messerlian et al. 2017; Mylonas et al. 2009; Cathro und Stoler 2005; Zheng et al. 2000; Dionigi et al. 2000; Choi et al. 2000; McCluggage und Maxwell 1999; Burger et al. 1998; Zheng et al. 1998; Zheng et al. 1997; McCluggage et al. 1997; Flemming et al. 1996; Gurusinghe et al. 1995)</i>
<i>Ovarialkarzinom, serös</i>	<i>(Cathro und Stoler 2005; Ciriş et al. 2004; Movahedi-Lankarani und Kurman 2002; Zheng et al. 2000; Choi et al. 2000; McCluggage und Maxwell 1999; Zheng et al. 1998; Zheng et al. 1997; McCluggage et al. 1997; Flemming et al. 1996; Gurusinghe et al. 1995)</i>
<i>Phäochromozytom</i>	<i>(Elmoneim et al. 2012; Păun et al. 2014; Sangoi und McKenney 2010; Zhang et al. 2004; Zhang et al. 2003; Jorda et al. 2002; Fogt et al. 1999; Pelkey et al. 1998a; McCluggage et al. 1998)</i>
<i>Plattenepithelkarzinom der Lunge</i>	<i>(Pan et al. 2005)</i>
<i>Plattenepithelkarzinom der Zervix</i>	<i>(Mylonas und Dian 2011; Pan et al. 2005)</i>
<i>Rhabdomyosarkom</i>	<i>(Schraith et al. 2003)</i>
<i>Schilddrüsenkarzinom, papillär</i>	<i>(Pan et al. 2005)</i>
<i>Schilddrüsenkarzinom, follikulär</i>	<i>(Pan et al. 2005)</i>
<i>Schwannom</i>	<i>(Schraith et al. 2003)</i>
<i>Synovialsarkom</i>	<i>(Setsu et al. 2012)</i>
<i>Thymom</i>	<i>(Pan et al. 2005)</i>

Die Darstellung macht deutlich, dass die beobachteten Positivitätsraten zwischen den einzelnen Studien teilweise dramatisch variieren. Beispielsweise schwankte die INHA Positivitätsrate von 0%-100% bei Granulosazelltumoren des Ovars (Yao et al. 2003; Flemming et al. 1996), von 0%-100% bei Granularzelltumoren (Parfitt et al. 2006; Fine und Li 2003), von 25%-100% bei Nebennierenrindenkarzinomen (Jorda et al. 2002; McCluggage et al. 1998), von 0%–100% bei muzinösen Ovarialkarzinomen (Choi et al. 2000; Dionigi et al. 2000), von 0%–63% bei serösen Ovarialkarzinomen (McCluggage et al. 1997; Flemming et al. 1996), von 0%–60% bei Brennertumoren (Ciriş et al. 2004; Flemming et al. 1996), von 0%–75% bei endometrioiden Karzinomen des Ovars (Choi et al. 2000; Dionigi et al. 2000) und 0%–16% bei Phäochromozytomen (McCluggage et al. 1998; Elmoneim et al. 2012).

Die Ursachen für diese hohe Variabilität der Daten dürfte in der Verwendung unterschiedlicher Reagenzien, insbesondere Antikörper, verschiedener Färbeprotokolle für die Immunhistochemie und unterschiedlicher Kriterien für die Definition eines INHA positiven Karzinoms liegen. Diese variablen Daten limitieren offensichtlich die diagnostische Nutzung der INHA Immunhistochemie, für deren Interpretation es einen bedeutenden Unterschied macht, ob beispielsweise die Mehrzahl der Ovarialkarzinome INHA positiv sind oder ob dieser Tumor verlässlich INHA negativ ist.

Angesichts der Nutzung des Antikörpers für die Diagnose eines Nebennierenrindentumors ist es auch von Bedeutung, ob Phäochromozytome in 0% oder in 16% der Fälle INHA positiv sind.

Um die tatsächliche Bedeutung der INHA-Expression in unterschiedlichen Tumortypen besser einschätzen zu können, wäre eine Studie wünschenswert, bei der sämtliche Tumorarten oder mindestens sehr viele Tumorarten in großen Mengen unter komplett standardisierten Bedingungen immunhistochemisch auf eine INHA-Proteinexpression untersucht werden.

Ziel dieser Doktorarbeit war es dementsprechend an einem Kollektiv von mehr als 12212 Tumoren und 76 verschiedenen Kategorien von Normalgeweben die Expression von INHA systematisch zu untersuchen, um so die diagnostische Bedeutung dieses immunhistochemischen Markers besser einschätzen zu können.

Die Untersuchung wurde im Tissue-Microarray-Format durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Tissue-Microarray-Technik

Die Tissue Micro Array (TMA) Methode wurde 1998 von Kononen et al. erstmals publiziert (Kononen et al. 1998). Die Methode wurde von den Arbeitsgruppen Olli-Pekka Kallioniemi (damals am National Institut of Health, Bethesda Maryland, USA) und Guido Sauter (damals Institut für Pathologie, Kantonenspital Basel, Schweiz) entwickelt. Es handelt sich um ein Verfahren, bei dem von hunderten von Tumoren zylindrische Gewebsfragmente aus den ursprünglichen Paraffinblöcken entnommen werden, um diese danach in einer geordneten Weise in einen leeren Paraffinblock einzubringen (Kononen et al. 1998). Ein derartiger TMA-Block enthält Stenzen von ca. 600 Tumoren. Von einem solchen Block können Schnittpräparate angefertigt werden, wie man es bereits aus der Routinediagnostik in Form von normalen Paraffinblöcken kennt. Diese können dann mittels *in situ* Methoden wie Immunhistochemie, RNA-in-situ-Hybridisierung oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung untersucht werden. Die TMA-Methode macht derartige in-situ-Studien wesentlich effizienter und schneller. Die gleiche Menge an Reagenzien und Manpower, die unter normalen Bedingungen für das Schneiden und Färben eines einzigen Tumorblocks erforderlich sind, genügen nun zur Färbung von mehr als 600 Tumoren. Dies führt zu einer Reduktion der Reagenzienkosten um einen Faktor von ca. 600 und eine ähnlich große Einsparung bei der Manpower für die Färbung von Präparaten. Allerdings müssen die ökonomischen Vorteile, welche bei der Nutzung von TMAs auftreten, durch einen außerordentlich aufwendigen Herstellungsprozess erkauft werden.

Die wesentlichen Schritte der TMA-Herstellung sind wie folgt:

A) Identifikation potenziell geeigneter Fälle

Die Herstellung von TMAs beginnt immer mit der Generierung einer Liste potenziell geeigneter Fälle. Am UKE geschieht dies typischerweise durch eine Volltextsuche im Pathologieinformationssystem, bei welcher man nach bestimmten interessierenden Diagnosen sucht. Die zu diesen Diagnosen erstellten Befundberichte werden dann nach der möglichen Eignung des Falles gescreent. Hierbei werden Tumoren ausgeschlossen, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit ungeeignet sein werden. Hierzu gehören beispielsweise sehr kleine Tumoren oder Tumoren mit ausgedehnten Nekrosen oder regressiven Veränderungen nach Chemotherapie.

B) Histologische Selektion geeigneter Fälle

Von allen nach Schritt A als potenziell geeigneten gefundenen Fällen werden sämtliche histologischen Schnitte herausgesucht und von einem Pathologen auf Eignung für die TMA-Herstellung überprüft. Kriterien für Eignung sind das Vorhandensein von größeren Tumorarealen (mindestens 1x1 cm) ohne oder weitgehend ohne artifizielle Veränderungen wie Kompressionsartefakte. Ein ungünstiges Verhältnis von Tumorzellen zu Stroma, welches mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit dazu, dass im Stanzvorgang keine Tumorzellen getroffen werden, gilt nicht ausdrücklich als Ausschlusskriterium, da der systematische Ausschluss von Tumoren mit hohem Stromagehalt zum Ausschluss einer biologischen relevanten Untergruppe von Tumoren und damit zu einem Bias führen könnte. Die für die TMA-Herstellung potenziell geeigneter Areale werden auf den HE-Schnitten mit einem Filzstift markiert.

C) Qualitätskontrolle der Paraffinblöcke

Von den geeigneten Schnitten werden die korrespondierenden Paraffinblöcke herausgesucht und von einer medizinisch-technischen Assistentin (MTA) auf Eignung für das Stanzen evaluiert.

Kriterien für Eignung sind eine möglichst große Dicke bzw. Tiefe des Blockes, welcher mindestens 2mm betragen sollte.

D) Festlegung des TMA-Aufbaus

Sobald die geeigneten Fälle für einen TMA identifiziert sind, wird die Reihenfolge festgelegt, in welcher die Gewebe in den TMA eingebracht werden sollen.

Für die UKE-TMAs wird grundsätzlich immer die gleiche Grundstruktur gewählt. Diese besteht aus sechs Sektoren (markiert mit Großbuchstaben von A-F) bei welchen die Zeilen durch Zahlen von 1-9 und die Spalten mit Kleinbuchstaben von a-r definiert werden. Um eine Orientierbarkeit der TMA-Schnitte sicherzustellen, sind die Sektoren ungleich groß und asymmetrisch aufgebaut. Ein Bauplan eines UKE typischen TMAs ist in Abbildung 6 dargestellt.

MTA 5.2 B

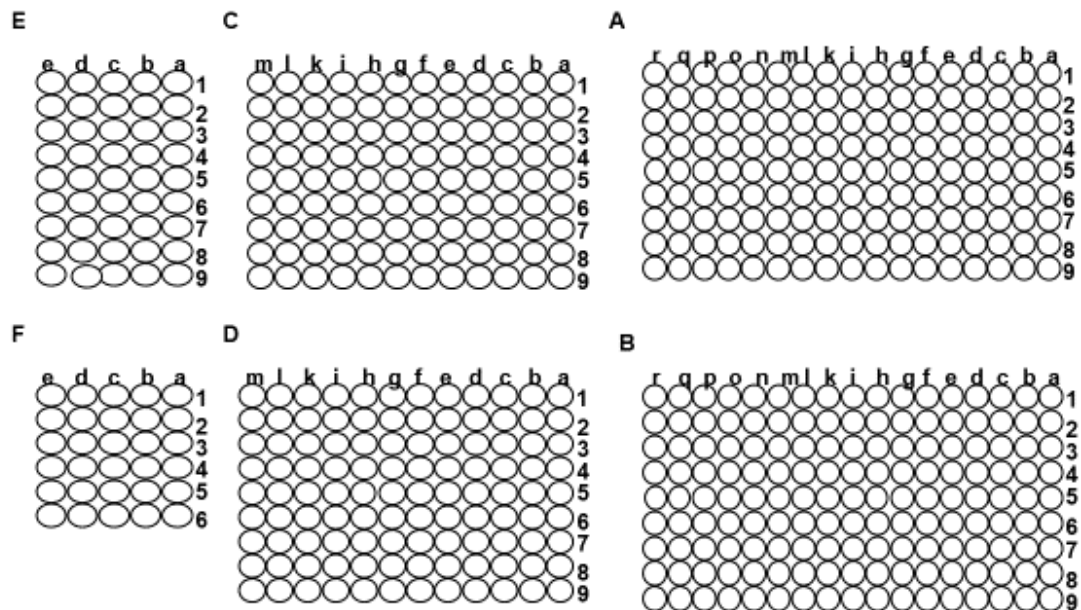


Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines UKE-TMA.

Hervorzuheben ist die optimale Tauglichkeit der TMA-Methode für Aspekte des Datenschutzes. Die Proben eines Pathologieinstitutes sind mit Laufnummern versehen, welche auf den Blöcken und den diagnostischen Schnittpräparaten auftreten. Diese Laufnummern sind für Identifikation der Schnitte und Blöcke notwendig. Durch die Biopsienummern könnte theoretisch ein Hacker, der sich Zugang zum Pathologieinformationssystem verschafft, auf die Patientennamen rückschließen.

Diese pseudonymisierten Biopsienummern sind jedoch lediglich während der Herstellung eines TMA notwendig. Ist der TMA erst einmal hergestellt, sind die klinischen und oder histopathologischen Daten, welche zu den verwendeten Proben gehören über die TMA-Koordinate mit dem Gewebe verbunden. Die Biopsienummern können also nach Fertigstellung des TMA entweder ausgeblendet (Pseudonymisierung) oder definitiv gelöscht werden (Anonymisierung).

Ein Beispiel eines TMA-Datenfiles mit zugehörigen histopathologischen Daten ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Ausschnitt eines fiktiven exemplarischen TMA-Datenfiles.

TMA „MTA 5.2 B“								
Arrayname	Koordinate	Entität	Alter bei Einsen- dung	pT	pN	pM	R-Status	FIGO
...	...	...	...	...	...	...	...	...
MTA 5.2 B	A2a	Ovarialkarzinom, muzinös	45	3	1	0	0	III
MTA 5.2 B	A2b	Ovarialkarzinom, muzinös	50	3	3	1	0	IV
MTA 5.2 B	A2c	Ovarialkarzinom, muzinös	75	4	2	1	1	IV
...	...	...	...	...	...	...	...	...

E) TMA-Herstellung.

Die eigentliche TMA-Herstellung erfolgt mit einem semiautomatischen Tissue-Arrayers, welche von Mitarbeitern des Institutes für Pathologie (Christian und Martina Mirlacher) entwickelt wurde (Abbildung 7-10).

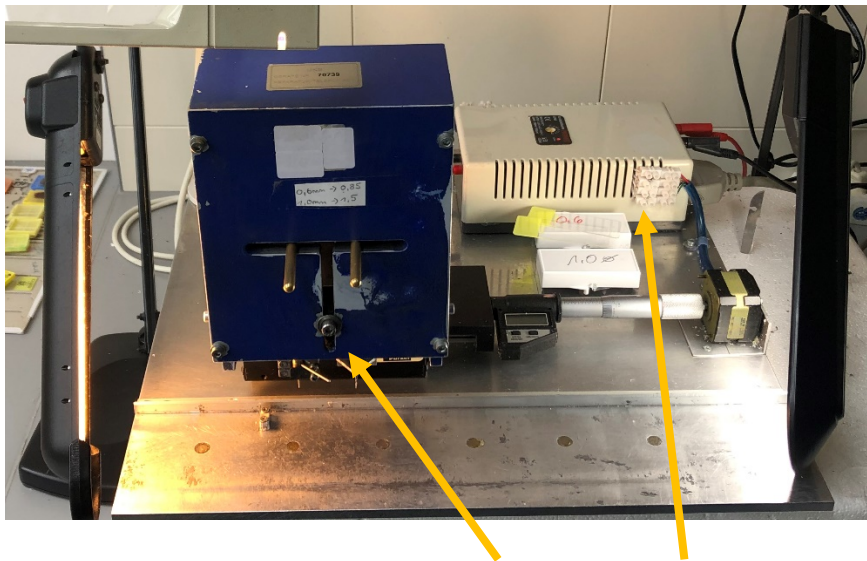


Abbildung 7: Vom UKE entwickeltes Stanzgerät. Die weiße Apparatur stellt den elektrischen Schrittmotor dar.

Das zentrale Element des Gerätes ist ein Kippschalter, welche es erlaubt an einer definierten Position (TMA-Koordinate) laufend zwischen einem Bohrer und einer Hohlneedle zu wechseln. Mit dem Bohrer wird zunächst ein Loch in einen designierten TMA-Empfänger-Block gebohrt.

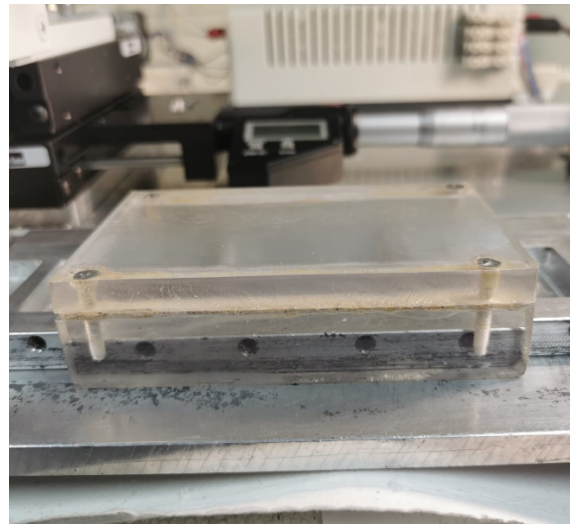
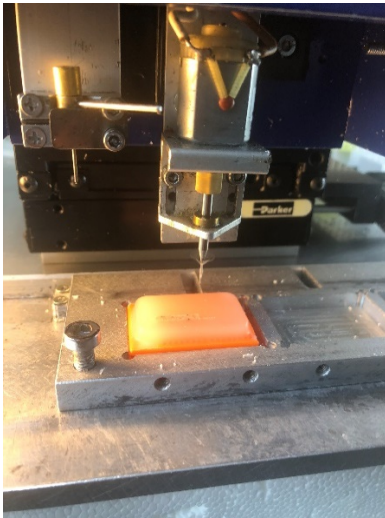


Abbildung 8: Linkes Bild: Stanzgerät im Bohrmodus. Rechtes Bild: Minipodest, auf welchem der Spenderblock steht.

Danach wird auf die Hohnadel gewechselt und ein kleines Podest über den leeren Empfänger-Block gestellt. Auf diesem Podest wird der Tumorhaltige Spenderblock gelegt. Nach Abgleich mit dem danebenliegenden HE-Schnitt wird an einer geeigneten Stelle mit der Hohnadel ein 0,6 mm messender Gewebezyylinder entnommen. Diese wird nach der Entfernung des „Podestes“ in das vorgefertigte Loch des Empfängerblockes eingebracht.

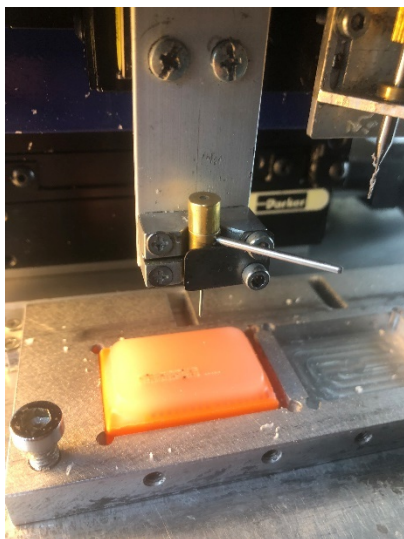


Abbildung 9: Stanzgerät im Hohnadelmodus. Die vom Spenderblock entnommene Probe wird nun im Empfängerblock eingebracht.

Meist wird der Vorgang mehrfach wiederholt, wobei die Empfängerblöcke laufend ausgetauscht werden, sodass mehrere Replikate des TMA-Blockes gleichzeitig hergestellt werden.



Abbildung 10: Mehrfachblockhalter, in dem Replikate untergebracht werden.

Nachdem Proben des bearbeitenden Tumors in eine ausreichende Zahl von Replikaten eingebracht worden sind (meistens 8 Replikate), wird ein am Tissue-Micro-Arrayer eingebauter elektrischer Schrittmotor aktiviert und die Stanzvorrichtung wird auf die nächste Array-Position verschoben. Dieser Vorgang wird wiederholt (bis der gesamte TMA-Block mit Gewebeproben aufgefüllt ist).

2.2 Für das INHA-Projekt verwendete TMAs

Für das folgende Projekt wurden zwei Typen von TMAs verwendet, Normalgewebe-TMAs und Tumor-TMAs.

Der Normalgewebe-TMA beinhaltete von 76 verschiedenen Normalgewebeskategorien jeweils 8 Proben von 8 verschiedenen Patienten. Eine Liste der 76 verschiedenen Normalgewebeskategorien ist in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Normalgewebe-TMAs.

Nummer	Normalgewebe	Nummer	Normalgewebe
1	Endothel, Aorta	39	Rektum, Mukosa
2	Media, Aorta	40	Gallenblase, Epithel
3	Herz	41	Leber
4	Quergestreifte Muskulatur	42	Pankreas
5	Zungenmuskulatur	43	Parotis
6	Uterus, Myometrium	44	Glandula submandibularis
7	Appendix, Muskel	45	Glandula sublingualis
8	Ösophagus, Muskel	46	Knochenmark
9	Magen, Muskel	47	Duodenum, Glandula duodenales
10	Ileum, Muskel	48	Niere, Kortex
11	Colon descendens, Muskel	49	Niere, Mark
12	Nierenbecken, Muskel	50	Prostata
13	Harnblase, Muskel	51	Glandula vesiculosa
14	Penis, Corpus spongiosum	52	Epididymis
15	Ovar, Stroma	53	Hoden
16	Fett	54	Bronchus, Mukosa
17	Haut	55	Bronchus, Drüsen
18	Haut, Haarfollikel und Talgdrüse	56	Sinus paranasales
19	Lippe, orale Mukosa	57	Lunge
20	Mundhöhle	58	Brust
21	Tonsille, Oberflächenepithel	59	Endozervix
22	Analkanal, Haut	60	Endometrium, Proliferation
23	Analkanal, Übergang Mukosa	61	Endometrium, Sekretion
24	Ektozervix	62	Eileiter, Mukosa
25	Ösophagus, Plattenepithel	63	Plazenta frühe, Dezidua
26	Nierenbecken, Urothel	64	Ovar, Corpus Luteum
27	Harnblase, Urothel	65	Ovar, follikuläre Zyste
28	Plazenta, reife Amnion	66	Plazenta, frühe
29	Lymphknoten	67	Plazenta, reife
30	Milz	68	Nebenniere
31	Thymus	69	Nebenschilddrüse
32	Tonsille	70	Schilddrüse
33	Magen, Antrum	71	Cerebellum, Cortex (Stratum moleculare)
34	Magen, Corpus	72	Cerebellum, Substantia grisea
35	Duodenum, Mukosa	73	Cerebrum, grau
36	Ileum, Mukosa	74	Cerebrum, weiß
37	Appendix, Mukosa	75	Hypophyse, Hinterlappen, Infundibulum
38	Colon descendens, Mukosa	76	Hypophyse, Vorderlappen

Die Tumor-TMAs beinhalteten auf insgesamt 38 Blöcken 15012 Primärtumoren von 134 verschiedenen Tumortypen und Subtypen. Detaillierte Angaben zur Zusammensetzung der Tumor-TMA-Schnitte sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Tumor-TMAs.

	Tumorentität	TMA- Probenzahl (n)
Tumoren der Haut	Pilomatrixom	35
	Basalzellkarzinom	88
	Benigner Nävus	29
	Plattenepithelkarzinom der Haut	90
	Malignes Melanom	46
	Malignes Melanom mit Lymphknotenmetastasierung	86
	Merkelzellkarzinom	46
Tumoren des Kopfs und des Nackens	Plattenepithelkarzinom des Larynx	109
	Plattenepithelkarzinom des Pharynx	60
	Orales Plattenepithelkarzinom des Mundboden	130
	Pleomorphes Adenom der Parotisdrüse	50
	Warthintumor der Parotis	49
	Basalzelladenom der Speicheldrüse	15
Tumoren der Lunge, der Pleura und des Thymus	Adenokarzinom der Lunge	196
	Plattenepithelkarzinom der Lunge	80
	Kleinzelliges Karzinom der Lunge	16
	Epitheloides Mesotheliom	39
	Mesotheliom, sonstige	76
	Thymom	29
Tumoren des weiblichen Genitaltrakts	Plattenepithelkarzinom der Vagina	78
	Plattenepithelkarzinom der Vulva	130
	Plattenepithelkarzinom der Zervix	128
	Adenokarzinom der Zervix	21
	Endometrioides Endometriumkarzinom	236
	Seröses Endometriumkarzinom	82
	Karzinoid des Uterus	48
	Endometriumkarzinom, high grade, G3	13

	<i>Tumorentität</i>	<i>TMA-Probenzahl (n)</i>
	<i>Klarzelliges Endometriumkarzinom</i>	8
	<i>Endometrioides Ovarialkarzinom</i>	110
	<i>Seröses Ovarialkarzinom</i>	559
	<i>Muzinöses Ovarialkarzinom</i>	96
	<i>Klarzelliges Ovarialkarzinom</i>	50
	<i>Karzinoid des Ovars</i>	47
	<i>Granulosazelltumor des Ovars</i>	37
	<i>Leydigzelltumor des Ovars</i>	4
	<i>Sertolizelltumor des Ovars</i>	1
	<i>Sertoli-Leydigzelltumor des Ovars</i>	3
	<i>Steroidzelltumor des Ovars</i>	3
	<i>Brenner-Tumor</i>	41
Tumoren der Brust	<i>Invasives Mammakarzinom (NST)</i>	80
	<i>Lobuläres Mammakarzinom</i>	122
	<i>Medulläres Mammakarzinom</i>	15
	<i>Tubuläres Mammakarzinom</i>	18
	<i>Muzinöses Mammakarzinom</i>	22
	<i>Phylloider Brusttumor</i>	50
Tumoren des Verdauungstrakts	<i>Adenomatöser Polyp, low-grade Dysplasie</i>	50
	<i>Adenomatöser Polyp, high-grade Dysplasie</i>	50
	<i>Adenokarzinom des Kolons</i>	2482
	<i>Adenokarzinom des Magens, diffuser Typ</i>	176
	<i>Adenokarzinom des Magens, intestinaler Typ</i>	174
	<i>Adenokarzinom des Magens, gemischer Typ</i>	62
	<i>Adenokarzinom des Ösophagus</i>	83
	<i>Plattenepithelkarzinom des Ösophagus</i>	76
	<i>Plattenepithelkarzinom des Analkanals</i>	89
	<i>Cholangiozelluläres Karzinom</i>	113
	<i>Hepatozelluläres Karzinom</i>	50
	<i>Duktales Adenokarzinom des Pankreas</i>	612

	<i>Tumorentität</i>	<i>TMA-Probenzahl (n)</i>
	<i>Pankreatisch-ampulläres Karzinom</i>	89
	<i>Azinuszellkarzinom des Pankreas</i>	16
	<i>Gastrointestinaler Stromatumor (GIST)</i>	50
Tumoren der Harnwege	<i>Nicht invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2 low grade</i>	177
	<i>Nicht invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2 high grade</i>	141
	<i>Nicht invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G3</i>	219
	<i>Urothelkarzinom, pT2-4 G3</i>	1318
	<i>Plattenepithelkarzinom der Blase</i>	22
	<i>Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom der Blase</i>	23
	<i>Sarkomatoides Urothelkarzinom</i>	25
	<i>Urothelkarzinom (Nierenbecken)</i>	62
	<i>Klarzelliges Nierenzellkarzinom</i>	857
	<i>Papilläres Nierenzellkarzinom</i>	255
	<i>Klarzelliges (tubuläres) papilläres Nierenzellkarzinom</i>	21
	<i>Chromophobes Nierenzellkarzinom</i>	131
	<i>Onkozytom</i>	177
Tumoren der männlichen Genitalorgane	<i>Adenokarzinom der Prostata, Gleason 3+3</i>	83
	<i>Adenokarzinom der Prostata, Gleason 4+4</i>	80
	<i>Adenokarzinom der Prostata, Gleason 5+5</i>	85
	<i>Adenokarzinom der Prostata (Rezurrenz)</i>	258
	<i>Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom der Prostata</i>	19
	<i>Seminom</i>	621
	<i>Embryonales Karzinom des Hodens</i>	50
	<i>Leydigzelltumor des Hodens</i>	30

	<i>Tumorentität</i>	<i>TMA-Probenzahl (n)</i>
	<i>Sertolizelltumor des Hodens</i>	2
	<i>Keimstrangstromatumor des Hodens</i>	1
	<i>Spermatozytischer Tumor des Hodens</i>	1
	<i>Dottersacktumor</i>	50
	<i>Teratom</i>	50
	<i>Plattenepithelkarzinom des Penis</i>	80
Tumoren der endokrinen Organe	<i>Schilddrüsenadenom</i>	113
	<i>Papilläres Schilddrüsenkarzinom</i>	391
	<i>Follikuläres Schilddrüsenkarzinom</i>	154
	<i>Medulläres Schilddrüsenkarzinom</i>	111
	<i>Nebenschilddrüsenadenom</i>	43
	<i>Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom</i>	45
	<i>Nebennierenadenom</i>	50
	<i>Nebennierenkarzinom</i>	26
	<i>Phäochromozytom</i>	50
	<i>Neuroendokriner Tumor der Appendix (NET)</i>	22
	<i>Neuroendokriner Tumor des Kolorektums (NET)</i>	12
	<i>Neuroendokriner Tumor des Ileums (NET)</i>	49
	<i>Neuroendokriner Tumor der Lunge (NET)</i>	19
	<i>Neuroendokriner Tumor des Pankreas (NET)</i>	97
	<i>Neuroendokrines Karzinom des Kolorektums (NEC)</i>	12
	<i>Neuroendokrines Karzinom der Gallenblase (NEC)</i>	4
	<i>Neuroendokrines Karzinom des Pankreas (NEC)</i>	14

	<i>Tumorentität</i>	<i>TMA- Probenzahl (n)</i>
Tumoren des hämato- poetischen und lymphatischen Systems	<i>Hodgkin-Lymphom</i>	103
	<i>Kleinzelliges B-Zell- Lymphom (B-SLL/B-CLL)</i>	50
	<i>Diffuses großzelliges B-Zell- Lymphom (DLBCL)</i>	113
	<i>Follikuläres Lymphom</i>	88
	<i>T-Zell Non-Hodgkin- Lymphom</i>	25
	<i>Mantelzell-Lymphom</i>	18
	<i>Marginalzonen-Lymphom</i>	16
	<i>Diffuses großzelliges B-Zell- Lymphom (DLBCL) im Ho- den.</i>	16
	<i>Burkitt-Lymphom</i>	5
Tumoren des Weich- teilgewebes und des Knochens	<i>Tenosynovialer Riesen- zelltumor</i>	45
	<i>Granularzelltumor</i>	53
	<i>Leiomyoma</i>	50
	<i>Leiomyosarkom</i>	87
	<i>Liposarkoma</i>	132
	<i>Maligner peripherer Nerven- scheidentumor (MPNST)</i>	13
	<i>Myofibrosarkom</i>	26
	<i>Angiosarkom</i>	73
	<i>Angiomyolipom</i>	91
	<i>Dermatofibrosarkom protu- berans (DFSP)</i>	21
	<i>Ganglioneurom</i>	14
	<i>Neurofibrom</i>	117
	<i>Sarkom, (NOS)</i>	74
	<i>Paragangliom</i>	41
	<i>Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)</i>	23
	<i>Rhabdomyosarkom</i>	6
	<i>Schwannom</i>	121
	<i>Synovialsarkom</i>	12
	<i>Osteosarkom</i>	43
	<i>Chondrosarkom</i>	38
	<i>Rhabdoider tumor</i>	5
	<i>Summe</i>	15012

Für einzelne Unterkollektive der Tumoren lagen histopathologische Malignitätsparameter wie beispielsweise pT, pN, Differenzierungsgrad, L-Status, V-Status, molekulare Daten wie Mikrosatelliten-Instabilität, BRAF-Mutationen, Östrogenrezeptorexpression, Progesteronrezeptor-Expression, HER2-Status oder klinische Verlaufsdaten wie Zeit zum Rezidiv, Rohüberleben oder tumorspezifisches Überleben zur Verfügung. Die Zusammensetzung der Unterkollektive mit vorhandenen Malignitätsparametern ist in Tabellen 5-7 dargestellt.

Tabelle 5: Histopathologische und molekularbiologische Parameter beim Kolonkarzinom.

			<i>n</i>
<i>Kolonkarzinom</i>		<i>alle Tumoren</i>	1887
	<i>pT</i>	<i>pT1</i>	69
		<i>pT2</i>	372
		<i>pT3</i>	1042
		<i>pT4</i>	363
	<i>pN</i>	<i>pN0</i>	982
		<i>pN+</i>	860
	<i>Gefäßinvasion</i>	<i>V0</i>	1336
		<i>V+</i>	476
	<i>Lymphgefäßinvasion</i>	<i>L0</i>	556
		<i>L1</i>	1279
	<i>Tumorlokalisation</i>	<i>links</i>	930
		<i>rechts</i>	385
	<i>MMR-Status</i>	<i>MS instabil</i>	71
		<i>MS stabil</i>	907
	<i>RAS-Mutationsstatus</i>	<i>RAS-Mut.</i>	226
		<i>wt</i>	292
	<i>BRAF-Mutationsstatus</i>	<i>BRAF V600E</i>	10
		<i>wt</i>	89

Tabelle 6: Histopathologische und molekularbiologische Parameter beim klarzelligen Nierenzellkarzinom.

			<i>n</i>
Klarzellige Nierenzellkarzinome (NCC)	Alle Tumoren		726
	ISUP-Grad	1	235
		2	231
		3	207
		4	43
	Fuhrmann-Grad	1	42
		2	422
		3	209
		4	52
	Thoenes-Grad	1	267
		2	390
		3	68
	UICC-Stadium	I	339
		II	37
		III	91
		IV	74
	<i>pT</i>	1	438
		2	73
		3-4	210
	<i>pN</i>	0	122
		≥1	18
	<i>pM</i>	0	108
		≥1	75

Tabelle 7: Histopathologische und molekularbiologische Parameter bei neuroendokrinen Neoplasien.

			Anzahl n
Neuroendokrine Tumoren (verschiedene Lokalisationen)	pT	pT1	24
		pT2	25
		pT3	37
		pT4	28
	pN	pN0	41
		pN+	58
Neuroendokrine Karzinome (verschiedene Lokalisation)	pT	pT1	1
		pT2	3
		pT3	10
		pT4	3
	pN	pN0	3
		pN+	13

2.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren zur Visualisierung von spezifischen Proteinen an Gewebeschnitten. Antikörper stellen das zentrale Werkzeug für die Immunhistochemie dar.

Antikörper, welche spezifisch für ein nachzuweisendes Gewebeprotein sind, werden in der Regel durch Beimpfung eines Labortiers (Maus, Ratte, Kaninchen) mit dem interessierenden Protein oder einem Teil des Proteins (Peptid) erzeugt (StGroth und Scheidegger 1980; Clark 1981; Kurose und Takikawa 1998). Antikörper produzierende Zellen dieser Labortiere werden später mit einer Myelomzelllinie fusioniert, wodurch Hybridzellen entstehen, welche von den tierischen Zellen die Eigenschaft der Antikörperbildung behalten und von den Tumorzellen die Eigenschaften der Immortalität (Köhler und Milstein 1975; StGroth und Scheidegger 1980; Clark 1981).

Die aus diesen Experimenten resultierenden später kommerziell verfügbaren Antikörper für interessierende Proteine können sich teilweise erheblich bezüglich ihres Färbeverhalten unterscheiden, was die Reproduzierbarkeit von immunhistochemischen Untersuchungen erschwert (Laflamme et al. 2021; Laflamme et al. 2019). Es ist dementsprechend bedeutsam, die Färbereigenschaften des Antikörpers, der für ein Projekt verwendet wird, genau zu kennen. Die internationale Arbeitsgruppe für Validierung von Antikörpern empfiehlt eine Validierung jedes einzelnen Antikörpers für die Anwendung, die Antikörper, die auch verwendet werden sollen (Uhlen et al.

2016). Für Antikörper zur Verwendung in der Immunhistochemie wird empfohlen eine von zwei möglichen Validierungsexperimenten durchzuführen (Uhlen et al. 2016).

Diese sind:

- 1) Der Vergleich der immunhistochemisch erzielten Daten mit Expressionsdaten, welche mit einer zweiten unabhängigen Methode (beispielsweise RNA-Analyse) gewonnen wurde (Uhlen et al. 2016).
- 2) Der Vergleich mit einem Antikörper erzielten Ergebnisse mit den Ergebnissen, welche mit einem zweiten, unabhängigen Antikörper gewonnen werden konnten (Uhlen et al. 2016).

Da Antikörper farblos sind, genügt es nicht, die Antikörper auf ein Gewebe aufzubringen. Zur Visualisierung der Antikörper-Antigenbindung werden komplexe Visualisierungssysteme verwendet, welche in einem ersten Schritt Antikörper verwenden, die sich gegen Immunglobuline der Spezies richten, in welcher der Primärantikörper hergestellt wurde.

Derartige Antikörper können mit einem Farbstoff gekoppelt sein oder mit einem anderen Element, welches in einem weiteren Schritt angefärbt werden könnte. Die gängigen Verfahren hierfür sind die direkte Methode, indirekte Methode, doppelt indirekt Methode, PAP-Methode, APAAP-Methode, EPOS-Methode, (Strept)-ABC-Methode, EnVision-Polymer-Konjugat-Methode und LSAB-Methode (Hantschke und Palmedo 2015).

Das grundlegende Prinzip eines Antikörperdetektionssystems ist in Abbildung 11 dargestellt.

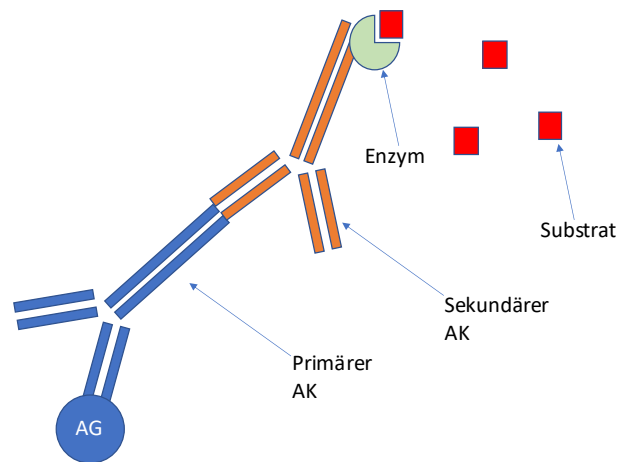


Abbildung 11: Primärantikörper bindet das interessierende Protein und wird im Anschluss von einem sekundären Antikörper gebunden, welcher mit einem Enzym gekoppelt sein kann, der eine Farbreaktion katalysiert. Dies ist das Grundlegende Prinzip der direkten Methode. Zur Ergebnisoptimierung kann man die direkte Methode in vielerlei Hinsicht modifizieren. Man kann beispielsweise einen tertiären Antikörper, anstelle eines Sekundärantikörpers ein Dextranpolymer bestehend aus einer Vielzahl von Primär- oder Sekundärantikörpern, einen mit (Strept-)Avidin beschichteten Sekundärantikörper oder Brückenantikörper verwenden. Aus Hantschke und Palmedo 2015.

Ein wesentlicher Schritt bei der immunhistochemischen Untersuchung Formalin-fixierte-Gewebe ist die hitzeinduzierte Epitop-Demaskierungsprozedur (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER).

Bei diesem Verfahren werden die für die Immunhistochemie vorgesehenen Schnitte für 5-30 Minuten in einer Flüssigkeit auf 90 -121°C erhitzt. Diese Prozedur löst zumindest zu einem großen Teil die durch die Formalin-Fixierung ausgelöste Verklebung (Crosslinking) der Proteine und macht dadurch die vom Antikörper erkannten Epitope zugänglicher (Shi et al. 1991; Krenacs et al. 2010).

Je nach Antikörper sind die Ergebnisse der HIER bei niedrigem, hohem oder neutralem pH am besten. Im Rahmen der Protokolloptimierung eines Antikörpers werden die jeweils optimalen Inkubationsbedingungen festgelegt. Das Prinzip der HIER ist in Abbildung 12 dargestellt.

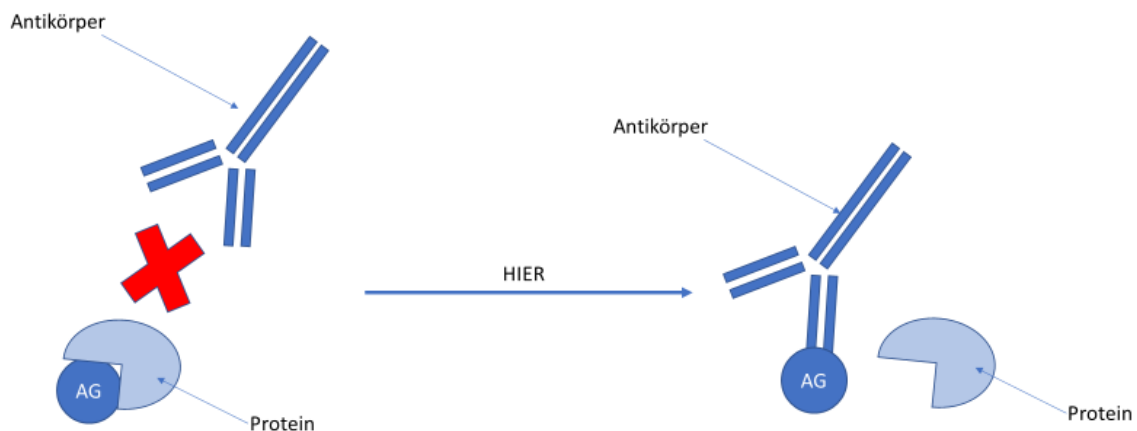


Abbildung 12: Prinzip des HIER. Nach Formalinfixierung sind Epitope durch artifizielle Vernetzung von Proteinen und Antigen für den Antikörper unzugänglich. Nach HIER kann der Antikörper das Antigen binden. Informationen aus Krenacs et al. 2010

2.4 INHA Immunhistochemie

Die zu färbenden TMA-Schnitte wurden zunächst vorbereitet, in dem sie mithilfe von Xylol deparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert wurden. Dann erfolgte zur Freilegung von potentiellen Epitopen die hitzeinduzierte Epitopdemaskierungsprozedur (HIER) im Autoklav bei 121°C mit einer Target-Retrieval-Solution in einem Puffer mit einem pH von 7,8 für 5 Minuten. Danach wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer ausgelegt und anschließend mit einer Peroxidase blockierenden Lösung für jeweils 10 Minuten behandelt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für INHA (Rekombinanter Rabbit-Antikörper, MSVA-561R, MS Validated Antibodies, GmbH, Hamburg, Germany) bei 37°C für 60 Minuten bei einer Verdünnung von 1:100. Der gebundene Antikörper wurde dann mit dem EnVision-Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA; #K5007) gemäß der Herstellerangaben visualisiert. Zum Zweck der Antikörpervalidierung wurden die Normalgewebe-TMAs auch mit einem Referenzantikörper (monoklonaler Maus-Anti-Human-INHA, Klon R1, Agilent, Santa Clara, CA, USA, Kat.-Nr. IR058) nach dem vom Hersteller vorgeschlagenen Protokoll gefärbt. Nach Antigen demaskierenden Maßnahmen wurde der TMA-Objektträger mithilfe eines DAKO-Autostainers gefärbt. Ein erfahrener Pathologe (Prof. Guido Sauter) führte die manuelle Analyse der gefärbten TMA-Objektträger durch. Hämatoxylin- und Eosin-gefärbte Schnitte wurden zum Vergleich herangezogen.

gen, wenn der Gehalt an Tumorzellen fraglich war. Für Tumorgewebe wurde der Prozentsatz positiver Tumorzellen geschätzt und die Färbeintensität semiquantitativ erfasst (0, 1+, 2+, 3+). Für die statistischen Analysen wurden die Färbeergebnisse in vier Gruppen eingeteilt. Tumoren ohne jegliche Färbung wurden als negativ eingestuft. Tumoren mit einer Färbeintensität von 1+ bei $\leq 70\%$ der Tumorzellen oder einer Intensität von 2+ bei $\leq 30\%$ der Tumorzellen wurden als schwach positiv eingestuft. Tumoren mit einer Färbeintensität von 1+ bei $> 70\%$ der Tumorzellen, einer Intensität von 2+ bei 31-70% oder einer Intensität von 3+ bei $\leq 30\%$ galten als mäßig positiv. Tumoren mit 2+ Intensität in $> 70\%$ oder 3+ Intensität in $> 30\%$ der Tumorzellen wurden als stark positiv eingestuft.

2.5 Statistik

Statistische Berechnungen wurden mit der Software JMP 14 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt. Mit Hilfe von Kontingenztabellen und dem Chi²-Test wurde nach Zusammenhängen zwischen INHA und Tumorphänotyp gesucht. Die Überlebenskurven wurden mit dem Kaplan-Meier-Verfahren berechnet. Der Log-Rank-Test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu eruieren.

3. Ergebnisse

3.1 Technische Aspekte

Von 15.012 untersuchten Tumoren erwiesen sich 12.212 am TMA als auswertbar (81%).

Ursachen von nicht auswertbaren Proben waren entweder das Fehlen von eindeutigen Tumorzellen auf einigen Gewebespots oder aber das völlige Fehlen von Gewebe an einzelnen Positionen des TMAs. Letzteres kommt in TMA-Untersuchungen regelmäßig vor, da ein Teil der Proben während der Verarbeitung vom Schnitt abschwimmen können und weil naturgemäß nicht alle in einen TMA eingebrachten Stanzzylinder gleichlang sind.

Zudem ist es schwierig, die TMA-Zylinder alle so in die vorgefertigten Löcher einzubringen, dass der Oberpol der Stanze auf dem Niveau der Blockoberfläche zu liegen kommt.

Da einige Zylinder zu tief in die vorgefertigten Löcher eingepresst werden, können diese Zylinder auf den ersten Schnitten durch den Gewebeblock nicht erfasst werden, welches in leere TMA-Positionen resultiert. Auf den tiefen Schnitten durch einen TMA-Block werden dann aber diejenigen Stanzen nicht mehr erfasst, welche besonders kurz waren und aus dünnen Paraffinblöcken entnommen waren.

3.2 INHA im Normalgewebe

Eine starke INHA-Färbung wurde in Sertoli- und Leydig-Zellen des Hodens, im Gelbkörper des Eierstocks und im Zyto- und Synzytiotrophoblasten sowie in Chorionzellen der Plazenta (stärkere Färbung im ersten Trimester als in der reifen Plazenta) und in Nebennierenrindenzellen gefunden. In den Amnion- und Deziduazellen der Plazenta sowie in Follikel-, Granulosa- und einigen Stromazellen des Eierstocks wurde eine variablere Färbungsintensität festgestellt, die von schwach positiv bis stark positiv reichte. Repräsentative Bilder von INHA-positiven Normalgeweben sind in Abbildungen 13-34 dargestellt. Alle diese Zelltypen färbten auch positiv, wenn man den Referenzantikörper R1 (Agilent, Santa Clara, CA, USA, Kat.-Nr. IR058) verwendet hatte. Disseminierte INHA-positive Epithelzellen wurden auch in der Bauchspeicheldrüse und der Adenohypophyse gefunden, welche sich jedoch nicht mit dem Referenzantikörper bestätigen ließen. INHA-Färbung wurde in keinem anderen untersuchten Gewebe beobachtet, einschließlich quergestreifter Skelettmuskulatur, Herzmuskel, glat-

ter Muskulatur, Myometrium, Fett, Übergangsepithel des Analkanals, Urothel des Nierenbeckens und der Harnblase, Lymphknoten, Milz, Thymus, Tonsile, Magen, Duodenum, Ileum, Appendix, Kolon, Rektum, Gallenblase, Leber, Glandula parotidea, Glandula submandibularis, Glandula sublingualis, Brunnersche Drüse des Duodenum, Niere, Prostata, Glandula vesiculosa, Epididymis, Bronchialdrüsen, Lunge, Mamma, Cervix uteri, Uterus, Eileiter, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Kleinhirn, Großhirn und Neurohypophyse.

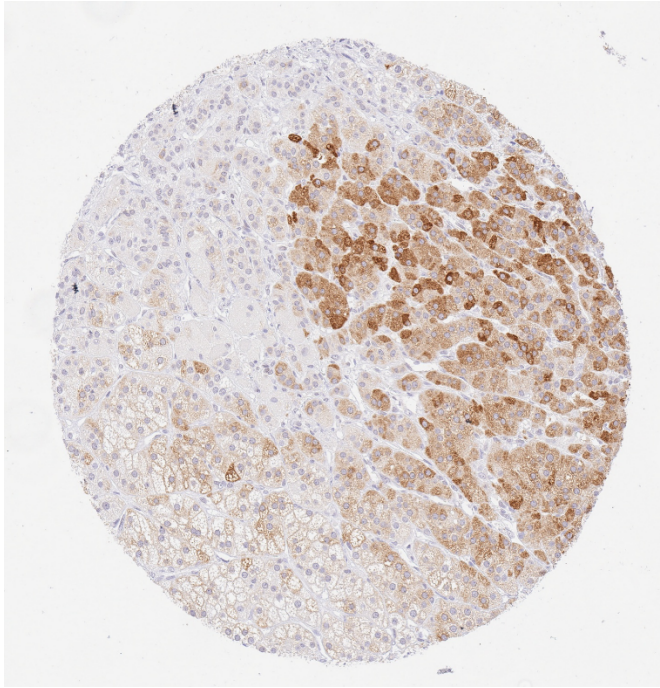


Abbildung 13: Positive zytoplasmatische Anfärbung von Nebennierenrindengewebe mit dem MSVA-561R-Antikörper.

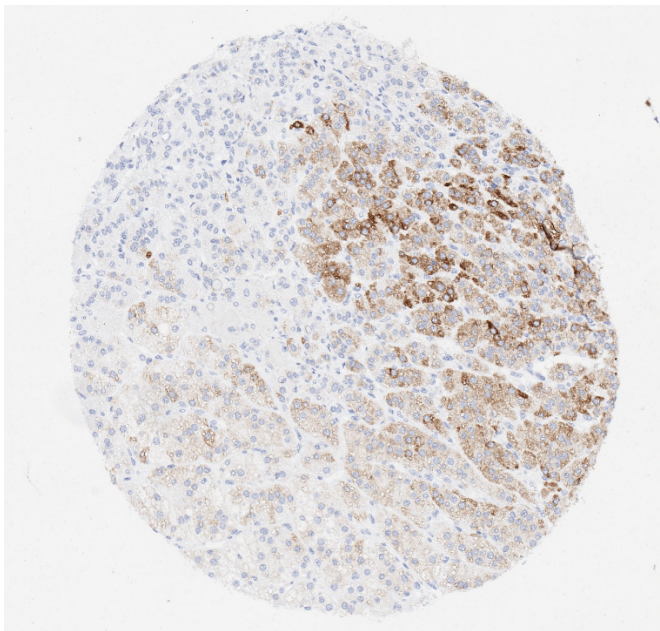


Abbildung 14: Positive Anfärbung von Nebennierenrindengewebe mit dem Referenzantikörper R1 zur Validierung.

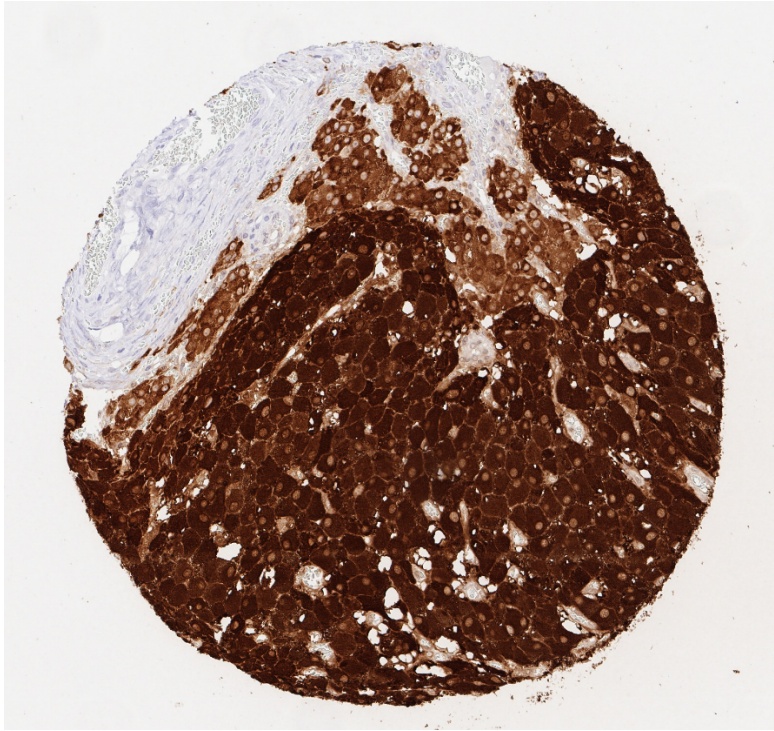


Abbildung 15: Positive Anfärbung von Normalgewebe aus dem Corpus Luteum mit dem MSVA-561R-Antikörper.

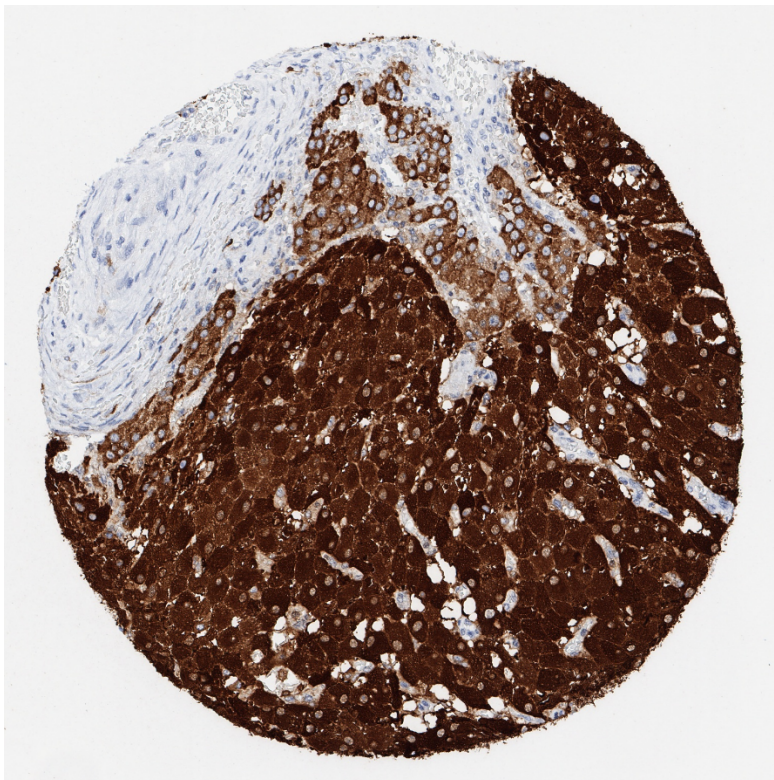


Abbildung 16: Positive Anfärbung von Normalgewebe aus dem Corpus Luteum mit dem Referenzantikörper R1 zur Validierung.

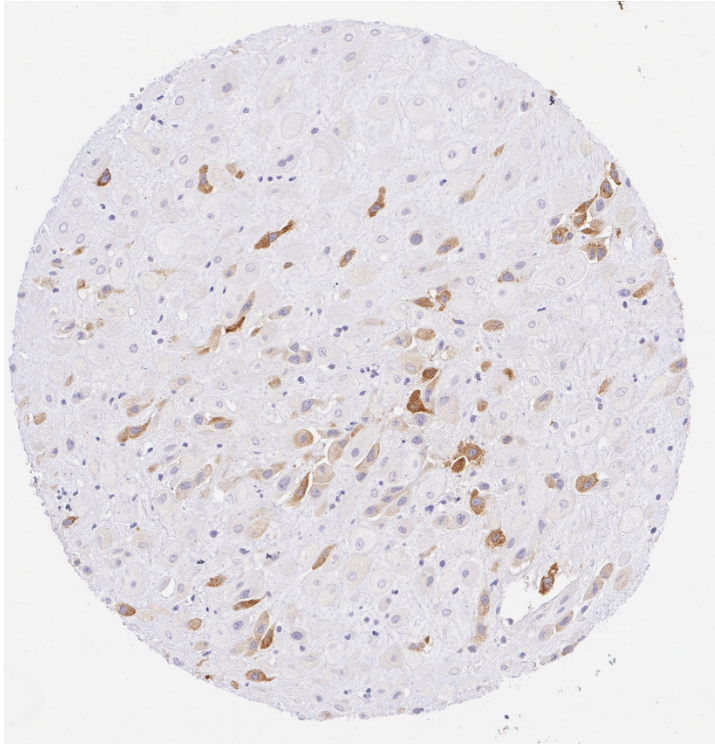


Abbildung 17: Positive Anfärbung von Normalgewebe aus der Dezidua vom Uterus mit dem MSVA-561R-Antikörper.

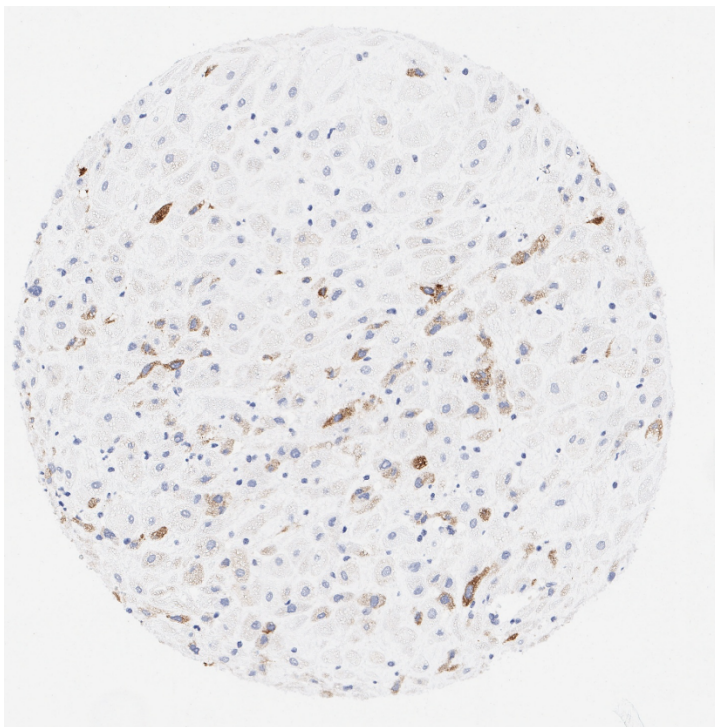


Abbildung 18: Positive Anfärbung von Normalgewebe aus der Dezidua vom Uterus mit dem Referenzantikörper R1 zur Validierung.

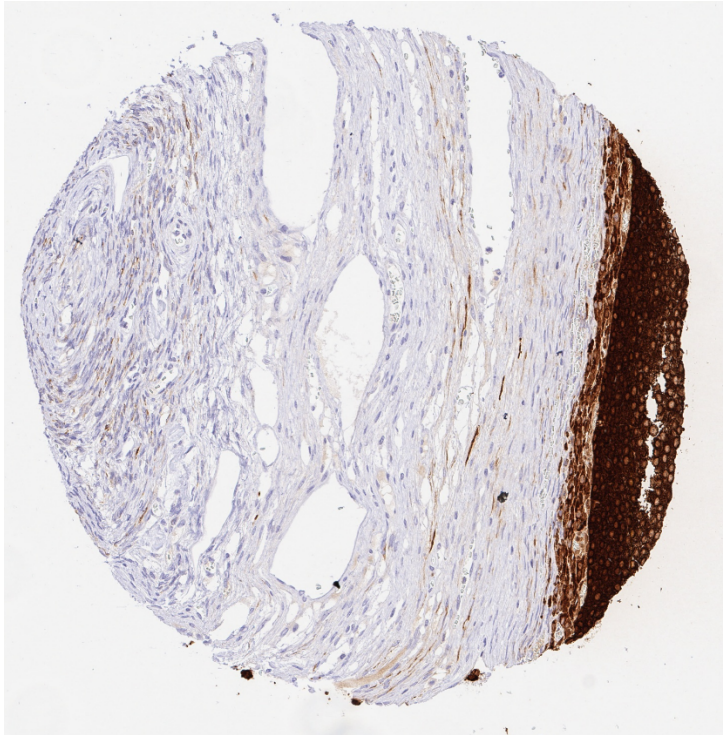


Abbildung 19: Positive Anfärbung von Thekazellen mit dem MSVA-561R-Antikörper.

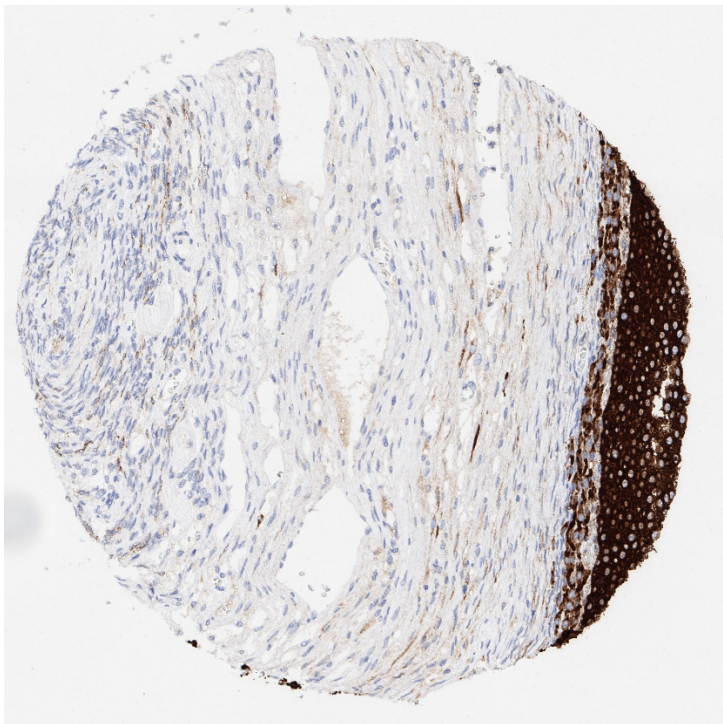


Abbildung 20: Positive Anfärbung von Thekazellen mit dem Referenzantikörper R1 zur Validierung.

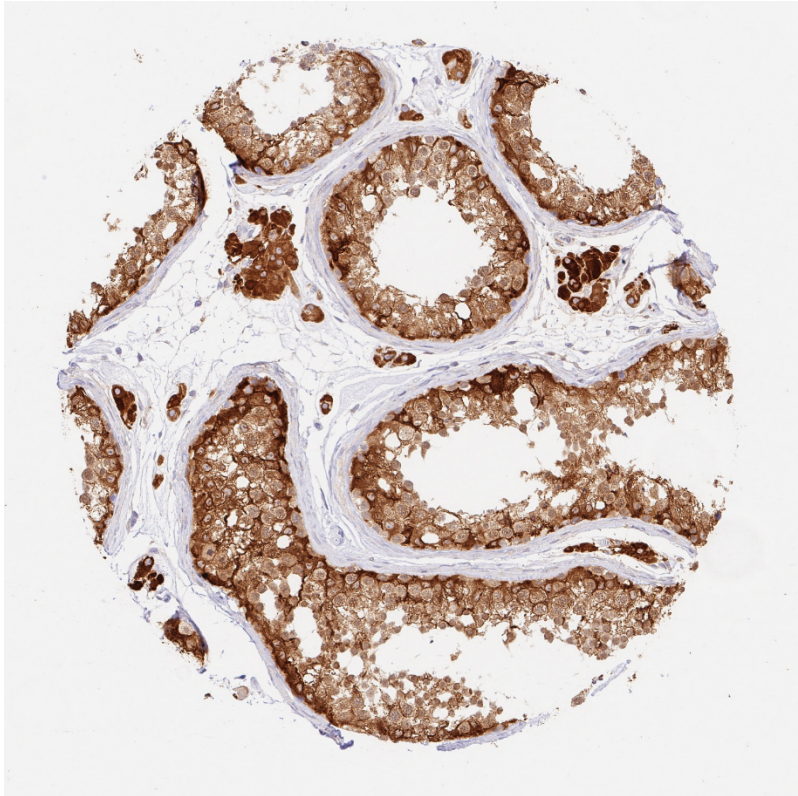


Abbildung 21: Positive Anfärbung von Sertoli und Leydigzellen mit dem MSVA-561R-Antikörper.

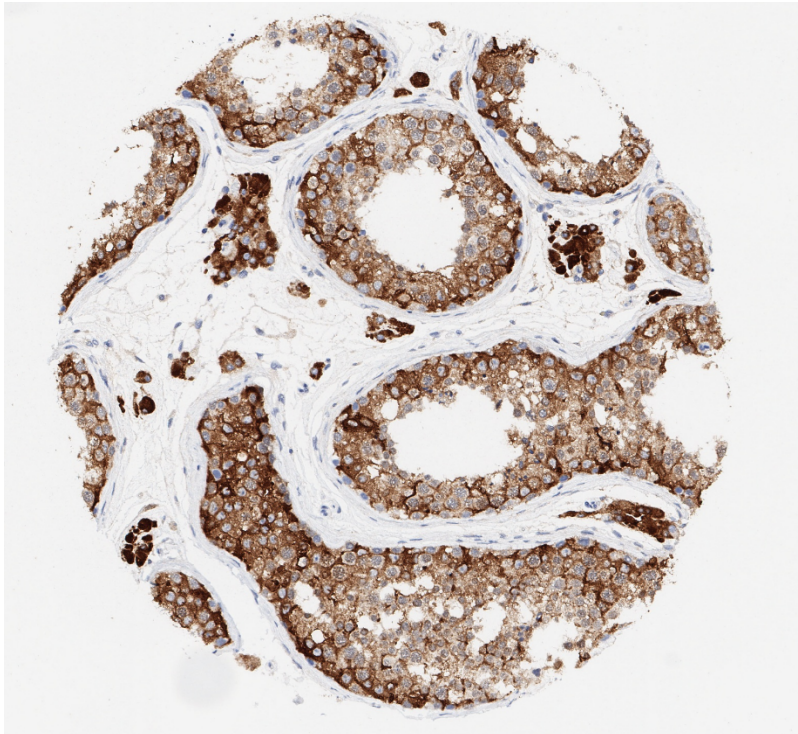


Abbildung 22: Positive Anfärbung von Sertoli und Leydigzellen mit dem Referenzantikörper R1 zur Validierung.

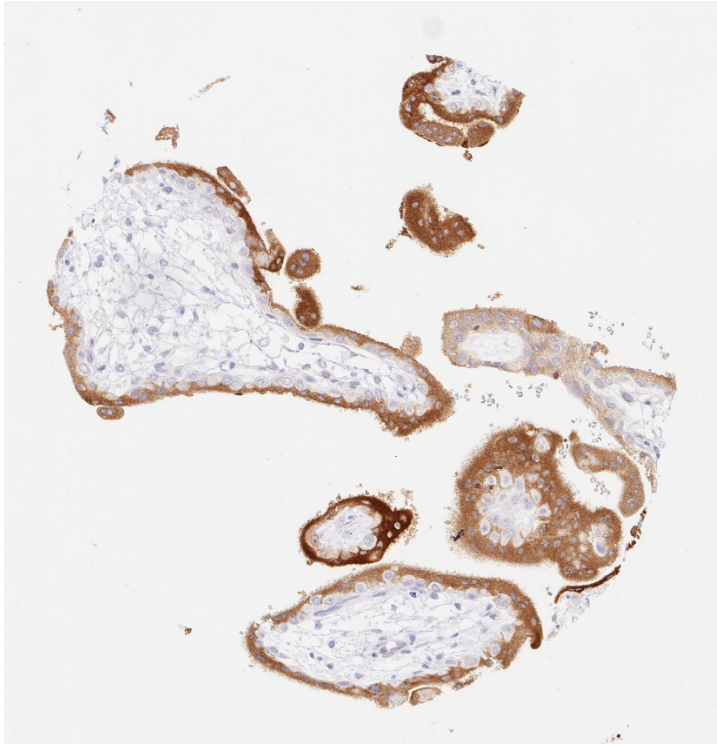


Abbildung 23: Positive Anfärbung von Trophoblasten aus einer Plazenta aus dem ersten Trimester mit dem MSVA-561R-Antikörper.

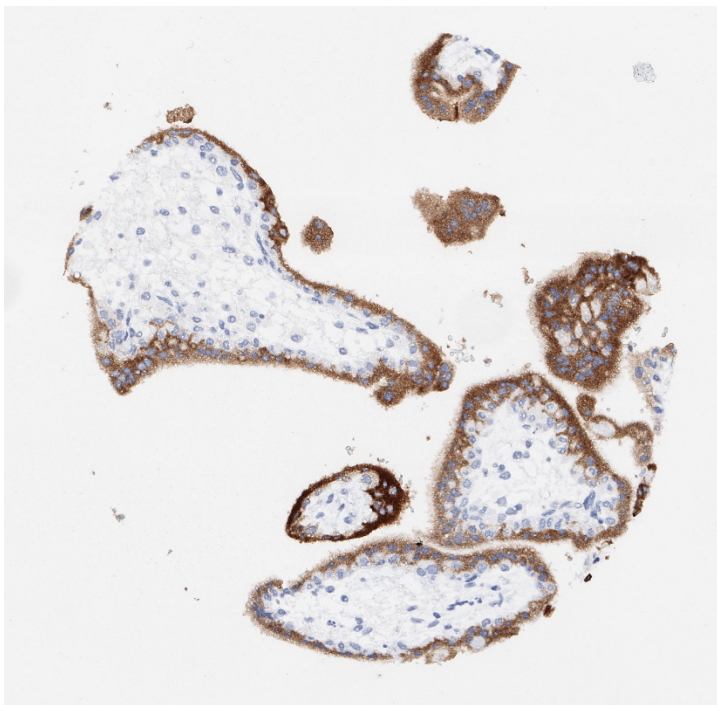


Abbildung 24: Positive Anfärbung von Trophoblasten aus einer Plazenta aus dem ersten Trimester mit dem Referenzantikörper R1 zur Validierung.

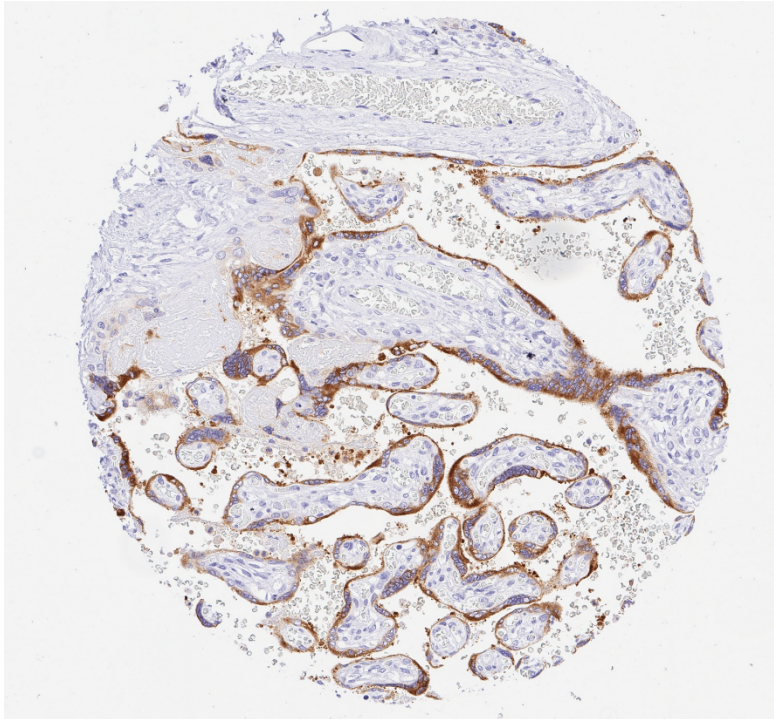


Abbildung 25: Positive Anfärbung von Normalgewebe aus einer reifen Plazenta mit dem MSVA-561R-Antikörper.

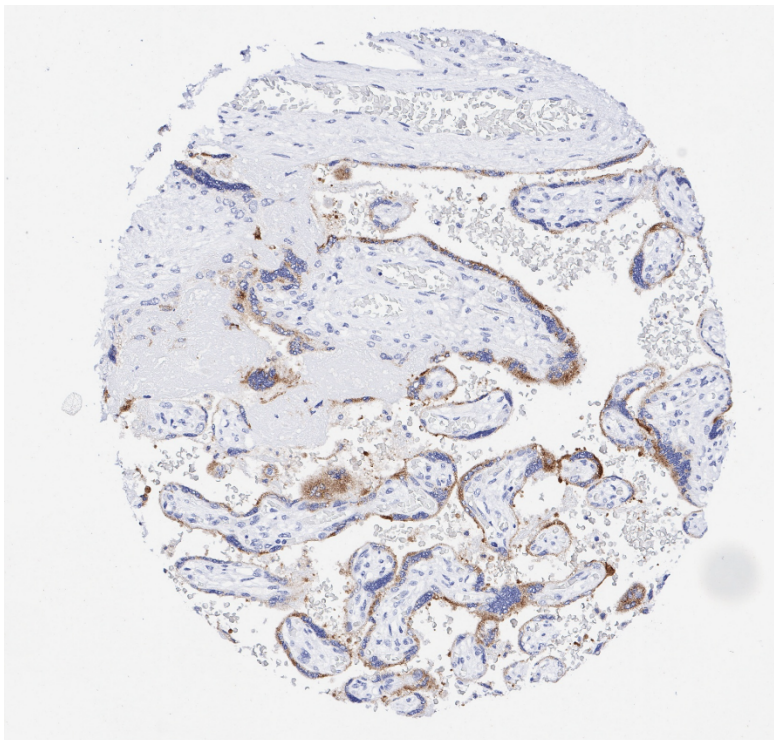


Abbildung 26: Positive Anfärbung von Normalgewebe aus einer reifen Plazenta mit dem Referenzantikörper R1 zur Validierung.

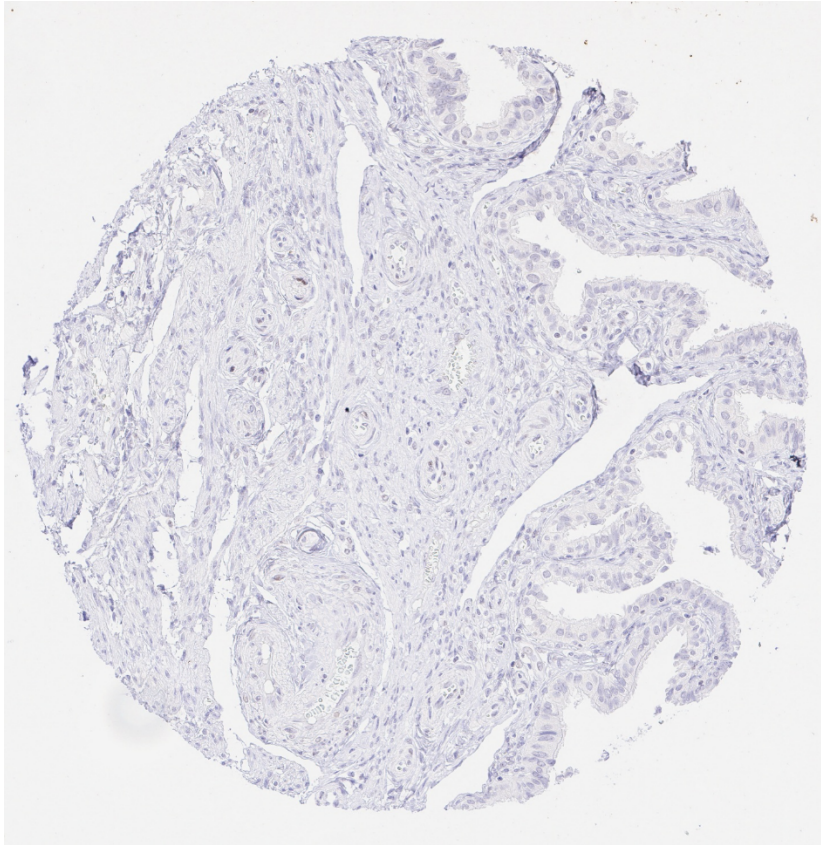


Abbildung 27: Negativer Befund bei Normalgewebe aus dem Eileiter mit dem MSVA-561R-Antikörper.

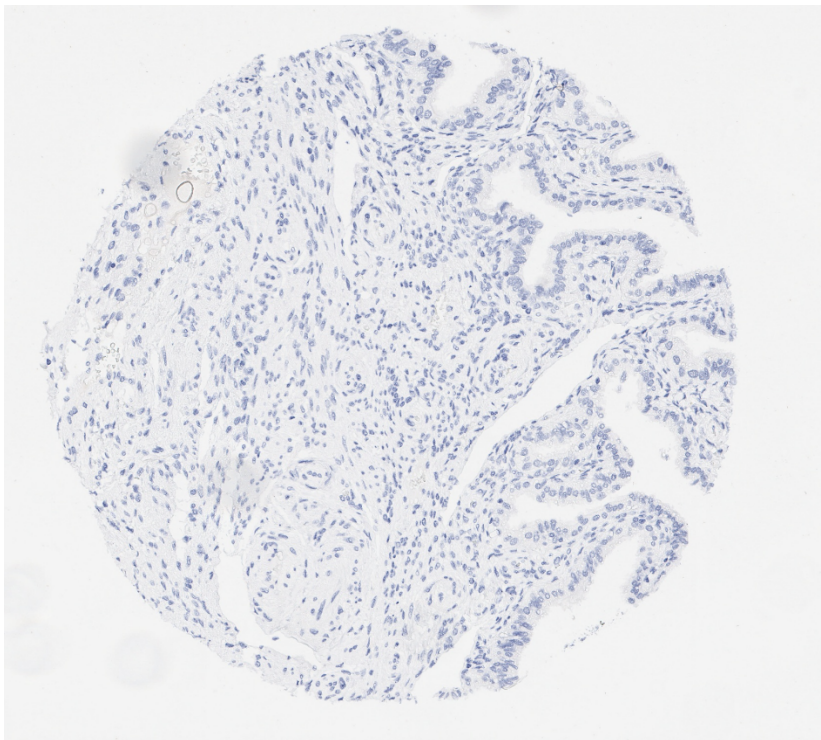


Abbildung 28: Negativer Befund bei Normalgewebe aus dem Eileiter mit dem Referenzantikörper R1.

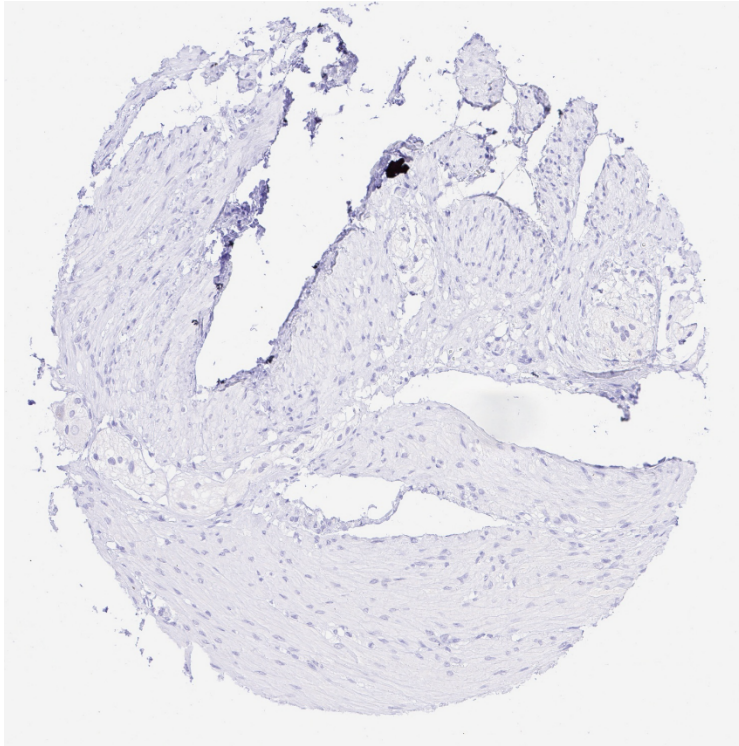


Abbildung 29: Negativer Befund bei Normalgewebe aus dem Kolon mit dem MSVA-561R-Antikörper.

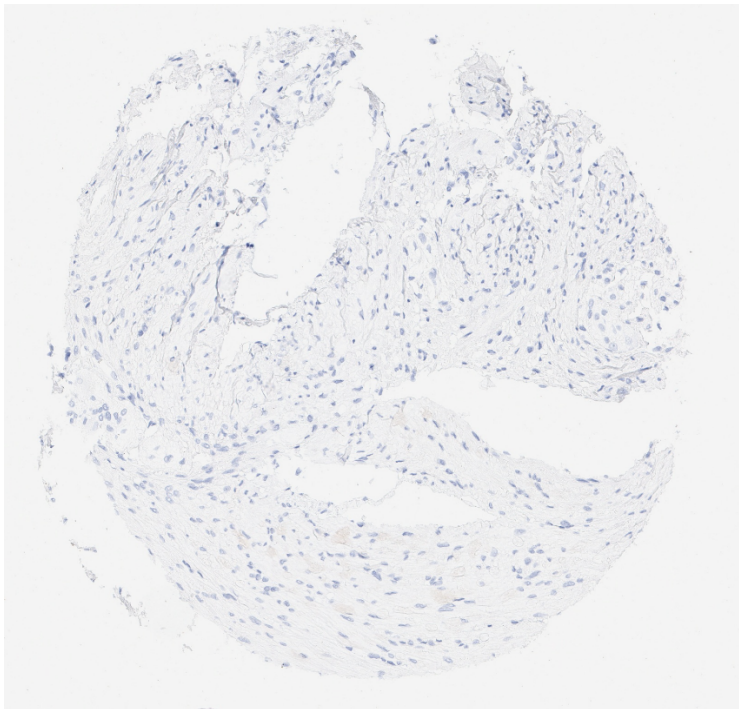


Abbildung 30: Negativer Befund bei Normalgewebe aus dem Kolon mit dem Referenzantikörper R1.

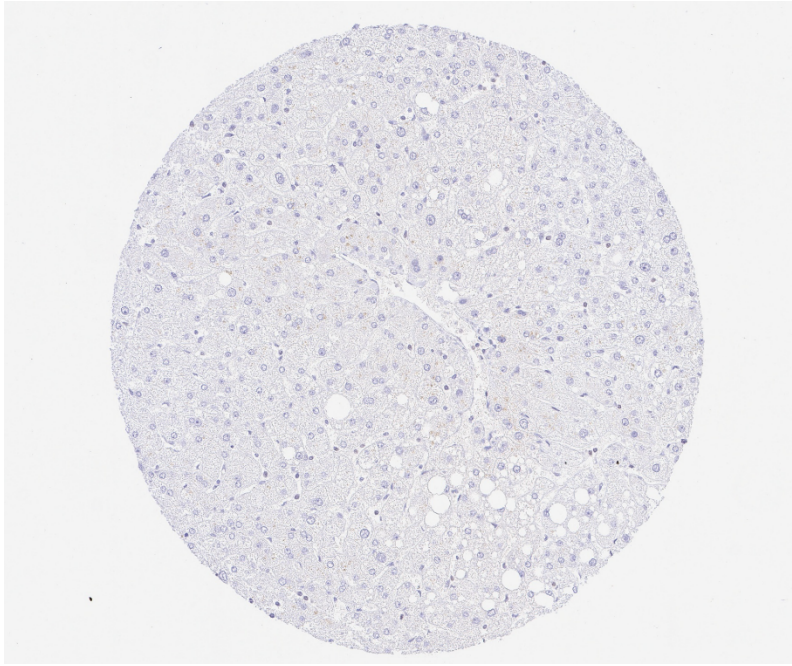


Abbildung 31: Negativer Befund bei Normalgewebe aus der Leber mit dem MSVA-561R-Antikörper.

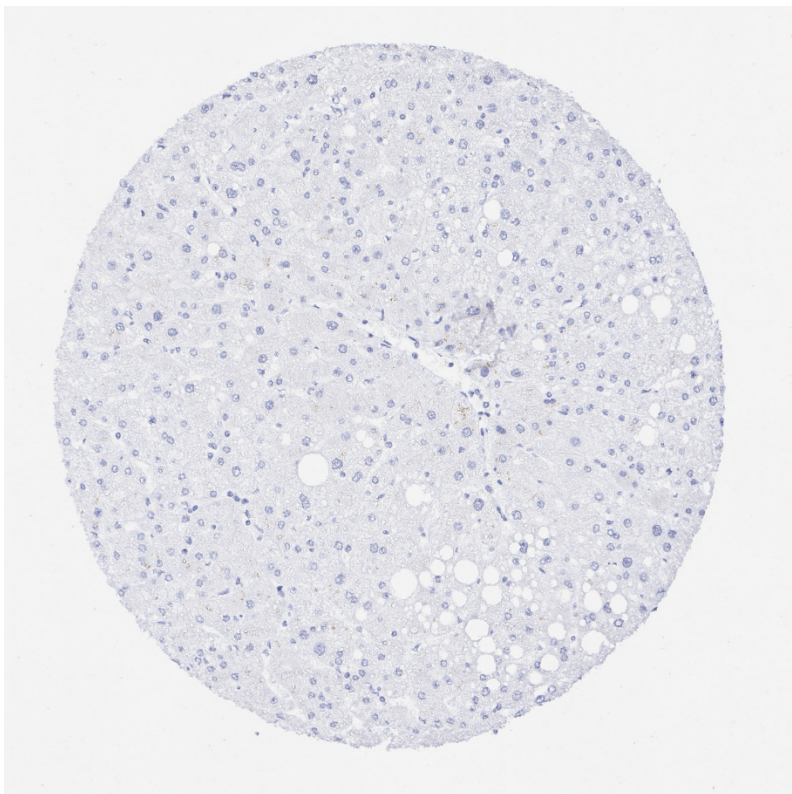


Abbildung 32: Negativer Befund bei Normalgewebe aus der Leber mit dem Referenzantikörper R1.

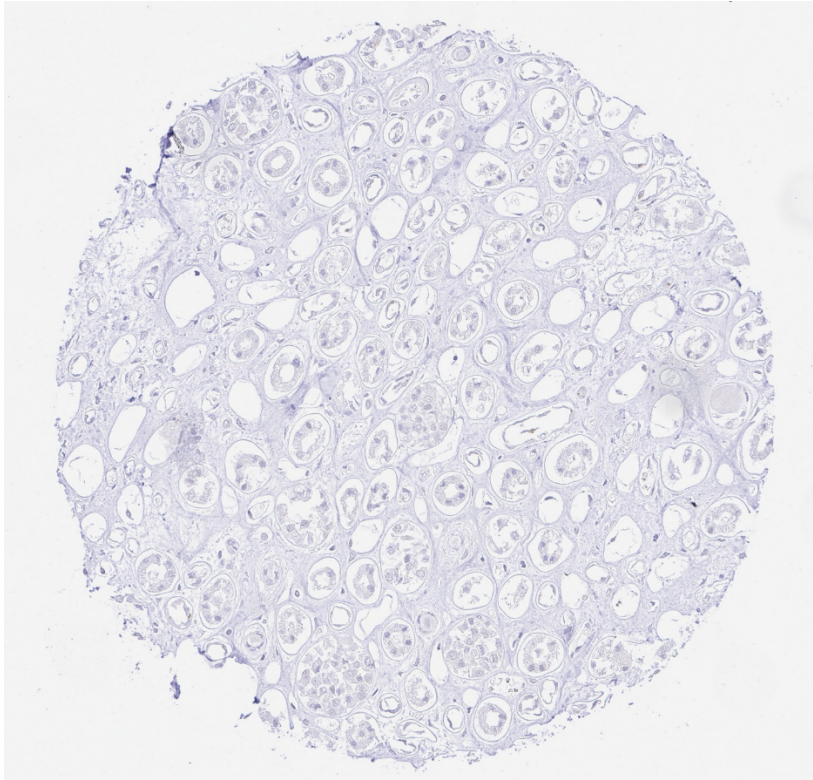


Abbildung 33: Negativer Befund bei Normalgewebe aus dem Nierenmark mit dem MSVA-561R-Antikörper.

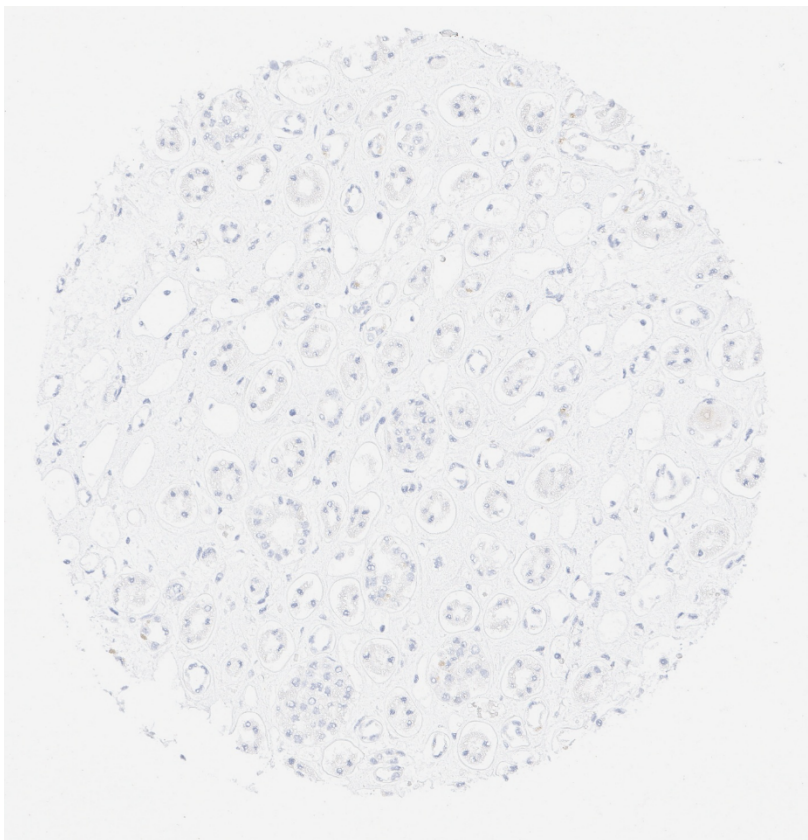


Abbildung 34: Negativer Befund bei Normalgewebe aus dem Nierenmark mit dem Referenzantikörper R1.

3.3 INHA in Karzinomen

Eine positive INHA-Immunfärbung fand sich in 583 (4,8%) unsere 12.212 anfärbbaren Tumoren, wobei in 351 Tumoren (2,9%) eine schwache, in 66 Tumoren (0,5%) eine mäßig starke und in 167 Tumoren (1,4%) eine starke INHA-Positivität festgestellt wurde.

Insgesamt 72 (54%) von 134 in dieser Studie untersuchten Tumorkategorien zeigten in mindestens einem Fall eine zumindest schwache INHA-Färbung. In immerhin 26 (19 %) unserer Tumorkategorien fand sich mindestens ein Tumor mit einer starken INHA-Positivität.

Repräsentative Bilder von INHA positiven Tumoren sind in Abbildung 35-42 dargestellt.

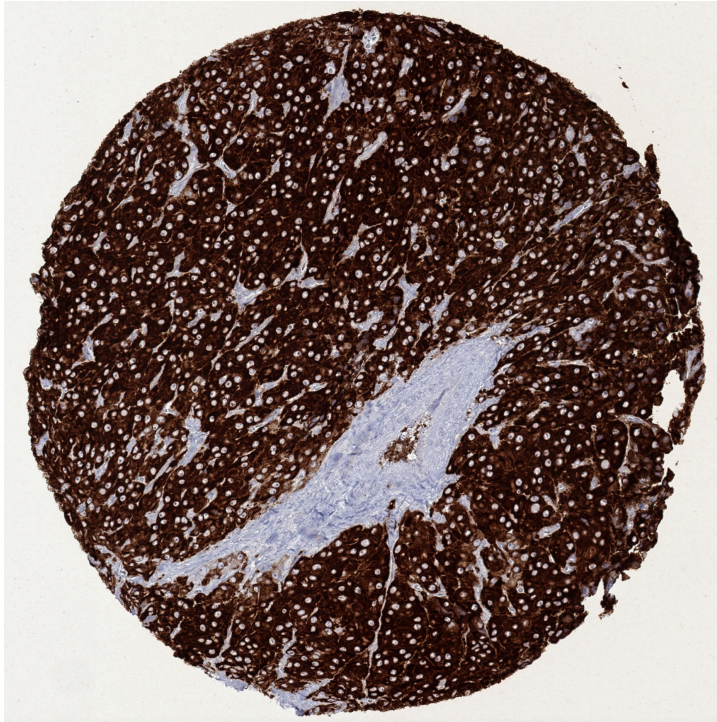


Abbildung 35: Eine stark positive Anfärbung von einem Leydigzelltumor aus dem Hoden.

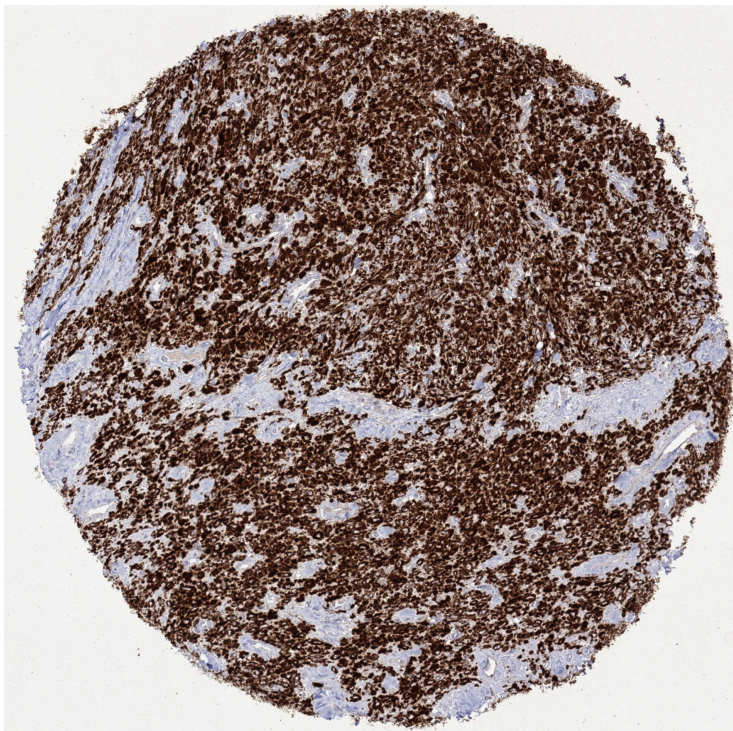


Abbildung 36: Eine stark positive Anfärbung eines Granulosazelltumors aus dem Ovar.

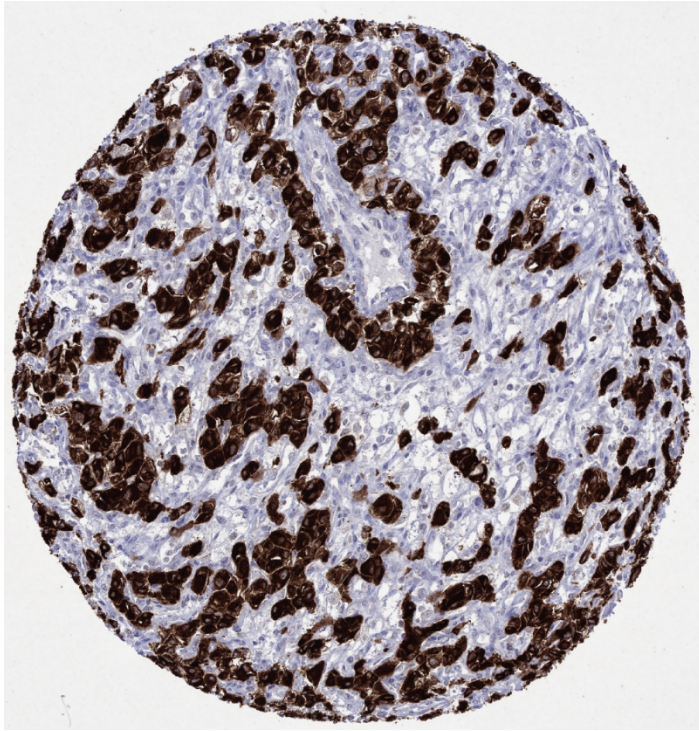


Abbildung 37: Eine stark positive Anfärbung eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms.

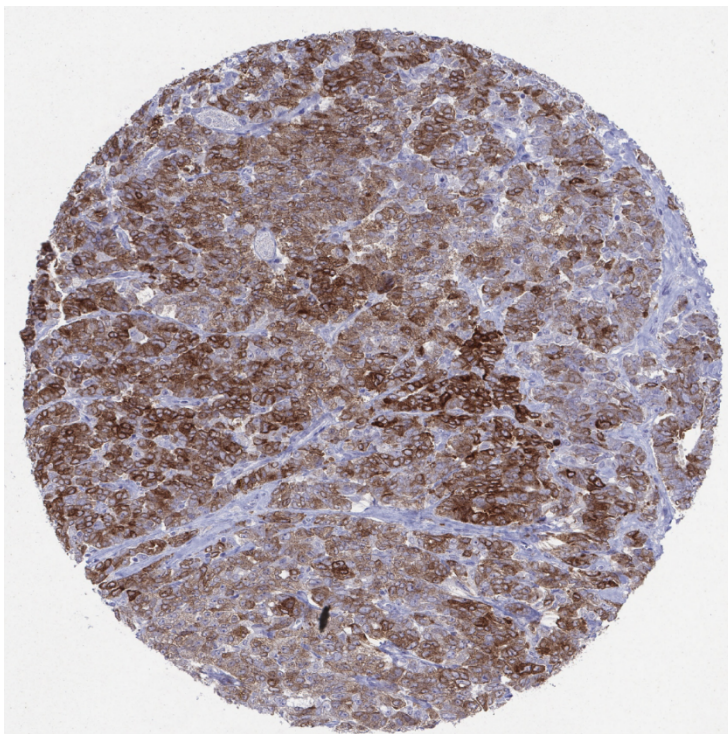


Abbildung 38: Eine mäßig positive bis stark positive Anfärbung eines Azinuszellkarzinoms des Pankreas.

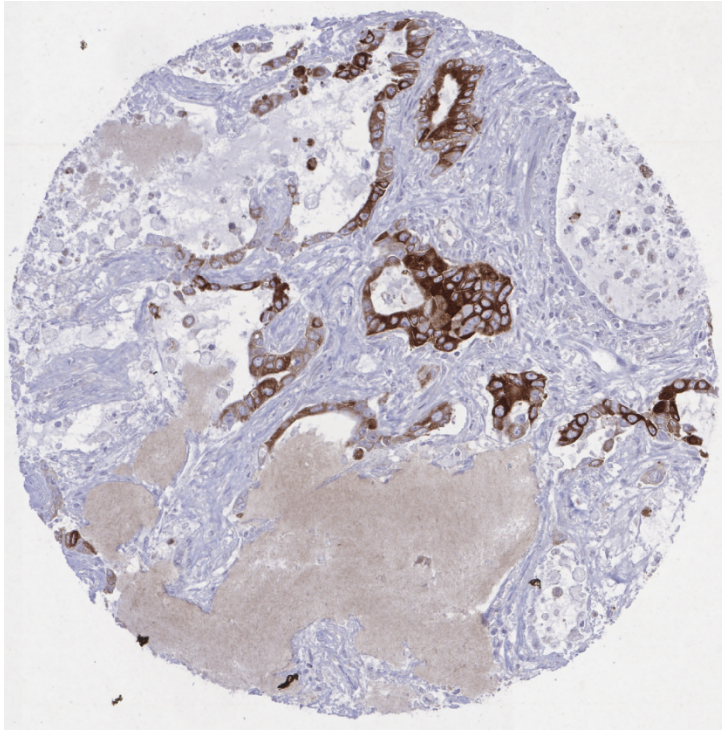


Abbildung 39: Eine fokale mäßig bis stark positive Anfärbung eines Adenokarzinoms der Lunge.

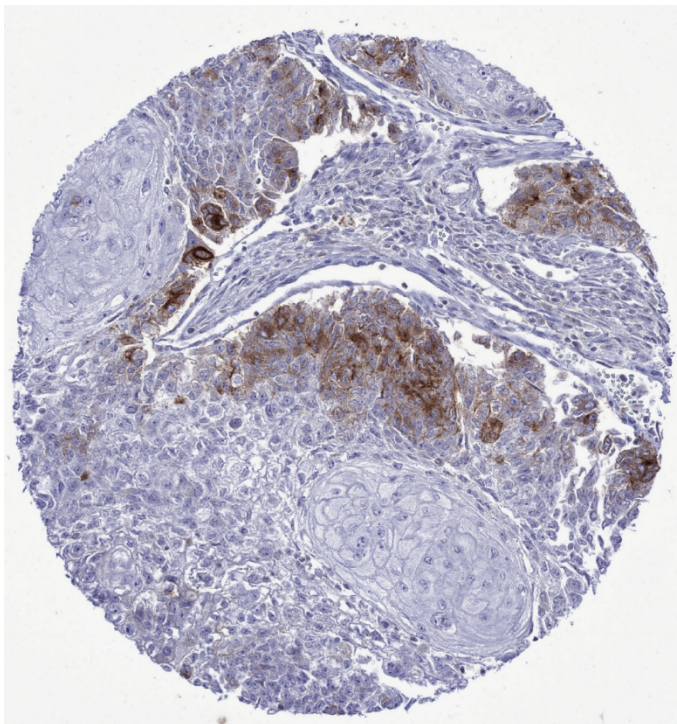


Abbildung 40: Eine fokale Anfärbung von epithelialen Komponenten eines malignen Müller-Mischtumors/Karzinomarkoms.

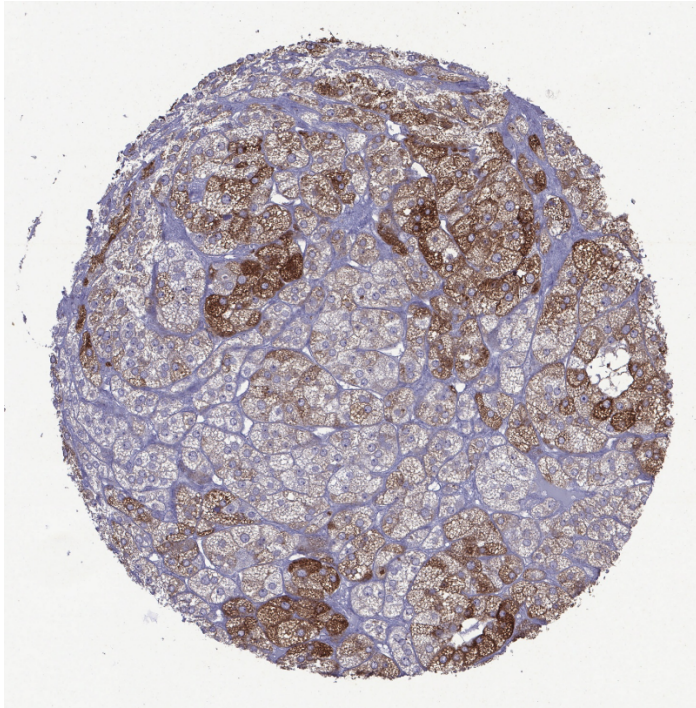


Abbildung 41: Eine mäßig positive bis stark positive Anfärbung eines Nebennierenadenoms.

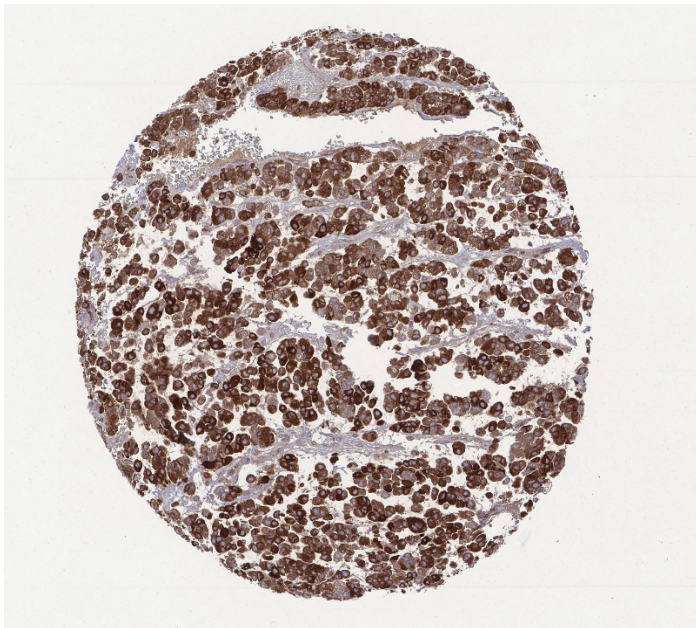


Abbildung 42: Eine stark positive Anfärbung eines Nebennierenkarzinoms.

Die Ergebnisse der Untersuchung sind organsystematisch dargestellt in Tabelle 8 gezeigt.

Tabelle 8: Ergebnisse der INHA-IHC bei den einzelnen Tumorentitäten.

	Tumorentität	auf TMA (n)	verwertbar (n)	negativ (%)	schwach positiv (%)	mäßig positiv (%)	stark positiv (%)
Tumoren der Haut	Pilomatrixom	35	33	100,0	0,0	0,0	0,0
	Basalzellkarzinom	88	77	100,0	0,0	0,0	0,0
	Benigner Nävus	29	23	100,0	0,0	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom der Haut	90	83	100,0	0,0	0,0	0,0
	Malignes Melanom	48	43	100,0	0,0	0,0	0,0
	Malignes Melanom mit Lymphknotenmetastasierung	87	84	100,0	0,0	0,0	0,0
	Merkelzellkarzinom	46	39	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren des Kopfs und des Nackens	Plattenepithelkarzinom des Larynx	110	102	95,1	4,9	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom des Pharynx	60	60	100,0	0,0	0,0	0,0
	Orales Plattenepithelkarzinom des Mundboden	130	128	98,4	1,6	0,0	0,0
	Pleomorphes Adenom der Parotisdrüse	50	44	100,0	0,0	0,0	0,0
	Warthintumor der Parotis	49	46	100,0	0,0	0,0	0,0
	Basalzelladenom der Speicheldrüse	15	14	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren der Lunge, der Pleura und des Thymus	Adenokarzinom der Lunge	246	122	82,0	13,1	2,5	2,5
	Plattenepithelkarzinom der Lunge	130	48	95,8	4,2	0,0	0,0
	Kleinzelliges Karzinom der Lunge	20	13	92,3	0,0	7,7	0,0
	Epitheloides Mesotheliom	39	23	91,3	4,3	4,3	0,0
	Mesotheliom, sonstige	76	53	98,1	1,9	0,0	0,0
	Thymom	29	27	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren des weiblichen Genitaltrakts	Plattenepithelkarzinom der Vagina	78	53	100,0	0,0	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom der Vulva	130	123	99,2	0,8	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom der Zervix	130	126	98,4	1,6	0,0	0,0

	Tumorentität	auf TMA (n)	verwertbar (n)	negativ (%)	schwach positiv (%)	mäßig positiv (%)	stark positiv (%)
	Adenokarzinom der Zervix	21	21	100,0	0,0	0,0	0,0
	Endometrioides Endometriumkarzinom	236	217	88,5	10,1	0,9	0,5
	Seröses Endometriumkarzinom	82	66	100,0	0,0	0,0	0,0
	Karzinom des Uterus	48	43	90,7	7,0	2,3	0,0
	Endometriumkarzinom, high grade, G3	13	12	83,3	8,3	0,0	8,3
	Klarzelliges Endometriumkarzinom	8	7	71,4	28,6	0,0	0,0
	Endometrioides Ovarialkarzinom	110	84	90,5	8,3	1,2	0,0
	Seröses Ovarialkarzinom	559	360	89,4	10,3	0,3	0,0
	Muzinöses Ovarialkarzinom	96	68	97,1	2,9	0,0	0,0
	Klarzelliges Ovarialkarzinom	50	39	92,3	7,7	0,0	0,0
	Karzinom des Ovars	47	37	89,2	8,1	2,7	0,0
	Granulosazelltumor des Ovars	37	36	0,0	0,0	2,8	97,2
	Leydigzelltumor des Ovars	4	4	0,0	0,0	0,0	100,0
	Sertolizelltumor des Ovars	1	1	0,0	0,0	100,0	0,0
	Sertoli-Leydigzelltumor des Ovars	3	3	0,0	0,0	0,0	100,0
	Steroidzelltumor des Ovars	3	3	0,0	0,0	0,0	100,0
	Brenner-Tumor	41	37	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren der Brust	Invasives Mammakarzinom (NST)	126	74	95,9	4,1	0,0	0,0
	Lobuläres Mammakarzinom	123	98	99,0	1,0	0,0	0,0
	Medulläres Mammakarzinom	15	15	100,0	0,0	0,0	0,0
	Tubuläres Mammakarzinom	18	15	100,0	0,0	0,0	0,0
	Muzinöses Mammakarzinom	22	15	100,0	0,0	0,0	0,0
	Phylloider Brusttumor	50	48	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren des Verdauungstrakts	Adenomatöser Polyp, low-grade Dysplasie	50	45	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenomatöser Polyp, high-grade Dysplasie	50	47	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenokarzinom des Kolons	2532	1960	97,0	2,7	0,3	0,1
	Adenokarzinom des Magens, diffuser Typ	226	130	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenokarzinom des Magens, intestinaler Typ	224	154	98,1	1,3	0,0	0,6
	Adenokarzinom des Magens, gemischer Typ	62	43	97,7	2,3	0,0	0,0

	Tumorentität	auf TMA (n)	verwertbar (n)	negativ (%)	schwach positiv (%)	mäßig positiv (%)	stark positiv (%)
	Adenokarzinom des Öso- phagus	133	82	100,0	0,0	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	124	70	97,1	2,9	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom des Analkanals	91	80	98,8	1,3	0,0	0,0
	Cholangiozelluläres Karzi- nom	114	95	78,9	13,7	1,1	6,3
	Hepatozelluläres Karzinom	50	48	100,0	0,0	0,0	0,0
	Duktales Adenokarzinom des Pankreas	662	322	97,5	2,2	0,3	0,0
	Pankreatisch-ampulläres Karzinom	119	57	100,0	0,0	0,0	0,0
	Azinuszellkarzinom des Pankreas	16	15	20,0	33,3	20,0	26,7
	Gastrointestinaler Stroma- tumor (GIST)	50	47	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren der Harnwege	Nicht invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2 low grade	177	133	100,0	0,0	0,0	0,0
	Nicht invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2 high grade	141	106	99,1	0,9	0,0	0,0
	Nicht invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G3	219	163	99,4	0,6	0,0	0,0
	Urothelkarzinom, pT2-4 G3	1322	1051	97,1	2,7	0,1	0,2
	Plattenepithelkarzinom der Blase	22	21	100,0	0,0	0,0	0,0
	Kleinzelliges neuroendokri- nes Karzinom der Blase	18	17	94,1	5,9	0,0	0,0
	Sarkomatoides Urothelkar- zinom	25	11	100,0	0,0	0,0	0,0
	Urothelkarzinom (Nierenbe- cken)	62	62	98,4	1,6	0,0	0,0
	Klarzelliges Nierenzellkarzi- nom	858	771	97,5	1,3	0,1	1,0
	Papilläres Nierenzellkarzi- nom	255	223	99,6	0,4	0,0	0,0
	Klarzelliges (tubuläres) papilläres Nierenzellkarzi- nom	21	20	70,0	5,0	5,0	20,0
	Chromophobes Nierenzell- karzinom	131	113	98,2	1,8	0,0	0,0
	Onkozytom	177	156	100,0	0,0	0,0	0,0

	Tumorentität	auf TMA (n)	verwertbar (n)	negativ (%)	schwach positiv (%)	mäßig positiv (%)	stark positiv (%)
Tumoren der männlichen Geni- talorgane	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 3+3	83	83	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 4+4	80	79	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 5+5	85	85	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenokarzinom der Prostata (Rekurrenz)	261	220	99,1	0,9	0,0	0,0
	Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom der Prostata	17	15	100,0	0,0	0,0	0,0
	Seminom	621	591	98,0	1,7	0,2	0,2
	Embryonales Karzinom des Hodens	50	22	100,0	0,0	0,0	0,0
	Leydigzelltumor des Hodens	30	30	0,0	0,0	0,0	100,0
	Sertolizelltumor des Hodens	2	2	0,0	0,0	50,0	50,0
	Keimstrang-Stromatumor des Hodens	1	1	0,0	0,0	0,0	100,0
	Spermatozytischer Tumor des Hodens	1	1	100,0	0,0	0,0	0,0
	Dottersacktumor	50	25	100,0	0,0	0,0	0,0
	Teratom	50	34	91,2	8,8	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom des Penis	80	80	98,8	0,0	1,3	0,0
Tumoren der endokrinen Organe	Schilddrüsenadenom	114	100	99,0	1,0	0,0	0,0
	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	392	251	84,5	13,1	2,4	0,0
	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	158	112	97,3	2,7	0,0	0,0
	Medulläres Schilddrüsenkarzinom	107	91	94,5	5,5	0,0	0,0
	Nebenschilddrüsenadenom	43	42	100,0	0,0	0,0	0,0
	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	45	43	95,3	4,7	0,0	0,0
	Nebennierenadenom	50	28	7,1	14,3	32,1	46,4
	Nebennierenkarzinom	26	25	20,0	36,0	20,0	24,0
	Phäochromozytom	50	49	93,9	4,1	2,0	0,0
	Neuroendokriner Tumor der Appendix (NET)	22	13	84,6	15,4	0,0	0,0

	Tumorentität	auf TMA (n)	verwertbar (n)	negativ (%)	schwach positiv (%)	mäßig positiv (%)	stark positiv (%)
	Neuroendokriner Tumor des Kolonrektums (NET)	11	7	71,4	28,6	0,0	0,0
	Neuroendokriner Tumor des Ileums (NET)	49	42	92,9	7,1	0,0	0,0
	Neuroendokriner Tumor der Lunge (NET)	19	17	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokriner Tumor des Pankreas (NET)	98	85	80,0	8,2	2,4	9,4
	Neuroendokrines Karzinom des Kolonrektums (NEC)	12	7	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokrines Karzinom der Gallenblase (NEC)	4	3	66,7	33,3	0,0	0,0
	Neuroendokrines Karzinom des Pankreas (NEC)	14	14	85,7	14,3	0,0	0,0
Tumoren des hämatopoeti- schen und lym- phatischen Sys- tems	Hodgkin-Lymphom	103	95	100,0	0,0	0,0	0,0
	Kleinzelliges B-Zelllymphom (B-SLL/B-CLL)	50	50	100,0	0,0	0,0	0,0
	Diffuses großzelliges B- Zelllymphom (DLBCL)	114	114	99,1	0,0	0,0	0,9
	Follikuläres Lymphom	88	87	100,0	0,0	0,0	0,0
	T-Zell-Non-Hodgkin- Lymphom	24	24	95,8	0,0	0,0	4,2
	Mantelzell-Lymphom	18	18	100,0	0,0	0,0	0,0
	Marginalzonen-Lymphom	16	15	100,0	0,0	0,0	0,0
	Diffuses großzelliges B- Zelllymphom (DLBCL) im Hoden	16	16	100,0	0,0	0,0	0,0
	Burkitt-Lymphom	5	2	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren des Weichteilgewebes und des Kno- chens	Tenosynovialer Riesen- zelltumor	45	37	100,0	0,0	0,0	0,0
	Granularzelltumor	53	31	0,0	0,0	12,9	87,1
	Leiomyom	50	48	100,0	0,0	0,0	0,0
	Leiomyosarkom	87	79	94,9	3,8	1,3	0,0
	Liposarkom	132	107	100,0	0,0	0,0	0,0

Tumorentität	<i>auf TMA (n)</i>	<i>verwertbar (n)</i>	<i>negativ (%)</i>	<i>schwach positiv (%)</i>	<i>mäßig positiv (%)</i>	<i>stark positiv (%)</i>
<i>Maligner peripherer Nerven- scheidentumor (MPNST)</i>	13	11	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>Myofibrosarkom</i>	26	26	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>Angiosarkom</i>	73	55	72,7	14,5	12,7	0,0
<i>Angiomyolipom</i>	91	65	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>Dermatofibrosarkom protu- berans (DFSP)</i>	21	14	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>Ganglioneurom</i>	14	14	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>Neurofibrom</i>	117	111	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>Sarkom, (NOS)</i>	75	67	98,5	0,0	0,0	1,5
<i>Paragangliom</i>	41	41	92,7	2,4	2,4	2,4
<i>Primitiver neuroektoderma- ler Tumor (PNET)</i>	23	13	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>Rhabdomyosarkom</i>	7	6	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>Schwannom</i>	121	115	97,4	2,6	0,0	0,0
<i>Synovialsarkom</i>	12	8	75,0	12,5	12,5	0,0
<i>Osteosarkom</i>	43	28	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>Chondrosarkom</i>	38	15	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>Rhabdoider tumor</i>	5	5	100,0	0,0	0,0	0,0

Die höchsten INHA Positivitätsraten und auch die stärkste Expression fand sich in verschiedenen Typen von Keimbahn-Stroma-Tumoren des Hoden und des Ovars (jeweils zu 100 % positiv), in Granularzelltumoren (100% positiv), Nebennierenadenomen (92,9% positiv), Nebennierenkarzinomen (80% positiv) und in Azinuszellkarzinom des Pankreas (80 % positiv). 60 zusätzliche Tumorentitäten zeigten zwar auch in einem Teil der Fälle eine INHA Immunfärbung doch war diese nicht nur weniger häufig, sondern war meistens auch weniger stark ausgeprägt als bei den zuvor genannten Tumoren.

Hervorzuheben ist, dass sich in Ovar immer wieder eine auffällige peritumorale Ansammlung von INHA positiven Stromazellen fand, welche die INHA negativen Tumorzellen teilweise „wallartig“ umgaben. Dieses Phänomen schien unabhängig vom

Tumortyp zu sein und fand sich sowohl bei gutartigen Brennertumoren (Abbildung 43) wie auch bei hochaggressiven serösen Ovarialkarzinomen (Abbildung 44).

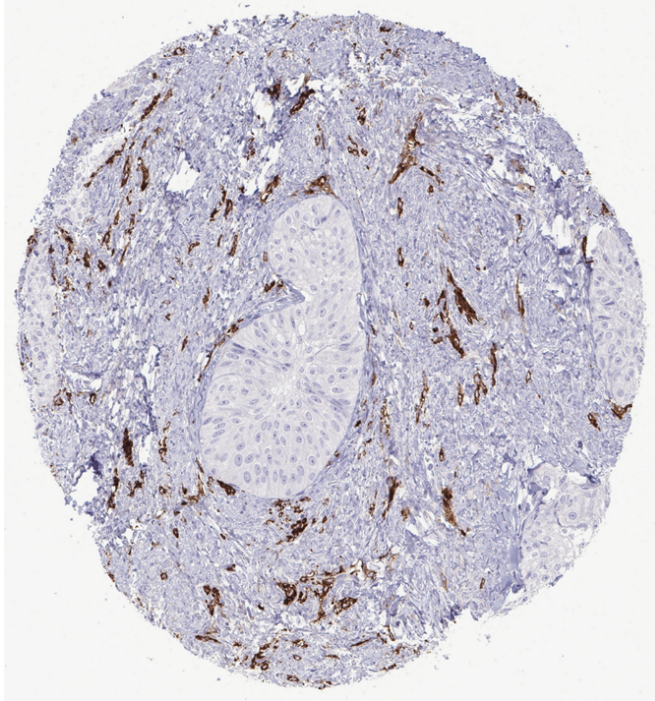


Abbildung 43: Stark positive Anfärbung von Stromakomponenten in Brennertumoren. Die epitheliale Komponente ist negativ.

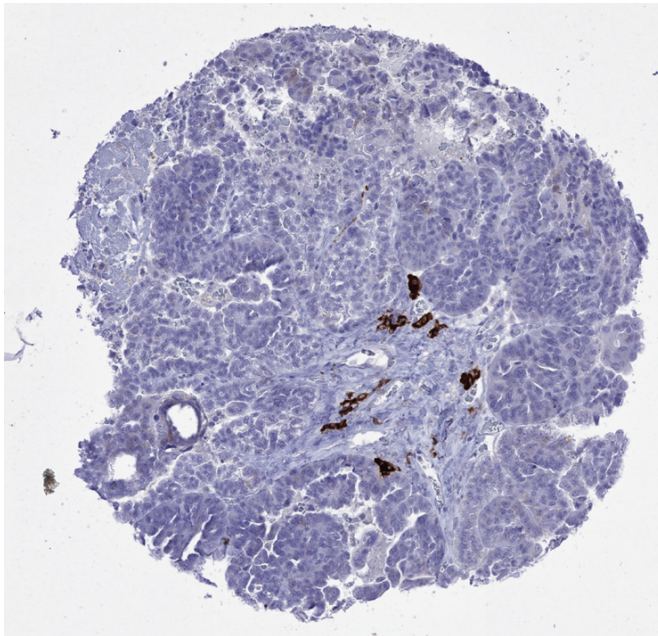


Abbildung 44: Stark positive Anfärbung von Stromakomponenten in serösen Ovarialkarzinomen. Die epitheliale Komponente ist negativ

3.4 INHA, Tumorphänotyp und Prognose

Die Beziehung zwischen der INHA-Expression und histopathologischen bzw. klinischen Parametern für Tumoraggressivität ließ sich bei kolorektalen Adenokarzinomen, klarzelligen Nierenzellkarzinomen und neuroendokrinen Tumoren evaluieren. Diese Tumorarten ermöglichten derartige statistische Evaluationen, weil einerseits eine ausreichende Fallzahl untersucht worden war und auch eine ausreichend große Zahl von positiven und negativen Befunden vorlag, welche eine statistische Analyse ermöglichten.

3.4.1 INHA und Tumorphänotyp beim Kolonkarzinom

Von 1.887 auswertbaren Kolonkarzinomen mit verfügbaren histopathologischen sowie molekularbiologischen Parametern zeigten 2 (0,1 %) eine starke, 6 (0,3%) eine mäßiggradige und 49 (2,6%) eine schwache INHA-Expression. Die Beziehung der INHA-Expression zu histopathologischen und aus frühen Studien gewonnenen molekularen Informationen ist in Tabelle 9 dargestellt. Trotz der geringen Zahl von INHA positiven Kolonkarzinomen fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer INHA-Positivität und dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen ($p=0,0321$).

Tabelle 9: IHC-Ergebnisse von einzelnen Unterkollektiven von Kolonkarzinomen.

	n	INHA IHC (Kolonkarzinom)				p
		negativ	Schwach positiv	Mäßig positiv	Stark positiv	
alle Tumoren	1887	97.0	2.6	0.3	0.1	
pT1	69	100.0	0.0	0.0	0.0	0.2243
pT2	372	98.7	1.1	0.3	0.0	
pT3	1042	96.4	3.3	0.3	0.1	
pT4	363	96.4	3.3	0.3	0.0	
pN0	982	97.9	1.8	0.3	0.0	0.0494
pN+	860	95.9	3.7	0.2	0.1	
V0	1336	97.5	2.2	0.2	0.0	0.1005
V+	476	95.6	4.2	0.2	0.0	
L0	556	97.3	2.5	0.2	0.0	0.784
L1	1279	96.9	2.7	0.3	0.1	
links	930	97.2	2.8	0.0	0.0	0.2291
rechts	385	97.7	2.1	0.3	0.0	
MS instabil	71	97.2	2.8	0.0	0.0	0.8868
MS stabil	907	97.5	2.5	0.0	0.0	
RAS Mut.	226	94.7	5.3	0.0	0.0	0.0814
wt	292	97.6	2.4	0.0	0.0	
BRAF V600E	10	100.0	0.0	0.0	0.0	0.5117
wt	89	97.8	2.2	0.0	0.0	
CD8+ T-Zelldichte	1251	271±13	121±80	12±453	0±0	0.1545

3.4.2 INHA, Tumorphänotyp und Prognose beim klarzelligen Nierenzellkarzinom

Bei 726 bezüglich der INHA-Expression auswertbaren Tumoren und gleichzeitig vorhandenen histopathologischen sowie molekularbiologischen Parametern zeigten 6 (0,8%) eine starke, 1 (0,1%) eine mäßig starke und 10 (1,4%) eine schwache Positivität. Die Beziehung zwischen der INHA-Expression und histopathologischen Malignitätsparametern ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: IHC-Ergebnisse von einzelnen Unterkollektiven vom klarzelligen Nierenzellkarzinoms

		INHA IHC (klarzellige NCC)					p
		n	negativ	Schwach positiv	Mäßig positiv	Stark positiv	
Klarzellige NCC		726	97.7	1.4	0.1	0.8	
ISUP	1	235	99.6	0.0	0.0	0.4	0.0801
	2	231	96.1	2.2	0.0	1.7	
	3	207	97.6	1.4	0.5	0.5	
	4	43	95.3	4.7	0.0	0.0	
Fuhrmann	1	42	100.0	0.0	0.0	0.0	0.2987
	2	422	97.6	1.2	0.0	1.2	
	3	209	98.1	1.0	0.5	0.5	
	4	52	94.2	5.8	0.0	0.0	
Thoenes	1	267	99.3	0.7	0.0	0.0	0.0498
	2	390	96.9	1.3	0.3	1.5	
	3	68	95.6	4.4	0.0	0.0	
UICC	1	339	98.2	0.9	0.0	0.9	0.2994
	2	37	100.0	0.0	0.0	0.0	
	3	91	97.8	1.1	1.1	0.0	
	4	74	95.9	4.1	0.0	0.0	
pT	1	438	97.9	1.1	0.0	0.9	0.3615
	2	73	98.6	0.0	0.0	1.4	
	3-4	210	96.7	2.4	0.5	0.5	
pN	0	122	96.7	0.8	0.8	1.6	0.4863
	≥1	18	94.4	5.6	0.0	0.0	
pM	0	108	98.1	0.9	0.0	0.9	0.225
	≥1	75	96.0	4.0	0.0	0.0	

Dabei zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer INHA-Expression und einem hohen Malignitätsgrad nach Thoenes ($p=0,0498$). Die Beziehung zwischen der INHA-Expression und dem rezidiv freien Überleben, dem Gesamtüberleben und dem tumorspezifischen Überleben von Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen ist in den Abbildungen 45-47 dargestellt. Die Darstellung zeigt eine Tendenz zur ungünstigen Prognose bei den wenigen INHA positiven Tumoren. Der Zusammenhang mit der Prognose war hier jedoch nicht statistisch signifikant ($p > 0,20$).

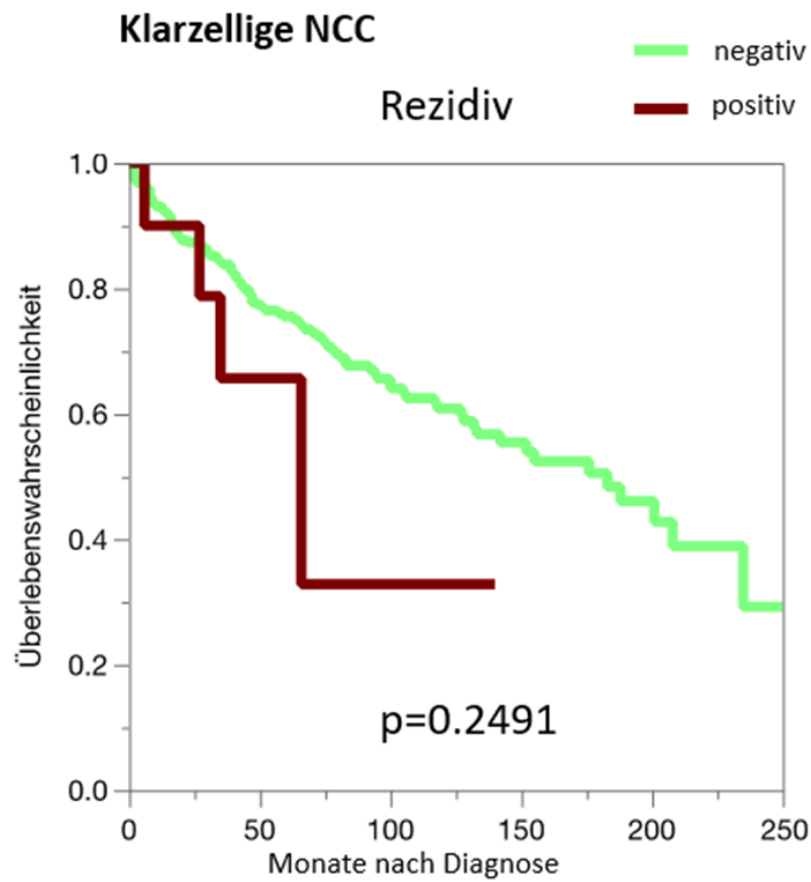


Abbildung 45: Unterschied zwischen positiver und negativer Inhibinexpression beim klarzelligen NCC in Bezug auf den Parameter „rezidivfreies Überleben“.

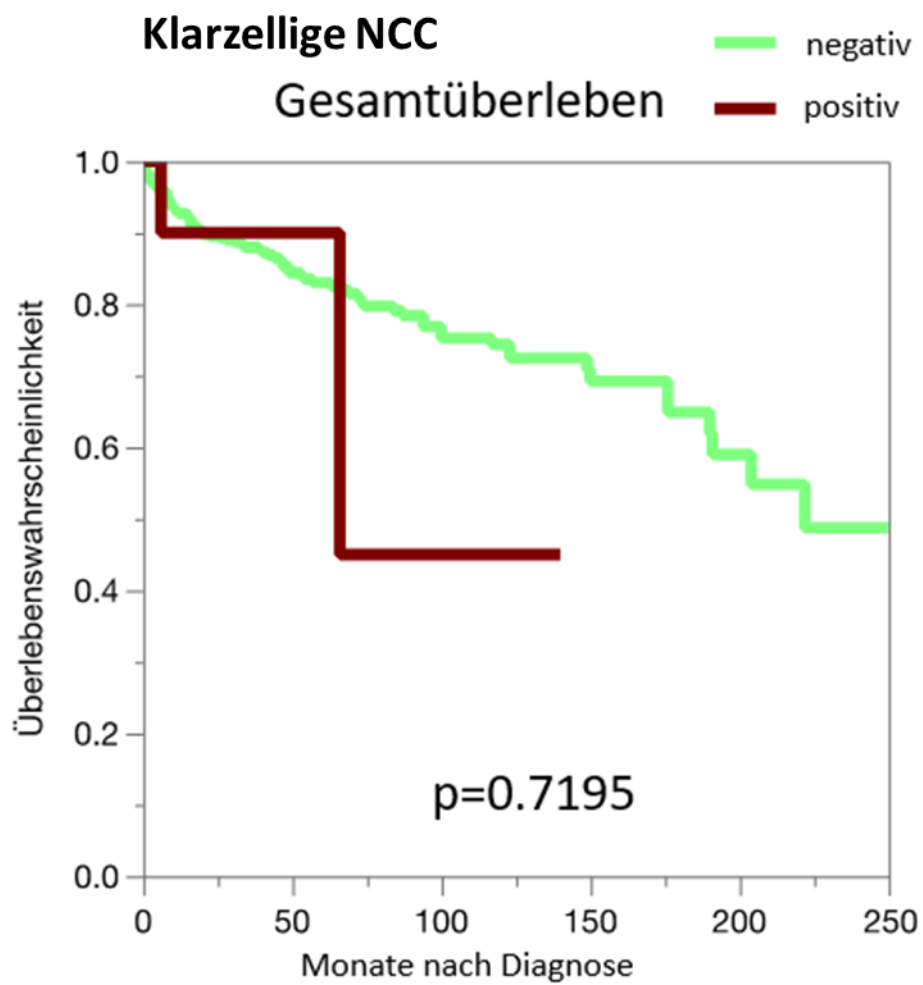


Abbildung 46: Unterschied zwischen positiver und negativer Inhibinexpression beim klarzelligen NCC in Bezug auf den Parameter „Gesamtüberleben“.

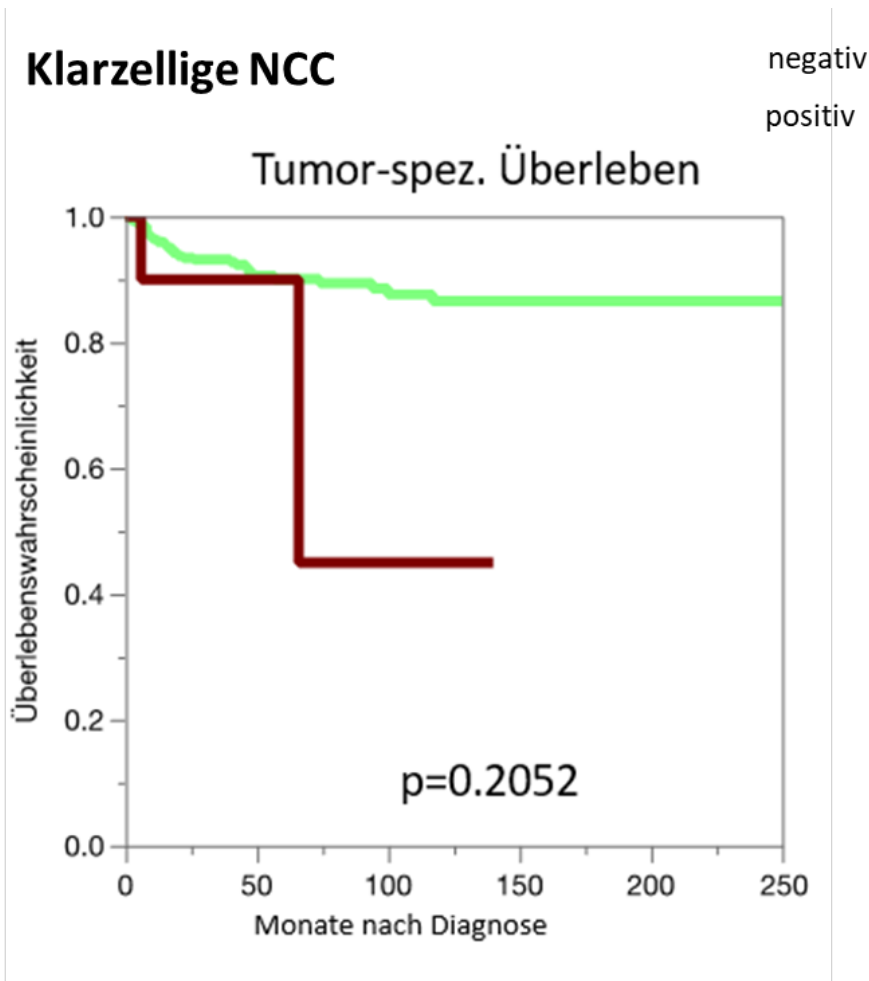


Abbildung 47: Unterschied zwischen positiver und negativer Inhibinexpression beim klarzelligen NCC in Bezug auf den Parameter „tumor-spez. Überleben“.

3.4.3 INHA und Tumorphänotyp bei neuroendokrinen Tumoren

Insgesamt 125 neuroendokrine Tumoren waren bezüglich der INHA-Expression sowie ihrer histopathologischen Parameter auswertbar.

Diese neuroendokrinen Tumoren stammten aus dem Appendix (n=13), Kolorektum (n=6), Ileum (n=42), Lunge (n=17) und dem Pankreas (n=47). Die Beziehung zwischen der INHA-Expression und pT bzw. pN-Stadium ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: IHC-Ergebnisse und Unterkollektive von neuroendokrinen Tumoren (NET) und Karzinomen (NEC).

		INHA IHC						
		n	negativ	Schwach positiv	Mäßig positiv	Stark positiv	p	
Appendix NET		13	84.6	15.4	0.0	0.0		
Kolonrektum NET		6	66.7	33.3	0.0	0.0		
Ileum NET		42	92.9	7.1	0.0	0.0		
Lunge NET		17	100.0	0.0	0.0	0.0		
Pankreas NET		47	80.9	6.4	4.3	8.5		
Kolonrektum NEC		7	100.0	0.0	0.0	0.0		
Gallenblase NEC		3	66.7	33.3	0.0	0.0		
Pankreas NEC		11	81.8	18.2	0.0	0.0		
NET	pT1	24	91.7	8.3	0.0	0.0	0.3256	
	pT2	25	88.0	8.0	0.0	4.0		
	pT3	37	78.4	8.1	5.4	8.1		
	pT4	28	92.9	7.1	0.0	0.0		
	pN0	41	92.7	7.3	0.0	0.0	0.0824	
	pN+	58	82.8	6.9	3.4	6.9		
NEC	pT1	1	100.0	0.0	0.0	0.0	0.5112	
	pT2	3	100.0	0.0	0.0	0.0		
	pT3	10	80.0	20.0	0.0	0.0		
	pT4	3	100.0	0.0	0.0	0.0		
	pN0	3	100.0	0.0	0.0	0.0	0.3443	
	pN+	13	84.6	15.4	0.0	0.0		

Dabei zeigt sich eine Tendenz zu vermehrter INHA-Expression bei nodal positiven Tumoren (18,6% negativ) als bei nodalen negativen Tumoren (7,3 % positiv), doch erreicht dieser Unterschied keine statistische Signifikanz ($p = 0,0824$).

4. Diskussionen

Unsere Studie ist die mit Abstand größte durchgeführte Untersuchungen zum immunhistochemischen Nachweis von INHA in humanen Tumoren. Die von uns identifizierten 79 früheren Studien hatten zusammengekommen 4193 Tumoren von 45 verschiedenen Entitäten untersucht. Diese sind 66% weniger Tumoren und 67% weniger Entitäten als in unserer Studie. Die ungewöhnlich ausgedehnte UKE-Studie wurde ermöglicht durch die Kombination eines sehr großen Gewebearchivs und eine über viele Jahre andauernden Projektes, welches darauf abzielt, eine immer größere Zahl von immer besser charakterisierten Tumoren in einem TMA-Format für Forschungszwecke zugänglich zu machen. Wenn eine so große Zahl an Tumoren, wie im vorliegenden Projekt immunhistochemisch untersucht werden sollen, ist es von größter Bedeutung, im Vorfeld der Studie sicherzustellen, dass ein optimales immunhistochemisches Protokoll mit optimalen Reagenzien entwickelt wird. Die internationale Arbeitsgruppe für die Validierung von Antikörpern (International Working Group for Antibody Validation, IWGAV) hat festgestellt, dass die Performance von Antikörpern abhängig vom verwendeten Verfahren stark variieren kann, da die Bedingungen, unter denen es zu einer Antikörper-Epitop-Bindung kommt, nicht einheitlich und somit nicht vergleichbar sind (Uhlen et al. 2016). Folglich kann man beispielsweise nur schwer auf Grundlage der Performance eines Antikörpers im ELISA Rückschlüsse auf dessen Eignung von im Western-Blot schließen (Uhlen et al. 2016). Bei der Immunhistochemie ist das zentrale Problem in der Anwendung von Antikörpern an Formalin fixierten Geweben die regelmäßig vorkommende Modifikation aller Proteine eines Präparates durch die Formalin bedingte Protein Vernetzung. Durch den Einfluss des Formalins auf die Proteinstruktur können die vielen Epitope des Proteins so verändert werden, dass sie für die Antikörper nicht mehr zugänglich sind. Gleichzeitig kann die fixationsbedingte Modifikation anderer Proteine dazu führen, dass diese nun auch von einem Antikörper erkannt werden, welcher am unfixierten Präparat nicht zu einer relevanten Bindung geführt hätte (Uhlen et al. 2016). Um eine Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit von Studien, an denen Antikörper beteiligt sind, zu gewährleisten, ist eine Standardisierung zur Validierung von Antikörpern von Nöten (Uhlen et al. 2016). Diesbezüglich schlägt die IWGAV unter Anderem 5 Eckpfeiler von Validierungsverfahren vor, von denen mindestens 1 Eckpfeiler erfüllt sein, damit ein Antikörper als valide gilt (Uhlen et al. 2016). Verfahren, welche die IWGAV beispielsweise für die Anwendung „Immunhistochemie“ an Formalin fixierten Geweben akzeptiert,

sind unter anderem ein Vergleichen von Formalin fixierten Geweben gewonnenen immunhistochemischen Befunden mit Daten einer anderen, an gleichen Geweben durchgeführten Expressionsuntersuchungen wie beispielsweise eine RNA-Analyse im Sinne einer „orthogonalen Validierung“ oder aber ein Vergleich mit einem zweiten unabhängigen Antikörper, welcher ebenfalls an Formalin fixierten Gewebe zur Anwendung kommt im Sinne einer „independant antibody validation“ (Uhlen et al. 2016). Als Validierungsmaßnahmen machten wir sowohl von der Verwendung eines zweiten unabhängigen Antikörpers Gebrauch, als auch vom Vergleich mit RNA-Expression als Validierungsexperiment, wobei RNA-Daten aus drei unabhängigen RNA Screening Studien als Referenz verwendet wurden, nämlich der HPA-Kohorten aus dem Human Proteinatlas (INHA transcriptomics data - The Human Protein Atlas 2023; Uhlén et al. 2015), der Kohorte des Fantom5 Projektes (Lizio et al. 2015; Lizio et al. 2019) und den Tumoren aus dem „Genotype-Tissue-Expression-Projekt (GTEx) (The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project 2013). Um mögliche Kreuzreaktivitäten auch sicher nachweisen zu können, wurde eine sehr breite Palette von Normalgeweben vergleichend zu den RNA-Daten untersucht. Die breite Palette an Normalgewebe ist deswegen sinnvoll, da so sichergestellt werden kann, dass praktisch alle Proteine, welche in Zellen von ausgewachsenen Menschen vorkommen den getesteten Antikörper auch für eine mögliche Bindung „angeboten“ wird. Dass die Normalgewebeuntersuchung lediglich in Sertoli und Leydig-Zellen des Hodens, verschiedenen Zelltypen des ovariellen Stromas einschließlich Thekazellen und Granulosazellen, Zyto- und Synzytiotrophoblasten sowie Chorionzellen der Plazenta, Zellen der Nebennierenrinde und einzelnen verstreuten azinären Pankreaszellen nachweisbar war, ist ein starkes Argument für die Validität unseres Antikörpers und unseres experimentellen Vorgehens, denn RNA-Expression war früher fast ausschließlich in den genannten Organen nachgewiesen worden. Die einzige Diskrepanz zwischen unseren immunhistochemie-Daten und den publizierten RNA-Daten war eine INHA-Expression in Herzmuskulatur, welche von der GTEx und der Fantom5 RNA-Datenbank (Lizio et al. 2019; Lizio et al. 2015; The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project 2013) vorgeschlagen wurde, sich aber durch unsere immunhistochemischen Experimente nicht bestätigen ließ.

Auch die immunhistochemischen Abbildungen aus dem Human-Proteinatlas (INHA transcriptomics data - The Human Protein Atlas 2023) ergaben keine Hinweise auf eine spezifische INHA Färbung im Herzen (Tissue expression of INHA - Staining in

heart muscle - The Human Protein Atlas 2023). Des Weiteren konnten wir auch keine Studie finden, welche eine INHA-Expression entweder in normalen oder erkrankten Herzen beschrieben.

Die sorgfältige Validierung unserer Antikörperfärbung spricht somit stark für die Validität eines der wichtigsten Befunde unserer Studie, die Rangliste der untersuchten Tumoren nach der Häufigkeit der nachgewiesenen INHA-Expression. Diese Rangliste ist in Kombination mit den früher publizierten Daten zu den einzelnen Tumortypen in Abbildung 48 dargestellt.



Abbildung 48 zeigt eine Rangliste der eigenen IHC-Ergebnisse. Die dreieckigen Symbole stellen die Literaturergebnisse im direkten Vergleich dar. Für die Literaturverweise siehe Tabelle 1.

Die dabei dargestellten Befunde früherer Studien machen deutlich, dass die Frage nach der relativen Bedeutung der INHA-Expression in humanen Tumoren nicht ohne Weiteres durch ein simples Studium der Literatur hätte gelöst werden können. Zu unterschiedlich sind die Daten der verschiedenen publizierten Studien. Für die Validität unserer Rangliste spricht nicht nur die maximale Standardisierung der Färbung, sondern auch die Standardisierung weiterer wichtiger Parameter, welche die Ergebnisse einer immunhistochemischen Studie beeinflussen können. Dazu gehören insbesondere das sogenannte Schnittalter (Zeitspanne zwischen der Herstellung eines Gewebeschnittes und seine Verwendung für eine immunhistochemische Färbung) und die pro Tumor untersuchte Gewebemenge. Studien haben nämlich gezeigt, dass die Reaktivität vieler Antikörper mit Formalin fixierten Schnitten mit zunehmender Lagedauer der Schnitte abnimmt (DiVito et al. 2004; Jacobs et al. 1996; Fergenbaum et al. 2004; Mirlacher et al. 2004). DiVito et al. hatten dabei sogar verschiedene Lagerungsmethoden, einschließlich Einfrieren, Bedeckung des Schnittpräparate mit flüssigem Paraffin und die Lagerung in Stickstoff untersucht und unabhängig von der Lagerung eine signifikante Reduktion der Immunreaktivität gefunden (DiVito et al. 2004). Mirlacher et al. fanden bereits nach 2 Wochen Schnittlagerung eine substantielle und statistisch signifikante Verminderung der Reaktivität in 4 von 5 untersuchten Antikörpern (Mirlacher et al. 2004). In unserer Studie wurden 12212 Tumoren auf 38 Schnitten untersucht. Das heißt es mussten für die gesamte Studie von einer MTA lediglich 38 Schnitte hergestellt werden, was ohne weiteres an einem Arbeitstag erfolgen kann. Auch die Färbung der 38 Schnitte konnte durch eine MTA in einem manuellen Ansatz problemlos an einem Tag durchgeführt werden, sodass die Zeitspanne zwischen Schnitttherstellung und Färbung praktisch identisch war. Hätte man die gleiche Studie an Großschnitten durchgeführt, hätten 12212 Schnitte angefertigt und immunhistochemisch gefärbt werden müssen. Die Sicherstellung einer identischen Lagerungszeit der Schnitte wäre in diesem Szenario ein erheblicher und eigentlich unmöglich zu lösender logistischer Aufwand.

In TMA-Studien werden am UKE pro Tumor Gewebefragmente mit einem Durchmesser von 0,6 mm verwendet. Nach der ersten Publikation der TMA-Methode 1998 (Kononen et al. 1998) hatten einige Autoren die Repräsentativität derart kleine Gewebefragmente kritisiert und vorgeschlagen, dass entweder größere TMA-Spots (bis 2 oder 4 mm) oder mehrere Stanzen pro Tumor (zum Beispiel 4) untersucht werden sollen (Camp et al. 2000; Gancberg et al. 2002; Hoos et al. 2001; Rimm et al. 2001).

Von diesen Autoren durchgeführte Studien zeigten auch wiederholt, dass größere Spots oder mehr Proben pro Tumor zu einer höheren Positivitätsrate führen, welche der Positivitätsrate an korrespondierenden groß Schnitten der für die TMA-Herstellung entnommenen Blöcke näherkamen als die Untersuchung von nur einem 0,6 mm messenden Spot (Rimm et al. 2001; Camp et al. 2000; Gancberg et al. 2002; Hoos et al. 2001).

Zusammengefasst zeigen diese Studien aber nicht mehr als dass die Untersuchung von mehr Gewebe, die Rate positiver Fälle steigert (Hoos et al. 2001; Gancberg et al. 2002; Camp et al. 2000; Rimm et al. 2001). Die einzige Studie, die die klinische Bedeutung der Untersuchung unterschiedlicher Gewebemengen an TMAs und Großschnitten untersucht hat und uns bekannt ist, stammt von Torhorst et al (Torhorst et al. 2001). In dieser Studie hatten Torhorst et al die p53-Expression an mehr als 500 Mammakarzinomen mit klinischen Verlaufsdaten an 4 verschiedenen TMAs mit jeweils einem 0,6 mm messenden Gewebespots und an Großschnitten des für die TMA-Herstellung verwendeten Blockes untersucht (Torhorst et al. 2001). Torhorst fand in jedem der 4 TMAs eine Positivitätsrate von ca. 20 %, bei Kombination der TMA-Ergebnisse aller 4 TMAs von ca. 23 % und an Großschnitten 40 % (Torhorst et al. 2001). Wenn von den Patientenkollektiv keine klinischen Daten vorhanden gewesen wäre, hätte das Ergebnis für eine ungenügende Repräsentativität von kleinen 0,6 mm messenden Gewebefragmenten gesprochen (Torhorst et al. 2001). Da aber die Analyse der klinischen Daten nur für p53-Befunde an TMAs aber nicht für die Großschnittbefunde eine prognostische Relevanz ergaben, musste viel mehr gefolgert werden, dass biologisch irrelevante oder artifizielle p53 Anfärbungen am Großschnitt zu einer Verwässerung der relevanten p53 Befunde geführt hatte. Aufgrund dieser Daten ist es wahrscheinlich, dass viele früher publizierten Großschnittuntersuchungen, welche zwangsläufig unterschiedliche Tumorgewebemengen bei jedem Patient untersucht hatten, eine höhere Rate positiver Fälle in großen Tumorschnitten gefunden haben und eine geringere Positivitätsrate in kleinen Biopsien.

Die meisten Tumoren, welche außerhalb der klassischen INHA-Entitäten wie Nebennierenrindentumoren, Granulosazelltumoren, Granularzelltumoren und Keimbahn-Stroma-Tumoren eine INHA-Positivität aufwiesen, zeigten eine im Vergleich zu den zuvor genannten Tumoren eine geringere Färbeintensität, welche vorallem auch nur an einem kleinen Teil der Zellen, (meist 1-10%) auftraten.

Angesichts der Tatsache, dass insgesamt 46 verschiedene Entitäten derartige Befunde in einem Teil der Fälle aufwiesen, erscheint es unbedingt wichtig, dass eine minimale INHA-Expression, welche immunhistochemisch nachgewiesen wird, nicht automatisch zur Diagnose eines Granularzelltumors, eines Nebennierenrindentumors oder eines Keimbahn-Stroma-Tumors führt.

Es ist allerdings anzumerken, dass es insgesamt 26 Tumorentitäten gab, die zumindest in einen Fall eine starke INHA-Expression aufwiesen, vergleichbar zur Expression in Granularzell, Nebennierenrinden oder Keimbahn-Stroma-Tumoren. Hervorzuheben ist in dieser Gruppe vorallem das Azinuszellkarzinom des Pankreas, wo 46,7% der Fälle eine mäßige bis starke INHA-Positivität aufwiesen. Es handelt sich bei diesem Tumor um einen seltenen, aber klinisch aggressiven Pankreastumor, dass sich im Gegensatz zum klassischen Pankreaskarzinom von den Azinuszellen des Pankreas ableitet (Calimano-Ramirez et al. 2022; Fontenot et al. 2020; Klimstra 2007). Dieser Zelltyp gehörte in unserer Normalgewebeuntersuchung zu den wenigen INHA positiven Gewebetypen, was diesen Befund zusätzlich plausibilisiert. Weitere Tumorarten, welche gelegentlich eine mäßig bis starke INHA-Positivität zeigten waren Adenokarzinome von Lunge, Kolon sowie Magen, kleinzellige Lungenkarzinome, epitheloide Mesotheliome, Endometrioide Endometriumkarzinome, Karzinosarkome des Uterus und des Ovars, G3 Endometriumkarzinome, Ovarialkarzinome (serös und endometrioid), cholangiozelluläre Karzinome, Urothelkarzinome, klarzellige tubulär papilläre NCCs, Seminome, Plattenepithelkarzinome des Penis, Papilläre Schilddrüsenkarzinome, neuroendokrine Tumoren des Pankreas, T-Zell Non-Hodgkin-Lymphom, Leiomyosarkome, Angiosarkome, nicht weiter spezifizierte Sarkome, Paragangliome und Synovialsarkome.

Zumindest diese Entitäten müssen im Falle eines INHA positiven Tumors prinzipiell erwogen werden.

Von besonderer diagnostischer Bedeutung ist der gelegentliche Nachweis einer kräftigen INHA-Expression in klarzelligen Nierenzellkarzinomen, denn die INHA Immunhistochemie wird immer wieder für die Abgrenzung von normalen oder neoplastischen Nebennierengewebe von klarzelligen Nierenzellkarzinomen empfohlen.

Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit dieser Gewebetypen und der räumlichen Nähe von Nebenniere und Niere stellt sich diese Differentialdiagnose immer wieder.

Unsere Befunde machen deutlich, dass der Nachweis einer kräftigen INHA-Positivität allein nicht für die Diagnose einer normalen Nebenniere oder etwa eines Nebennierenrindenkarzinoms ausreichen darf.

Die biologische Bedeutung des insgesamt doch nicht ganz seltenen Nachweises einer INHA-Expression in einer Vielzahl verschiedener Tumortypen ist nicht klar. Da die meisten dieser Tumoren sich von Geweben herleiten, welche normalerweise kein INHA exprimieren, muss von einer Neoexpression von INHA in einem kleiner, aber signifikanten Anteil von vielen verschiedenen Tumortypen ausgegangen werden, wobei die Expression häufig nur einen kleinen Teil der Zellen betrifft. Eine mögliche Erklärung für diese Befunde wäre eine Rolle von INHA als parakrin sezerniertes Tumorförderndes Protein. Tatsächlich wurde in einer kürzlichen Studie von Singh et al. INHA als neuer parakriner Faktor beschrieben, welcher bei Ovarialkarzinomen die Tumorneoangiogenese und die Metastasierung fördere (Singh et al. 2018). Die Autoren belegen ihre Daten mit in vivo und in vitro Experimenten, welche zeigen, dass INHA durch die parakrine Aktivierung von SMAD1/5 über den TGF-Beta-Co-Rezeptor Endoglin in Endothelzellen Einfluss auf die Metastasierung und Angiogenese von Tumoren nimmt (Singh et al. 2018). Sie sahen hierbei einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer hohen INHA-Expression und einer schlechten Prognose bei Ovarial- sowie Nierenzellkarzinomen (Singh et al. 2018).

Wegen der geringen Zahl, der in unserer Studie pro Tumorentität positiven Fälle konnte trotz Vorhandenseins von klinisch pathologischen Daten zu einigen unserer Tumorsubkollektive nur beim kolorektalen Adenokarzinomen, dem klarzelligen Nierenzellkarzinomen und bei neuroendokrinen Tumoren eine vergleichende Untersuchung zwischen INHA-Expression und klinisch pathologischen Parametern durchgeführt werden. Dass sich dabei bei allen 3 Tumoren zumindest tendenzielle Zusammenhänge zwischen einer INHA-Neoexpression und einem ungünstigen Tumorphänotyp zeigten, wäre tatsächlich vereinbar mit einer progressions- oder metastasierungsfördernden Rolle der INHA-Expression in Tumoren.

Die Bedeutung der INHA-Expression beim Ovarialkarzinomen könnte allerdings durch die Besonderheit einer physiologischen Expression von INHA in ovariellen Stromazellen, namentlich in Teka-Zellen und Granulosazellen beeinflusst sein. Unsere Untersuchung von 672 Ovarialtumoren zeigte nämlich, dass eine Expression von INHA in Tumorzellen nur selten vorkommt, dass aber in einem großen Teil der Tumo-

ren, zum Beispiel bei praktisch allen Brenkertumoren eine peritumorale Proliferation von kräftig INHA positiven Stromazellen auftrat. Diese Beobachtung könnte auch erklären, dass ein serologischer Nachweis einer erhöhten INHA-Konzentration als ein Indiz für das Vorliegen eines Ovarialkarzinoms gefunden worden war (Robertson et al. 2002). Somit wäre es also denkbar, dass die parakrine Rolle von INHA beim Ovarialkarzinom in der Regel nicht durch Tumorzellen, sondern durch die umliegenden Stromazellen ausgeübt wird. Aus der Tatsache, dass normalerweise die serologische INHA-Konzentration nach der Menopause stark zurück geht, aber im Falle eines neu auftretenden Ovarialkarzinoms wieder stark ansteigt, lässt sich ableiten, dass offenbar die Tumorentstehung auch die Entstehung peritumoraler INHA positiver Stromazellen induziert.

Zusammengefasst bestätigen die Befunde unserer Studie, dass INHA besonders häufig bei verschiedenen Typen von Keimbahn-Stroma-Tumoren, Granularzelltumoren und Nebennierenrindentumoren exprimiert wird. Da eine INHA-Expression aber auch bei vielen anderen Tumorentypen nachgewiesen werden kann, darf die INHA Immunhistochemie nicht als alleiniges Kriterium für die Einteilung eines Tumors herangezogen werden und die INHA Immunhistochemie Befunde müssen immer im Kontext mit anderen immunhistochemischen Markern und der Morphologie beurteilt werden. Einige unserer Daten von uns sowie der anderen Autoren sprechen für eine prognostisch ungünstige Rolle einer INHA-Expression in Tumoren und dieser Zusammenhang muss weiterhin erforscht werden.

5. Zusammenfassung

Aufgrund seiner Expression in den entsprechenden normalen Zelltypen wird INHA (INHA) als immunhistochemischer Marker für Tumoren der Nebennierenrinde und Keimstrang-Stromatumoren der Geschlechtsorgane in den Hoden oder Eierstöcken verwendet. Aber auch andere Tumoren können INHA exprimieren. Um die INHA-Expression bei Krebs umfassend zu bestimmen, wurde ein Tissue-Microarray bestehend 15 012 Proben von 134 verschiedenen Tumorarten und -subtypen immunhistochemisch analysiert. Eine INHA-Positivität wurde in 72 von 134 Tumorkategorien gefunden, darunter in 26 Kategorien mit ≥ 1 stark positivem Fall. Eine mäßige bis starke INHA-Positivität wurde bei 100 % von 36 Granulosazelltumoren des Eierstocks, 100% von 43 anderen Keimstrang-Stromatumoren des Eierstocks/Hodens, 100% von 31 Granularzelltumoren, 78,5% von 28 Adenomen der Nebennierenrinde, 44 % von 25 Karzinomen der Nebennierenrinde und 46,7% von 15 Azinuszellkarzinomen des Pankreas festgestellt. Zumindest eine schwache INHA-Positivität wurde in $<33\%$ der Fälle von 46 weiteren Tumorentitäten festgestellt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Daten die Verwendung von INHA-Antikörpern zum Nachweis von Keimstrang-Stromatumoren des Hodens und Ovars, Granularzelltumoren und Tumoren der Nebennierenrinde unterstützen. Da INHA auch in anderen Tumorentitäten gefunden werden kann, sollte die INHA-Immunhistochemie nur als Teil eines Panels zur Unterscheidung von Tumorentitäten in Betracht gezogen werden.

6. English Summary

As a result of its expression in corresponding normal cell types, INHA (INHA) is used as an immunohistochemical marker for adrenocortical neoplasms and testicular or ovarian sex cord stromal tumors. However, other tumors can also express INHA. To comprehensively determine INHA expression in cancer, a tissue microarray containing 15,012 samples from 134 different tumor types and subtypes was analyzed by immunohistochemistry. INHA positivity was found in 72 of 134 tumor categories, including 26 categories with ≥ 1 strongly positive case. A moderate to strong INHA positivity was found in 100% of 36 granulosa cell tumors of the ovary, 100% of 43 other sex cord stromal tumors of the ovary/testis, 100% of 31 granular cell tumors, 78.5% of 28 adenomas, 44% of 25 carcinomas of the adrenal cortex, and 46.7% of 15 pancreatic acinar cell carcinomas. At least a weak INHA positivity was seen in $<33\%$ of cases of 46 additional tumor entities. In summary, these data support the use of INHA antibodies for detecting sex cord stromal tumors, granular cell tumors, and adrenocortical neoplasms. Since INHA can also be found in other tumor entities, INHA immunohistochemistry should only be considered as a part of any panel for the distinction of tumor entities.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung

AK

BRAF

FSH

GnRh

HER

HIER

IHC

INHA

INHB

INHBA

INHBB

ISUP

IWGAV

kDa

LH

MTA

NCC

NEC

NET

RNA

SMAD

TGF

TMA

UICC

UKE

Bedeutung

Antikörper

Serin/Threonin-Kinase B-Raf

Follikel stimulierendes Hormon

Gonadotropin-Releasing-Hormon

Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor

Heat induced Epitope Retrieval

Immunhistochemie

Inhibin Untereinheit alpha

Inhibin Untereinheit beta

Inhibin Untereinheit Beta A

Inhibin Untereinheit Beta B

International Society of Urothology

International Working Group for Antibody Validation

Kilodalton

Luteinisierendes Hormon

Medizinisch-technische Assistentin

Nierenzellkarzinom

Neuroendokrine Karzinome

Neuroendokrine Tumoren

Ribonukleinsäure

Suppressor of Mothers against Decapentaplegic

Transforming growth factor

Tissue-Micro-Array

Union internationale contre le cancer

Universitätsklinikum Eppendorf

8. Literaturverzeichnis

Al-Agha, Osama M.; Huwait, Hassan F.; Chow, Christine; Yang, Winnie; Senz, Janine; Kalloger, Steve E. et al. (2011): FOXL2 is a sensitive and specific marker for sex cord-stromal tumors of the ovary. In: *The American journal of surgical pathology* 35 (4), S. 484–494. DOI: 10.1097/PAS.0b013e31820a406c.

An, Soyeon; Jang, Jaejung; Min, Kwangseon; Kim, Min-Sun; Park, Hosub; Park, Young Soo et al. (2015): Granular cell tumor of the gastrointestinal tract: histologic and immunohistochemical analysis of 98 cases. In: *Human pathology* 46 (6), S. 813–819. DOI: 10.1016/j.humpath.2015.02.005.

Anttonen, Mikko; Unkila-Kallio, Leila; Leminen, Arto; Butzow, Ralf; Heikinheimo, Markku (2005): High GATA-4 expression associates with aggressive behavior, whereas low anti-Müllerian hormone expression associates with growth potential of ovarian granulosa cell tumors. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90 (12), S. 6529–6535. DOI: 10.1210/jc.2005-0921.

Arola, J.; Liu, J.; Heikkilä, P.; Ilvesmäki, V.; Salmenkivi, K.; Voutilainen, R.; Kahri, A. I. (2000): Expression of inhibin alpha in adrenocortical tumours reflects the hormonal status of the neoplasm. In: *The Journal of endocrinology* 165 (2), S. 223–229. DOI: 10.1677/joe.0.1650223.

Attisano, L.; Wrana, J. L.; Montalvo, E.; Massagué, J. (1996): Activation of signalling by the activin receptor complex. In: *Molecular and cellular biology* 16 (3), S. 1066–1073. DOI: 10.1128/MCB.16.3.1066.

Barton, D. E.; Yang-Feng, T. L.; Mason, A. J.; Seeburg, P. H.; Francke, U. (1989): Mapping of genes for inhibin subunits alpha, beta A, and beta B on human and mouse chromosomes and studies of jsd mice. In: *Genomics* 5 (1), S. 91–99. DOI: 10.1016/0888-7543(89)90091-8.

Bellezza, Guido; Colella, Renato; Sidoni, Angelo; Del Sordo, Rachele; Ferri, Ivana; Cioccoloni, Claudia; Cavaliere, Antonio (2008): Immunohistochemical expression of Galectin-3 and HBME-1 in granular cell tumors: a new finding. In: *Histology and histopathology* 23 (9), S. 1127–1130. DOI: 10.14670/HH-23.1127.

Bergh, A.; Cajander, S. (1990): Immunohistochemical localization of inhibin-alpha in the testes of normal men and in men with testicular disorders. In: *International journal of andrology* 13 (6), S. 463–469. DOI: 10.1111/j.1365-2605.1990.tb01053.x.

Burger, H. G.; Baillie, A.; Drummond, A. E.; Healy, D. L.; Jobling, T.; Mamers, P. et al. (1998): Inhibin and ovarian cancer. In: *Journal of reproductive immunology* 39 (1-2), S. 77–87. DOI: 10.1016/s0165-0378(98)00014-x.

Burns, W. N.; McGill, J. R.; Roy, A. K.; Schenken, R. S. (1990): Expression of the human inhibin alpha-subunit gene in preovulatory granulosa-theca cells. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 162 (1), S. 273–277. DOI: 10.1016/0002-9378(90)90864-4.

Calimano-Ramirez, Luis Fernando; Daoud, Taher; Gopireddy, Dheeraj Reddy; Morani, Ajaykumar C.; Waters, Rebecca; Gumus, Kazim et al. (2022): Pancreatic acinar cell carcinoma: A comprehensive review. In: *World journal of gastroenterology* 28 (40), S. 5827–5844. DOI: 10.3748/wjg.v28.i40.5827.

Camp, R. L.; Charette, L. A.; Rimm, D. L. (2000): Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 80 (12), S. 1943–1949. DOI: 10.1038/labinvest.3780204.

Cárcamo, J.; Weis, F. M.; Ventura, F.; Wieser, R.; Wrana, J. L.; Attisano, L.; Massagué, J. (1994): Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. In: *Molecular and cellular biology* 14 (6), S. 3810–3821. DOI: 10.1128/mcb.14.6.3810-3821.1994.

Cathro, Helen P.; Stoler, Mark H. (2005): The utility of calretinin, inhibin, and WT1 immunohistochemical staining in the differential diagnosis of ovarian tumors. In: *Human pathology* 36 (2), S. 195–201. DOI: 10.1016/j.humpath.2004.11.011.

Chamberlain, Benjamin K.; McClain, Colt M.; Gonzalez, Raul S.; Coffin, Cheryl M.; Cates, Justin M. M. (2014): Alveolar soft part sarcoma and granular cell tumor: an immunohistochemical comparison study. In: *Human pathology* 45 (5), S. 1039–1044. DOI: 10.1016/j.humpath.2013.12.021.

Chapman, Stacey C.; Bernard, Daniel J.; Jelen, Jaroslav; Woodruff, Teresa K. (2002): Properties of inhibin binding to betaglycan, InhBP/p120 and the activin type II receptors. In: *Molecular and cellular endocrinology* 196 (1-2), S. 79–93. DOI: 10.1016/s0303-7207(02)00227-7.

Cho, E. Y.; Ahn, G. H. (2001): Immunoexpression of inhibin alpha-subunit in adrenal neoplasms. In: *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 9 (3), S. 222–228. DOI: 10.1097/00129039-200109000-00005.

Choi, Y. L.; Kim, H. S.; Ahn, G. (2000): Immunoexpression of inhibin alpha subunit, inhibin/activin betaA subunit and CD99 in ovarian tumors. In: *Archives of pathology & laboratory medicine* 124 (4), S. 563–569. DOI: 10.5858/2000-124-0563-IOISIA.

Chu, P. G.; Arber, D. A.; Weiss, L. M.; Chang, K. L. (2001): Utility of CD10 in distinguishing between endometrial stromal sarcoma and uterine smooth muscle tumors: an immunohistochemical comparison of 34 cases. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 14 (5), S. 465–471. DOI: 10.1038/modpathol.3880335.

Ciriş, Metin; Erhan, Yildiz; Zekioglu, Osman; Bayramoglu, Hatice (2004): Inhibin alpha and beta expression in ovarian stromal tumors and their histological equivalences. In: *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 83 (5), S. 491–496. DOI: 10.1111/j.0001-6349.2004.00167.x.

Clark, M. R. (1981): Monoclonal antibodies derived from hybrid myelomas. In: *La Ricerca in clinica e in laboratorio* 11 (3), S. 195–203. DOI: 10.1007/BF02890525.

Coerver, K. A.; Woodruff, T. K.; Finegold, M. J.; Mather, J.; Bradley, A.; Matzuk, M. M. (1996): Activin signaling through activin receptor type II causes the cachexia-like symptoms in inhibin-deficient mice. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 10 (5), S. 534–543. DOI: 10.1210/mend.10.5.8732684.

Deavers, Michael T.; Malpica, Anais; Liu, Jinsong; Broaddus, Russell; Silva, Elvio G. (2003): Ovarian sex cord-stromal tumors: an immunohistochemical study including a comparison of calretinin and inhibin. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 16 (6), S. 584–590. DOI: 10.1097/01.MP.0000073133.79591.A1.

del Re, Elisabetta; Sidis, Yisrael; Fabrizio, David A.; Lin, Herbert Y.; Schneyer, Alan (2004): Reconstitution and analysis of soluble inhibin and activin receptor complexes in a cell-free system. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (51), S. 53126–53135. DOI: 10.1074/jbc.M408090200.

Dias, Vinali L.; Rajpert-De Meyts, Ewa; McLachlan, Robert; Loveland, Kate Lakoski (2009): Analysis of activin/TGFB-signaling modulators within the normal and dysfunc-

tional adult human testis reveals evidence of altered signaling capacity in a subset of seminomas. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 138 (5), S. 801–811. DOI: 10.1530/REP-09-0206.

Dionigi, A.; Facco, C.; Tibiletti, M. G.; Bernasconi, B.; Riva, C.; Capella, C. (2000): Ovarian metastases from colorectal carcinoma. Clinicopathologic profile, immunophenotype, and karyotype analysis. In: *American journal of clinical pathology* 114 (1), S. 111–122. DOI: 10.1309/G56H-97A2-JFMT-CD5N.

DiVito, Kyle A.; Charette, Lori A.; Rimm, David L.; Camp, Robert L. (2004): Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 84 (8), S. 1071–1078. DOI: 10.1038/labinvest.3700131.

Donaldson, C. J.; Vaughan, J. M.; Corrigan, A. Z.; Fischer, W. H.; Vale, W. W. (1999): Activin and inhibin binding to the soluble extracellular domain of activin receptor II. In: *Endocrinology* 140 (4), S. 1760–1766. DOI: 10.1210/endo.140.4.6665.

Dong, Lei; Wang, Huan; Su, Zhitao; Niu, Sanqiang; Wang, Rongrong; Wu, Liang; Chen, Guorong (2011): Steroidogenic acute regulatory protein is a useful marker for Leydig cells and sex-cord stromal tumors. In: *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 19 (3), S. 226–232. DOI: 10.1097/PAI.0b013e3181ffc4d2.

Elmoneim, Hanan Mohammed Abd; Samaka, Rehab Monir; Ali, Hanan (2012): Diagnostic role of inhibin α -subunit and inhibin/activin β -subunit in adrenal cortical and medullary tumors in Egyptian patients. In: *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 20 (5), S. 462–469. DOI: 10.1097/PAI.0b013e318239e18d.

Fergenbaum, Jennifer H.; Garcia-Closas, Montserrat; Hewitt, Stephen M.; Lissowska, Jolanta; Sakoda, Lori C.; Sherman, Mark E. (2004): Loss of antigenicity in stored sections of breast cancer tissue microarrays. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 13 (4), S. 667–672.

Fine, Samson W.; Li, Maomi (2003): Expression of calretinin and the alpha-subunit of inhibin in granular cell tumors. In: *American journal of clinical pathology* 119 (2), S. 259–264. DOI: 10.1309/GRH4-JWX6-J9J7-QQTA.

- Flemming, P.; Grothe, W.; Maschek, H.; Petry, K. U.; Wellmann, A.; Georgii, A. (1996): The site of inhibin production in ovarian neoplasms. In: *Histopathology* 29 (5), S. 465–468. DOI: 10.1046/j.1365-2559.1996.d01-511.x.
- Fogt, F.; Zimmerman, R. L.; Mulligan, N.; Vortmeyer, A. O.; Poremba, C.; Harris, C. A. et al. (1999): BCL-2 expression and inhibin-A in adrenal neoplasms: a comparative study. In: *International journal of molecular medicine* 3 (3), S. 271–274. DOI: 10.3892/ijmm.3.3.271.
- Fontenot, Jake; Spieler, Bradley; Hudson, Catherine; Boulmay, Brian (2020): Pancreatic acinar cell carcinoma--literature review and case report of a 56-year-old man presenting with abdominal pain. In: *Radiology Case Reports* 15 (1), S. 39–43. DOI: 10.1016/j.radcr.2019.10.009.
- Gancberg, D.; Di Leo, A.; Rouas, G.; Järvinen, T.; Verhest, A.; Isola, J. et al. (2002): Reliability of the tissue microarray based FISH for evaluation of the HER-2 oncogene in breast carcinoma. In: *Journal of clinical pathology* 55 (4), S. 315–317. DOI: 10.1136/jcp.55.4.315.
- Gebhart, J. B.; Roche, P. C.; Keeney, G. L.; Lesnick, T. G.; Podratz, K. C. (2000): Assessment of inhibin and p53 in granulosa cell tumors of the ovary. In: *Gynecologic oncology* 77 (2), S. 232–236. DOI: 10.1006/gyno.2000.5774.
- Geiersbach, Katherine B.; Jarboe, Elke A.; Jahromi, Mona S.; Baker, Christine L.; Paxton, Christian N.; Tripp, Sheryl R.; Schiffman, Joshua D. (2011): FOXL2 mutation and large-scale genomic imbalances in adult granulosa cell tumors of the ovary. In: *Cancer genetics* 204 (11), S. 596–602. DOI: 10.1016/j.cancergen.2011.10.002.
- Gray, P. C.; Greenwald, J.; Blount, A. L.; Kunitake, K. S.; Donaldson, C. J.; Choe, S.; Vale, W. (2000): Identification of a binding site on the type II activin receptor for activin and inhibin. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (5), S. 3206–3212. DOI: 10.1074/jbc.275.5.3206.
- Guo, Li-Na; Liu, Tong-Hua; Sun, Ai-Jun; Zhou, Quan (2004): Ovarian tumors with endocrine function. In: *Zhonghua bing li xue za zhi = Chinese journal of pathology* 33 (3), S. 217–220.
- Gurusinghe, C. J.; Healy, D. L.; Jobling, T.; Mamers, P.; Burger, H. G. (1995): Inhibin and activin are demonstrable by immunohistochemistry in ovarian tumor tissue. In: *Gynecologic oncology* 57 (1), S. 27–32. DOI: 10.1006/gyno.1995.1096.

Hantschke, Markus; Palmedo, Gabriele (2015): Immunhistologische Techniken. In: Lorenzo Cerroni, Claus Garbe, Dieter Metze, Heinz Kutzner und Helmut Kerl (Hg.): Histopathologie der Haut. Living Reference Work, Continuously updated edition. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer Reference Medizin), S. 1–28.

Hauzman, Erik; Fedorcsák, Péter; Klinga, Klaus; Papp, Zoltán; Rabe, Thomas; Strowitzki, Thomas; Urbancsek, János (2004): Use of serum inhibin A and human chorionic gonadotropin measurements to predict the outcome of in vitro fertilization pregnancies. In: *Fertility and sterility* 81 (1), S. 66–72. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2003.05.007.

He, Zhijun; Liang, Jun; Wang, Biao (2021): Inhibin, beta A regulates the transforming growth factor-beta pathway to promote malignant biological behaviour in colorectal cancer. In: *Cell biochemistry and function* 39 (2), S. 258–266. DOI: 10.1002/cbf.3573.

Henley, John D.; Young, Robert H.; Ulbright, Thomas M. (2002): Malignant Sertoli cell tumors of the testis: a study of 13 examples of a neoplasm frequently misinterpreted as seminoma. In: *The American journal of surgical pathology* 26 (5), S. 541–550. DOI: 10.1097/00000478-200205000-00001.

Hillier, S. G.; Wickings, E. J.; Illingworth, P. I.; Yong, E. L.; Reichert, L. E.; Baird, D. T.; McNeilly, A. S. (1991): Control of immunoactive inhibin production by human granulosa cells. In: *Clinical endocrinology* 35 (1), S. 71–78. DOI: 10.1111/j.1365-2265.1991.tb03499.x.

Hoos, A.; Urist, M. J.; Stojadinovic, A.; Mastorides, S.; Dudas, M. E.; Leung, D. H. et al. (2001): Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. In: *The American journal of pathology* 158 (4), S. 1245–1251. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64075-8.

Horny, H. P.; Marx, L.; Kröber, S.; Lüttges, J.; Kaiserling, E.; Dietl, J. (1999): Granulosa cell tumor of the ovary. Immunohistochemical evidence of low proliferative activity and virtual absence of mutation of the p53 tumor-suppressor gene. In: *Gynecologic and obstetric investigation* 47 (2), S. 133–138. DOI: 10.1159/000010077.

Huang, Hsuan-Ying; Antonescu, Cristina R. (2002): Epithelioid variant of pleomorphic liposarcoma: a comparative immunohistochemical and ultrastructural analysis of six cases with emphasis on overlapping features with epithelial malignancies. In: *Ultrastructural pathology* 26 (5), S. 299–308. DOI: 10.1080/01913120290104575.

lczkowski, K. A.; Bostwick, D. G.; Roche, P. C.; Cheville, J. C. (1998): Inhibin A is a sensitive and specific marker for testicular sex cord-stromal tumors. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 11 (8), S. 774–779.

INHA transcriptomics data - The Human Protein Atlas (2023). Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000123999-INHA/summary/rna>, zuletzt aktualisiert am 26.04.2023, zuletzt geprüft am 26.04.2023.

Jacobs, T. W.; Prioleau, J. E.; Stillman, I. E.; Schnitt, S. J. (1996): Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. In: *Journal of the National Cancer Institute* 88 (15), S. 1054–1059. DOI: 10.1093/jnci/88.15.1054.

Jensen, T. K.; Andersson, A. M.; Hjollund, N. H.; Scheike, T.; Kolstad, H.; Giwercman, A. et al. (1997): Inhibin B as a serum marker of spermatogenesis: correlation to differences in sperm concentration and follicle-stimulating hormone levels. A study of 349 Danish men. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82 (12), S. 4059–4063. DOI: 10.1210/jcem.82.12.4456.

Jorda, Merce; De, Madeiros Bruno; Nadji, Mehrdad (2002): Calretinin and inhibin are useful in separating adrenocortical neoplasms from pheochromocytomas. In: *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 10 (1), S. 67–70. DOI: 10.1097/00129039-200203000-00012.

Kang, Jin Hee; Farina, Antonio; Park, Ji Hyeon; Kim, Sung Han; Kim, Ji Yeon; Rizzo, Nicola et al. (2008): Down syndrome biochemical markers and screening for preeclampsia at first and second trimester: correlation with the week of onset and the severity. In: *Prenatal diagnosis* 28 (8), S. 704–709. DOI: 10.1002/pd.1997.

Kao, Chia-Sui; Ulbright, Thomas M. (2020): A Morphologic and Immunohistochemical Comparison of Nuclear β -Catenin Expressing Testicular Sertoli Cell Tumors and Pancreatic Solid Pseudopapillary Neoplasms Supporting Their Continued Separate Classification. In: *The American journal of surgical pathology* 44 (8), S. 1082–1091. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001527.

Keogh, E. J.; Lee, V. W.; Rennie, G. C.; Burger, H. G.; Hudson, B.; Kretser, D. M. de (1976): Selective suppression of FSH by testicular extracts. In: *Endocrinology* 98 (4), S. 997–1004. DOI: 10.1210/endo-98-4-997.

Klimstra, David S. (2007): Nonductal neoplasms of the pancreas. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 20 Suppl 1, S94-112. DOI: 10.1038/modpathol.3800686.

Köhler, G.; Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. In: *Nature* 256 (5517), S. 495–497. DOI: 10.1038/256495a0.

Kolb, B. A.; Stanczyk, F. Z.; Sokol, R. Z. (2000): Serum inhibin B levels in males with gonadal dysfunction. In: *Fertility and sterility* 74 (2), S. 234–238. DOI: 10.1016/s0015-0282(00)00641-5.

Kommoss, F.; Oliva, E.; Bhan, A. K.; Young, R. H.; Scully, R. E. (1998): Inhibin expression in ovarian tumors and tumor-like lesions: an immunohistochemical study. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 11 (7), S. 656–664.

Kommoss, F.; Oliva, E.; Bittinger, F.; Kirkpatrick, C. J.; Amin, M. B.; Bhan, A. K. et al. (2000): Inhibin-alpha CD99, HEA125, PLAP, and chromogranin immunoreactivity in testicular neoplasms and the androgen insensitivity syndrome. In: *Human pathology* 31 (9), S. 1055–1061. DOI: 10.1053/hupa.2000.16237.

Kononen, J.; Bubendorf, L.; Kallioniemi, A.; Bärklund, M.; Schraml, P.; Leighton, S. et al. (1998): Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. In: *Nature medicine* 4 (7), S. 844–847. DOI: 10.1038/nm0798-844.

Krenacs, Laszlo; Krenacs, Tibor; Stelkovics, Eva; Raffeld, Mark (2010): Heat-induced antigen retrieval for immunohistochemical reactions in routinely processed paraffin sections. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 588, S. 103–119. DOI: 10.1007/978-1-59745-324-0_14.

Kurose, H.; Takikawa, E. (1998): Production of various antibodies and single chain Fv molecule against signal-transducing proteins. In: *Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica* 112 (1), S. 59–68. DOI: 10.1254/fpj.112.59.

Laflamme, Carl; Edwards, Aled M.; Bandrowski, Anita E.; McPherson, Peter S. (2021): Opinion: Independent third-party entities as a model for validation of commercial antibodies. In: *New biotechnology* 65, S. 1–8. DOI: 10.1016/j.nbt.2021.07.001.

- Laflamme, Carl; McKeever, Paul M.; Kumar, Rahul; Schwartz, Julie; Kolahehdouzan, Mahshad; Chen, Carol X. et al. (2019): Implementation of an antibody characterization procedure and application to the major ALS/FTD disease gene C9ORF72. In: *eLife* 8. DOI: 10.7554/eLife.48363.
- Lambert-Messerlian, G. M.; Canick, J. A.; Palomaki, G. E.; Schneyer, A. L. (1996): Second trimester levels of maternal serum inhibin A, total inhibin, alpha inhibin precursor, and activin in Down's syndrome pregnancy. In: *Journal of medical screening* 3 (2), S. 58–62. DOI: 10.1177/096914139600300202.
- Lambert-Messerlian, GERALYN; Steinhoff, Margaret; Kumar, Ajay; Eklund, Elizabeth E.; Moore, Richard (2017): Comparison of Inhibin Alpha Subunit and Antimüllerian Hormone Immunoreactivity in Granulosa Cell and Mucinous Ovarian Tumors. In: *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 25 (1), S. 71–77. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000251.
- Le, Brian H.; Boyer, Philip J.; Lewis, Jean E.; Kapadia, Silloo B. (2004): Granular cell tumor: immunohistochemical assessment of inhibin-alpha, protein gene product 9.5, S100 protein, CD68, and Ki-67 proliferative index with clinical correlation. In: *Archives of pathology & laboratory medicine* 128 (7), S. 771–775. DOI: 10.5858/2004-128-771-GCTIAO.
- Lebrun, J. J.; Vale, W. W. (1997): Activin and inhibin have antagonistic effects on ligand-dependent heteromerization of the type I and type II activin receptors and human erythroid differentiation. In: *Molecular and cellular biology* 17 (3), S. 1682–1691. DOI: 10.1128/MCB.17.3.1682.
- Lee, Hsiang-Ying; Li, Ching-Chia; Huang, Chun-Nung; Li, Wei-Ming; Yeh, Hsin-Chih; Ke, Hung-Lung et al. (2015): INHBA overexpression indicates poor prognosis in urothelial carcinoma of urinary bladder and upper tract. In: *Journal of surgical oncology* 111 (4), S. 414–422. DOI: 10.1002/jso.23836.
- Lewis, K. A.; Gray, P. C.; Blount, A. L.; MacConell, L. A.; Wiater, E.; Bilezikjian, L. M.; Vale, W. (2000): Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. In: *Nature* 404 (6776), S. 411–414. DOI: 10.1038/35006129.
- Ling, N.; Ying, S. Y.; Ueno, N.; Esch, F.; Denoroy, L.; Guillemin, R. (1985): Isolation and partial characterization of a Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine

follicular fluid. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (21), S. 7217–7221. DOI: 10.1073/pnas.82.21.7217.

Ling, N.; Ying, S. Y.; Ueno, N.; Shimasaki, S.; Esch, F.; Hotta, M.; Guillemin, R. (1986a): A homodimer of the beta-subunits of inhibin A stimulates the secretion of pituitary follicle stimulating hormone. In: *Biochemical and biophysical research communications* 138 (3), S. 1129–1137. DOI: 10.1016/s0006-291x(86)80400-4.

Ling, N.; Ying, S. Y.; Ueno, N.; Shimasaki, S.; Esch, F.; Hotta, M.; Guillemin, R. (1986b): Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. In: *Nature* 321 (6072), S. 779–782. DOI: 10.1038/321779a0.

Lizio, Marina; Abugessaisa, Imad; Noguchi, Shuhei; Kondo, Atsushi; Hasegawa, Aki-ra; Hon, Chung Chau et al. (2019): Update of the FANTOM web resource: expansion to provide additional transcriptome atlases. In: *Nucleic acids research* 47 (D1), D752-D758. DOI: 10.1093/nar/gky1099.

Lizio, Marina; Harshbarger, Jayson; Shimoji, Hisashi; Severin, Jessica; Kasukawa, Takeya; Sahin, Serkan et al. (2015): Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas. In: *Genome biology* 16 (1), S. 22. DOI: 10.1186/s13059-014-0560-6.

López-Casillas, F.; Cheifetz, S.; Doody, J.; Andres, J. L.; Lane, W. S.; Massagué, J. (1991): Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. In: *Cell* 67 (4), S. 785–795. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90073-8.

Mabuchi, Yasushi; Yamoto, Mareo; Minami, Sawako; Umesaki, Naohiko (2006): Immunohistochemical localization of inhibin and activin subunits, activin receptors, and Smads in ovarian clear cell adenocarcinoma. In: *Oncology reports* 15 (2), S. 291–296.

Makanji, Yogeshwar; Zhu, Jie; Mishra, Rama; Holmquist, Chris; Wong, Winifred P. S.; Schwartz, Neena B. et al. (2014): Inhibin at 90: from discovery to clinical application, a historical review. In: *Endocrine Reviews* 35 (5), S. 747–794. DOI: 10.1210/er.2014-1003.

Mason, A. J.; Hayflick, J. S.; Ling, N.; Esch, F.; Ueno, N.; Ying, S. Y. et al. (1985): Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor

structure and homology with transforming growth factor-beta. In: *Nature* 318 (6047), S. 659–663. DOI: 10.1038/318659a0.

Mathews, L. S.; Vale, W. W. (1991): Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. In: *Cell* 65 (6), S. 973–982. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90549-e.

Mathews, L. S.; Vale, W. W.; Kintner, C. R. (1992): Cloning of a second type of activin receptor and functional characterization in *Xenopus* embryos. In: *Science (New York, N.Y.)* 255 (5052), S. 1702–1705. DOI: 10.1126/science.1313188.

Matias-Guiu, X.; Pons, C.; Prat, J. (1998): Müllerian inhibiting substance, alpha-inhibin, and CD99 expression in sex cord-stromal tumors and endometrioid ovarian carcinomas resembling sex cord-stromal tumors. In: *Human pathology* 29 (8), S. 840–845. DOI: 10.1016/S0046-8177(98)90454-3.

Matzuk, M. M.; Finegold, M. J.; Mather, J. P.; Krummen, L.; Lu, H.; Bradley, A. (1994): Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (19), S. 8817–8821. DOI: 10.1073/pnas.91.19.8817.

Matzuk, M. M.; Finegold, M. J.; Su, J. G.; Hsueh, A. J.; Bradley, A. (1992): Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. In: *Nature* 360 (6402), S. 313–319. DOI: 10.1038/360313a0.

Mayr, D.; Kaltz-Wittmer, C.; Arbogast, S.; Amann, G.; Aust, D. E.; Diebold, J. (2002): Characteristic pattern of genetic aberrations in ovarian granulosa cell tumors. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 15 (9), S. 951–957. DOI: 10.1097/01.MP.0000024290.55261.14.

McCluggage, W. G.; Burton, J.; Maxwell, P.; Sloan, J. M. (1998): Immunohistochemical staining of normal, hyperplastic, and neoplastic adrenal cortex with a monoclonal antibody against alpha inhibin. In: *Journal of clinical pathology* 51 (2), S. 114–116. DOI: 10.1136/jcp.51.2.114.

McCluggage, W. G.; Maxwell, P. (1999): Adenocarcinomas of various sites may exhibit immunoreactivity with anti-inhibin antibodies. In: *Histopathology* 35 (3), S. 216–220. DOI: 10.1046/j.1365-2559.1999.00704.x.

McCluggage, W. G.; Maxwell, P.; Sloan, J. M. (1997): Immunohistochemical staining of ovarian granulosa cell tumors with monoclonal antibody against inhibin. In: *Human pathology* 28 (9), S. 1034–1038. DOI: 10.1016/s0046-8177(97)90056-3.

McCullagh, D. R. (1932): DUAL ENDOCRINE ACTIVITY OF THE TESTES. In: *Science (New York, N.Y.)* 76 (1957), S. 19–20. DOI: 10.1126/science.76.1957.19.

Mirlacher, Martina; Kasper, Marlis; Storz, Martina; Knecht, Yvonne; Dürmüller, Ursula; Simon, Ronald et al. (2004): Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. In: *Mod Pathol* 17 (11), S. 1414–1420. DOI: 10.1038/modpathol.3800208.

Miyamoto, K.; Hasegawa, Y.; Fukuda, M.; Nomura, M.; Igarashi, M.; Kangawa, K.; Matsuo, H. (1985): Isolation of porcine follicular fluid inhibin of 32K daltons. In: *Biochemical and biophysical research communications* 129 (2), S. 396–403. DOI: 10.1016/0006-291x(85)90164-0.

Mom, C. H.; Engelen, M. J. A.; Willemse, P. H. B.; Gietema, J. A.; Hoor, K. A. ten; Vries, E. G. E. de; van der Zee, A. G. J. (2007): Granulosa cell tumors of the ovary: the clinical value of serum inhibin A and B levels in a large single center cohort. In: *Gynecologic oncology* 105 (2), S. 365–372. DOI: 10.1016/j.ygyno.2006.12.034.

Mottram, J. C.; Cramer, W. (1923): ON THE GENERAL EFFECTS OF EXPOSURE TO RADIUM ON METABOLISM AND TUMOUR GROWTH IN THE RAT AND THE SPECIAL EFFECTS ON TESTIS AND PITUITARY. In: *Exp Physiol* 13 (3), S. 209–226. DOI: 10.1113/expphysiol.1923.sp000291.

Movahedi-Lankarani, Saeid; Kurman, Robert J. (2002): Calretinin, a more sensitive but less specific marker than alpha-inhibin for ovarian sex cord-stromal neoplasms: an immunohistochemical study of 215 cases. In: *The American journal of surgical pathology* 26 (11), S. 1477–1483. DOI: 10.1097/00000478-200211000-00010.

Murakata, L. A.; Ishak, K. G. (2001): Expression of inhibin-alpha by granular cell tumors of the gallbladder and extrahepatic bile ducts. In: *The American journal of surgical pathology* 25 (9), S. 1200–1203. DOI: 10.1097/00000478-200109000-00012.

Muttukrishna, S.; George, L.; Fowler, P. A.; Groome, N. P.; Knight, P. G. (1995): Measurement of serum concentrations of inhibin-A (alpha-beta A dimer) during human pregnancy. In: *Clinical endocrinology* 42 (4), S. 391–397. DOI: 10.1111/j.1365-2265.1995.tb02648.x.

Muttukrishna, S.; Jauniaux, E.; Greenwold, N.; McGarrigle, H.; Jivraj, S.; Carter, S. et al. (2002): Circulating levels of inhibin A, activin A and follistatin in missed and recurrent miscarriages. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 17 (12), S. 3072–3078. DOI: 10.1093/humrep/17.12.3072.

Mylonas, Ioannis (2010): Inhibin- α , - β A and - β B subunits in uterine non-endometrioid carcinomas: prognostic significance and clinical implications. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 46 (13), S. 2485–2493. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.06.001.

Mylonas, Ioannis; Dian, Darius (2011): Inhibin- α subunit in normal and malignant human cervical tissue and cervical cancer cell lines. In: *Oncology reports* 26 (4), S. 887–891. DOI: 10.3892/or.2011.1379.

Mylonas, Ioannis; Makovitzky, Josef; Richter, Dagmar-Ulrike; Jeschke, Udo; Briesse, Volker; Friese, Klaus (2004): Expression of the inhibin- α subunit in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue: an immunohistochemical analysis. In: *Gynecologic oncology* 93 (1), S. 92–97. DOI: 10.1016/j.ygyno.2003.12.042.

Mylonas, Ioannis; Worbs, Silvia; Shabani, Naim; Kuhn, Christina; Kunze, Susanne; Schulze, Sandra et al. (2009): Inhibin- α subunit is an independent prognostic parameter in human endometrial carcinomas: analysis of inhibin/activin- α , - β A and - β B subunits in 302 cases. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 45 (7), S. 1304–1314. DOI: 10.1016/j.ejca.2009.01.008.

Namwanje, Maria; Brown, Chester W. (2016): Activins and Inhibins: Roles in Development, Physiology, and Disease. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (7). DOI: 10.1101/cshperspect.a021881.

Nofech-Mozes, Sharon; Ismiil, Nadia; Dubé, Valérie; Saad, Reda S.; Khalifa, Mahmoud A.; Moshkin, Olga; Ghorab, Zeina (2012): Immunohistochemical characterization of primary and recurrent adult granulosa cell tumors. In: *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 31 (1), S. 80–90. DOI: 10.1097/PGP.0b013e318224e089.

Oseto, Kumiko; Suzumori, Nobuhiro; Nishikawa, Ryutaro; Nishikawa, Hiroshi; Arakawa, Atsushi; Ozaki, Yasuhiko et al. (2014): Mutational analysis of FOXL2 p.C134W and expression of bone morphogenetic protein 2 in Japanese patients with granulosa

cell tumor of ovary. In: *The journal of obstetrics and gynaecology research* 40 (5), S. 1197–1204. DOI: 10.1111/jog.12324.

Pan, Chin-Chen; Chen, Paul Chih-Hsueh; Tsay, Shyh-Haw; Ho, Donald Ming-Tak (2005): Differential immunoprofiles of hepatocellular carcinoma, renal cell carcinoma, and adrenocortical carcinoma: a systemic immunohistochemical survey using tissue array technique. In: *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 13 (4), S. 347–352. DOI: 10.1097/01.pai.0000146525.72531.19.

Parfitt, J. R.; McLean, C. A.; Joseph, M. G.; Streutker, C. J.; Al-Haddad, S.; Driman, D. K. (2006): Granular cell tumours of the gastrointestinal tract: expression of nestin and clinicopathological evaluation of 11 patients. In: *Histopathology* 48 (4), S. 424–430. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2006.02352.x.

Parviainen, Helka; Schrade, Anja; Kiiveri, Sanne; Prunskaitė-Hyyryläinen, Renata; Haglund, Caj; Vainio, Seppo et al. (2013): Expression of Wnt and TGF- β pathway components and key adrenal transcription factors in adrenocortical tumors: association to carcinoma aggressiveness. In: *Pathology, research and practice* 209 (8), S. 503–509. DOI: 10.1016/j.prp.2013.06.002.

Păun, Diana; Neamțu, Marius Cristian; Avramescu, Elena Taina; Georgescu, Mădălina Gabriela; Petriș, Rodica; Terzea, Dana et al. (2014): Inhibin alpha-subunit, Melan A and MNF116 in pheochromocytomas. In: *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 55 (3), S. 905–908.

Pelkey, T. J.; Frierson, H. F.; Mills, S. E.; Stoler, M. H. (1998a): The alpha subunit of inhibin in adrenal cortical neoplasia. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 11 (6), S. 516–524.

Pelkey, T. J.; Frierson, H. F.; Mills, S. E.; Stoler, M. H. (1998b): The diagnostic utility of inhibin staining in ovarian neoplasms. In: *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 17 (2), S. 97–105. DOI: 10.1097/00004347-199804000-00001.

Pierik, F. H.; Vreeburg, J. T.; Stijnen, T.; Jong, F. H. de; Weber, R. F. (1998): Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83 (9), S. 3110–3114. DOI: 10.1210/jcem.83.9.5121.

Rekhi, Bharat; Jambhekar, Nirmala A. (2010): Morphologic spectrum, immunohistochemical analysis, and clinical features of a series of granular cell tumors of soft tissues: a study from a tertiary referral cancer center. In: *Annals of diagnostic pathology* 14 (3), S. 162–167. DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2010.01.005.

Renshaw, A. A.; Granter, S. R. (1998): A comparison of A103 and inhibin reactivity in adrenal cortical tumors: distinction from hepatocellular carcinoma and renal tumors. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 11 (12), S. 1160–1164.

Rimm, D. L.; Camp, R. L.; Charette, L. A.; Costa, J.; Olsen, D. A.; Reiss, M. (2001): Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. In: *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 7 (1), S. 24–31.

Riopel, M. A.; Perlman, E. J.; Seidman, J. D.; Kurman, R. J.; Sherman, M. E. (1998): Inhibin and epithelial membrane antigen immunohistochemistry assist in the diagnosis of sex cord-stromal tumors and provide clues to the histogenesis of hypercalcemic small cell carcinomas. In: *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 17 (1), S. 46–53. DOI: 10.1097/00004347-199801000-00009.

Rivier, J.; Spiess, J.; McClintock, R.; Vaughan, J.; Vale, W. (1985): Purification and partial characterization of inhibin from porcine follicular fluid. In: *Biochemical and biophysical research communications* 133 (1), S. 120–127. DOI: 10.1016/0006-291x(85)91849-2.

Robertson, D. M.; Foulds, L. M.; Leversha, L.; Morgan, F. J.; Hearn, M. T.; Burger, H. G. et al. (1985): Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. In: *Biochemical and biophysical research communications* 126 (1), S. 220–226. DOI: 10.1016/0006-291x(85)90594-7.

Robertson, D. M.; Stephenson, T.; Pruysers, E.; Burger, H. G.; McCloud, P.; Tsigos, A. et al. (2002): Inhibins/activins as diagnostic markers for ovarian cancer. In: *Molecular and cellular endocrinology* 191 (1), S. 97–103. DOI: 10.1016/s0303-7207(02)00060-6.

Salonen, Jonna; Rajpert-De Meyts, Ewa; Mannisto, Susanna; Nielsen, John E.; Graem, Niels; Toppari, Jorma; Heikinheimo, Markku (2010): Differential developmental expression of transcription factors GATA-4 and GATA-6, their cofactor FOG-2 and

downstream target genes in testicular carcinoma in situ and germ cell tumors. In: *European journal of endocrinology* 162 (3), S. 625–631. DOI: 10.1530/EJE-09-0734.

Sangoi, Ankur R.; Fujiwara, Mika; West, Robert B.; Montgomery, Kelli D.; Bonventre, Joseph V.; Higgins, John P. et al. (2011): Immunohistochemical distinction of primary adrenal cortical lesions from metastatic clear cell renal cell carcinoma: a study of 248 cases. In: *The American journal of surgical pathology* 35 (5), S. 678–686. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3182152629.

Sangoi, Ankur R.; McKenney, Jesse K. (2010): A tissue microarray-based comparative analysis of novel and traditional immunohistochemical markers in the distinction between adrenal cortical lesions and pheochromocytoma. In: *The American journal of surgical pathology* 34 (3), S. 423–432. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3181cfb506.

Schraith, Daniel F.; Hahm, Geoffrey K.; Niemann, Theodore H.; DeYoung, Barry R. (2003): Alpha-inhibin immunoreactivity in soft-tissue neoplasia. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 16 (12), S. 1205–1209. DOI: 10.1097/01.MP.0000095647.58306.DB.

Schwartz, N. B.; Channing, C. P. (1977): Evidence for ovarian "inhibin": suppression of the secondary rise in serum follicle stimulating hormone levels in proestrous rats by injection of porcine follicular fluid. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12), S. 5721–5724. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5721.

Setsu, Nokitaka; Kohashi, Kenichi; Endo, Makoto; Yamamoto, Hidetaka; Ohishi, Yoshihiro; Sueyoshi, Kazunobu et al. (2012): Inhibin- α and synaptophysin immunoreactivity in synovial sarcoma with granular cell features. In: *Human pathology* 43 (6), S. 850–857. DOI: 10.1016/j.humpath.2011.07.012.

Shi, S. R.; Key, M. E.; Kalra, K. L. (1991): Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 39 (6), S. 741–748. DOI: 10.1177/39.6.1709656.

Singh, Priyanka; Jenkins, Laura M.; Horst, Ben; Alers, Victoria; Pradhan, Shrikant; Kaur, Prabhjot et al. (2018): Inhibin Is a Novel Paracrine Factor for Tumor Angiogen-

esis and Metastasis. In: *Cancer research* 78 (11), S. 2978–2989. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2316.

Spencer, K.; Wood, P. J.; Anthony, F. W. (1993): Elevated levels of maternal serum inhibin immunoreactivity in second trimester pregnancies affected by Down's syndrome. In: *Annals of clinical biochemistry* 30 (Pt 2), S. 219–220. DOI: 10.1177/000456329303000226.

Stewart, C. J.; Jeffers, M. D.; Kennedy, A. (1997): Diagnostic value of inhibin immunoreactivity in ovarian gonadal stromal tumours and their histological mimics. In: *Histopathology* 31 (1), S. 67–74. DOI: 10.1046/j.1365-2559.1997.5780819.x.

Stewart, Colin J. R.; Crook, Maxine; Tan, Adeline (2016): SF1 immunohistochemistry is useful in differentiating uterine tumours resembling sex cord-stromal tumours from potential histological mimics. In: *Pathology* 48 (5), S. 434–440. DOI: 10.1016/j.pathol.2016.03.013.

StGroth, S. F. de; Scheidegger, D. (1980): Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. In: *Journal of immunological methods* 35 (1-2), S. 1–21. DOI: 10.1016/0022-1759(80)90146-5.

The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project (2013). In: *Nature genetics* 45 (6), S. 580–585.

Tissue expression of INHA - Staining in heart muscle - The Human Protein Atlas (2023). Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000123999-INHA/tissue/heart+muscle>, zuletzt aktualisiert am 26.04.2023, zuletzt geprüft am 26.04.2023.

Tissue expression of INHA - Summary - The Human Protein Atlas (2023). Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000123999-INHA/tissue>, zuletzt aktualisiert am 08.05.2023, zuletzt geprüft am 08.05.2023.

Torhorst, J.; Bucher, C.; Kononen, J.; Haas, P.; Zuber, M.; Köchli, O. R. et al. (2001): Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. In: *The American journal of pathology* 159 (6), S. 2249–2256. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63075-1.

Treetampinich, C.; O'Connor, A. E.; MacLachlan, V.; Groome, N. P.; Kretser, D. M. de (2000): Maternal serum inhibin A concentrations in early pregnancy after IVF and

embryo transfer reflect the corpus luteum contribution and pregnancy outcome. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 15 (9), S. 2028–2032. DOI: 10.1093/humrep/15.9.2028.

Uhlen, Mathias; Bandrowski, Anita; Carr, Steven; Edwards, Aled; Ellenberg, Jan; Lundberg, Emma et al. (2016): A proposal for validation of antibodies. In: *Nat Methods* 13 (10), S. 823–827. DOI: 10.1038/nmeth.3995.

Uhlén, Mathias; Fagerberg, Linn; Hallström, Björn M.; Lindskog, Cecilia; Oksvold, Per; Mardinoglu, Adil et al. (2015): Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. In: *Science (New York, N.Y.)* 347 (6220), S. 1260419. DOI: 10.1126/science.1260419.

Ulbright, T. M.; Srigley, J. R.; Reuter, V. E.; Wojno, K.; Roth, L. M.; Young, R. H. (2000): Sex cord-stromal tumors of the testis with entrapped germ cells: a lesion mimicking unclassified mixed germ cell sex cord-stromal tumors. In: *The American journal of surgical pathology* 24 (4), S. 535–542. DOI: 10.1097/00000478-200004000-00007.

Vale, W.; Rivier, J.; Vaughan, J.; McClintock, R.; Corrigan, A.; Woo, W. et al. (1986): Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. In: *Nature* 321 (6072), S. 776–779. DOI: 10.1038/321776a0.

van Lith, J. M.; Pratt, J. J.; Beekhuis, J. R.; Mantingh, A. (1992): Second-trimester maternal serum immunoreactive inhibin as a marker for fetal Down's syndrome. In: *Prenatal diagnosis* 12 (10), S. 801–806. DOI: 10.1002/pd.1970121005.

Vered, Marilena; Carpenter, William M.; Buchner, Amos (2009): Granular cell tumor of the oral cavity: updated immunohistochemical profile. In: *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 38 (1), S. 150–159. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2008.00725.x.

WALD, NICHOLAS J.; DENSEM, JAMES W.; GEORGE, LYNNE; MUTTUKRISHNA, SHAUTHI; KNIGHT, PHILIP G. (1996): PRENATAL SCREENING FOR DOWN'S SYNDROME USING INHIBIN-A AS A SERUM MARKER. In: *Prenatal diagnosis* 16 (2), S. 143–153. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0223(199602)16:2<143::AID-PD825>3.0.CO;2-F.

Weissferdt, Annikka; Phan, Alexandria; Suster, Saul; Moran, Cesar A. (2014): Adrenocortical carcinoma: a comprehensive immunohistochemical study of 40 cases. In: *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 22 (1), S. 24–30. DOI: 10.1097/PAI.0b013e31828a96cf.

Worbs, Silvia; Shabani, Naim; Mayr, Doris; Gingelmaier, Andrea; Makrigiannakis, Antonios; Kuhn, Christina et al. (2007): Expression of the inhibin/activin subunits (-alpha, -betaA and -betaB) in normal and carcinogenic endometrial tissue: possible immunohistochemical differentiation markers. In: *Oncology reports* 17 (1), S. 97–104.

Yamashita, K.; Yamoto, M.; Shikone, T.; Minami, S.; Imai, M.; Nishimori, K.; Nakano, R. (1997): Production of inhibin A and inhibin B in human ovarian sex cord stromal tumors. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 177 (6), S. 1450–1457. DOI: 10.1016/s0002-9378(97)70090-5.

Yao, Davis X.; Soslow, Robert A.; Hedvat, Cyrus V.; Leitao, Mario; Baergen, Rebecca N. (2003): Melan-A (A103) and inhibin expression in ovarian neoplasms. In: *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 11 (3), S. 244–249. DOI: 10.1097/00129039-200309000-00007.

Zamecnik, Michal; Michal, Michal; Mukensnabl, Petr (2003): Reactivity of granular cell tumors for inhibin and other markers of sex cord and steroid cell differentiation. In: *The American journal of surgical pathology* 27 (3), S. 413–414. DOI: 10.1097/00000478-200303000-00019.

Zhang, Hong-Ying; Wang, Xiao-Jie; Liu, Wei-Ping; Jiang, Li-Li; Li, Gan-Di; Guo, Jia; Zhang, Yuan-Heng (2004): Diagnostic value of A103 and inhibin-alpha in adrenocortical tumors: an immunohistochemical study using tissue microarray techniques. In: *Zhonghua bing li xue za zhi = Chinese journal of pathology* 33 (3), S. 203–207.

Zhang, Paul J.; Genega, Elizabeth M.; Tomaszewski, John E.; Pasha, Teresa L.; LiVolsi, Virginia A. (2003): The role of calretinin, inhibin, melan-A, BCL-2, and C-kit in differentiating adrenal cortical and medullary tumors: an immunohistochemical study. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 16 (6), S. 591–597. DOI: 10.1097/01.MP.0000073134.60541.E8.

Zhang, Xiaobo; Shen, Danhua; Wang, Ying (2018): Detection of the DICER1 hotspot mutation alongside immunohistochemical analysis may provide a better diagnostic

measure for ovarian Sertoli-Leydig cell tumors. In: *Pathology, research and practice* 214 (9), S. 1370–1375. DOI: 10.1016/j.prp.2018.02.018.

Zhao, Chengquan; Barner, Ross; Vinh, Tuyethoa N.; McManus, Kim; Dabbs, David; Vang, Russell (2008): SF-1 is a diagnostically useful immunohistochemical marker and comparable to other sex cord-stromal tumor markers for the differential diagnosis of ovarian sertoli cell tumor. In: *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 27 (4), S. 507–514. DOI: 10.1097/PGP.0b013e31817c1b0a.

Zhao, Chengquan; Bratthauer, Gary L.; Barner, Ross; Vang, Russell (2007): Comparative analysis of alternative and traditional immunohistochemical markers for the distinction of ovarian sertoli cell tumor from endometrioid tumors and carcinoid tumor: A study of 160 cases. In: *The American journal of surgical pathology* 31 (2), S. 255–266. DOI: 10.1097/01.pas.0000213355.72638.f4.

Zheng, W.; Lu, J. J.; Luo, F.; Hsieh, J.; Wang, C. Y.; Zhang, C. et al. (2000): Tumor stroma as the main source of inhibin production in ovarian epithelial tumors. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 44 (2), S. 104–113. DOI: 10.1111/j.8755-8920.2000.440206.x.

Zheng, W.; Luo, M. P.; Welt, C.; Lambert-Messerlian, G.; Sung, C. J.; Zhang, Z. et al. (1998): Imbalanced expression of inhibin and activin subunits in primary epithelial ovarian cancer. In: *Gynecologic oncology* 69 (1), S. 23–31. DOI: 10.1006/gyno.1998.4958.

Zheng, W.; Sung, C. J.; Hanna, I.; DePetris, G.; Lambert-Messerlian, G.; Steinhoff, M.; Lauchlan, S. C. (1997): Alpha and beta subunits of inhibin/activin as sex cord-stromal differentiation markers. In: *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 16 (3), S. 263–271. DOI: 10.1097/00004347-199707000-00012.

9. Danksagung

Ich möchte diesen Abschnitt als Möglichkeit wahrnehmen, denjenigen Menschen zu denken, die mich unterstützt und geprägt haben. An erster Stelle möchte ich hier Herrn Professor Dr. Guido Sauter erwähnen, der mir einen Einblick in eines der größten Pathologieinstitute der Welt gewährte und mir im Rahmen dieser Doktorarbeit die Möglichkeit gab, Teil eines großen Ganzen zu werden. Des Weiteren möchte ich hier Herrn Professor Ronald Simon, Karin Breitmeyer und Melanie Witt für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit danken.

Ebenso danke ich meiner Familie, bei denen ich vor allem meine Cousine Salma Noori hervorheben möchte, und meinen Freunden, die mir in schweren Zeiten beistanden und unterstützten.

10. Eigenanteilserklärung

Das vorliegende Projekt wurde am Institut für Pathologie des UKE entwickelt. Mein Beitrag umfasste eine umfassende Literaturrecherche zur Expression von Inhibin alpha in Normalgeweben und Tumoren sowie die Mitarbeit an der Erstellung von TMAs und der anschließenden Auswertung der Färbungen.

Zur Identifikation geeigneter Tumorfälle für die TMAs recherchierte ich im Pathologieinformationssystem des UKE und stellte eine Vorauswahl zusammen. Diese Gewebeblöcke wurden dann den MTAs zur Prüfung auf Eignung vorgelegt.

Die Wahl des optimalen Antikörpers sowie die Festlegung der geeigneten Verdünnung erfolgte in enger Abstimmung mit meinem Betreuer. Hierfür wurden verschiedene Testfärbungen durchgeführt, um die bestmögliche Methodik zu ermitteln.

Darüber hinaus war ich für die Erfassung der anonymisierten Patientendaten verantwortlich. Dies umfasste histopathologische Parameter der als geeignet eingestuften Gewebeblöcke, die in einer Excel-Tabelle dokumentiert wurden, um mögliche Korrelationen zwischen den Färbungsergebnissen und prognostischen Faktoren zu untersuchen.

Ich war zudem für die Erfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen in einer Excel-Tabelle, und die Aufbereitung dieser Daten für die anschließende statistische Analyse verantwortlich. Die Färbungen selbst und die Beurteilung der Färbungen erfolgten durch technisches Personal und eine erfahrene Pathologin des Instituts für Pathologie.

Die statistische Analyse dieser Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Simon vom Institut für Pathologie des UKE.

Die Bewertung der Färbungsintensität wurde von einem Pathologen durchgeführt, während ich die vollständige Dokumentation dieser Ergebnisse übernahm.

Schließlich wurde die hier vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe geschrieben.

11. Eidesstattliche Erklärung

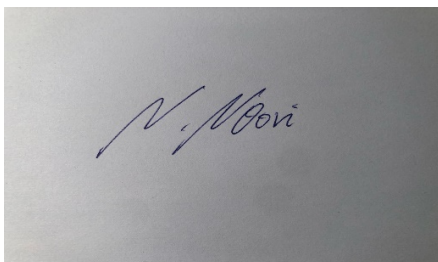
Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich 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.

Unterschrift:

A photograph of a handwritten signature in blue ink on a light-colored surface. The signature is written in a cursive style and appears to read 'N. Bövi'.