

**Expression von Anterior Gradient 2 (AGR2) im menschlichen
Tumor- und Normalgewebe. Eine Tissue-Microarray-Studie
an über 14,000 Tumoren aus 134 verschiedenen
Tumorentitäten**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jacob Constantin Port

aus

Hamburg

2025

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

Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Markus Glatzel

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Markus Glatzel

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Antonia Zapf

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Harriet Wikman-Kocher

Datum der mündlichen Prüfung: 24.03.2026

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 AGR2	4
1.2 Struktur	6
1.3 Funktion	7
1.4 Krankheitsbezug	8
1.5 Rolle von AGR2 in Tumoren	9
1.6 Zielsetzung	11
2. Material und Methoden	11
2.1 Tissue Microarray Technik.....	11
2.1.1 Selektion potenziell geeigneter Fälle.....	12
2.1.2 Untersuchung der Schnitte und Blöcke der vorselektierten Fälle	12
2.1.3 Planung des TMA.....	12
2.1.4 Herstellung des TMA	13
2.2 TMA-Blöcke der AGR2-Studie	15
2.3 Immunhistochemie.....	20
2.4 Immunhistochemischer Färbeablauf unserer Studie	22
2.5 Auswertung	24
2.6 Statistik.....	25
3. Ergebnisse	26
3.1 Technische Aspekte	26
3.2 AGR2-Immunfärbung des Normalgewebes.....	26
3.3 AGR2-Immunfärbung von Tumoren	39
4. Diskussion	55
5. Zusammenfassung	64
6. English Summary	65
7. Abkürzungsverzeichnis	66
8. Literaturverzeichnis	67
9. Danksagung	74
10. Erklärung des Eigenanteils	75
11. Eidesstattliche Versicherung	76

1. Einleitung

1.1 AGR2

Anterior Gradient 2 ist ein Protein, das vom AGR2-Gen aus der AGR-Subfamilie im Menschen exprimiert wird (Delom et al., 2020). Es ist hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und der Familie der Proteindisulfid-Isomerasen (PDI) zugehörig. Das Protein wird auch als XAG-2 (Xenopus Anterior Gradient 2) bezeichnet, weil es ursprünglich im Frosch *Xenopus laevis* entdeckt wurde, wo es eine wichtige Rolle in der Reifung der Zementdrüsen und in der Embryonalentwicklung spielt (Jach et al., 2021). AGR2 wird auch als HAG (Human Anterior Gradient 2) (Thompson and Weigel, 1998) und als PDIA17 bezeichnet, da es das 17. Familienmitglied der PDI ist (Moidu et al., 2020). AGR2-Expression wurde beim Menschen zuerst in östrogen-positiven Brustkrebszellen entdeckt und später in Tumoren von Pankreas, Ösophagus, Lunge und Prostata (Delom et al., 2020). Physiologisch wird AGR2 in Gewebe exprimiert, in dem Mukus gebildet wird sowie in Organen, die vom Endoderm abstammen, wie Organe des Gastrointestinaltraktes, Lunge und Prostata (Moidu et al., 2020). Die höchste RNA-Expression ist im Magen, Rektum, Kolon und Cervix zu finden (RNA Expression Overview - The Human Protein Atlas; https://www.proteinatlas.org/ENSG00000106541-AGR2/tissue#rna_expression)

(Abbildung 1).

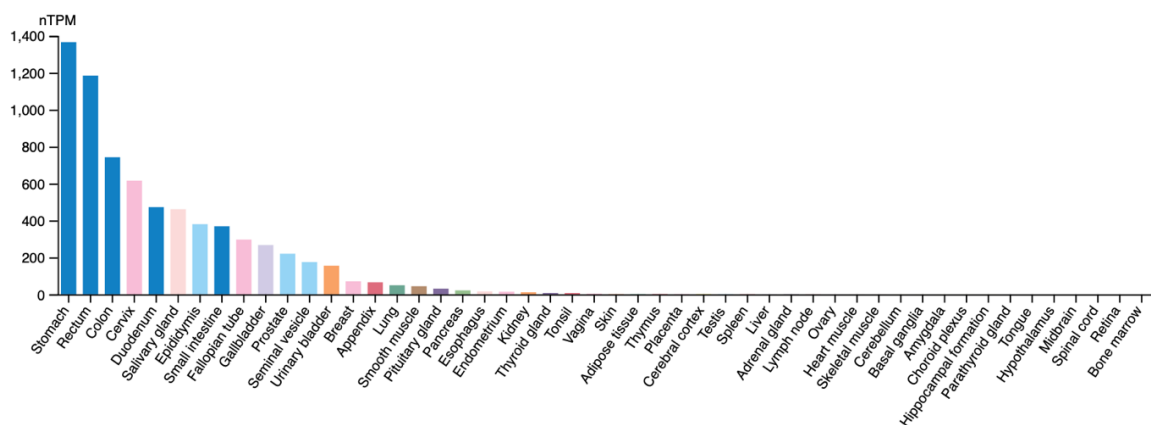


Abbildung 1: RNA-Expression von AGR2 im Normalgewebe (The Human Protein Atlas, November 2024)

Auf zellulärer Ebene ist AGR2 am häufigsten in den Becherzellen des Gastrointestinaltraktes exprimiert (Patel et al., 2013). AGR2 ist in seiner zellulären Lokalisation nicht auf das Endoplasmatische Retikulum beschränkt und auch im Zytoplasma, Mitochondrien, Zelloberfläche und in der Extrazellulären Matrix als eAGR2 zu finden. Die Mechanismen, die zum Abweichen der Lokalisation vom ER führen sind

unbekannt. Eine Mislokalisierung von AGR2 führt zu zahlreichen Interaktionen mit Proteinen, welche in der Proteostase und Signaltransduktionen involviert sind (Delom et al., 2020). AGR2 hat eine Masse von etwa 17 kDa und besteht aus einer Sequenz von 175 Aminosäuren. Im humanen Genom ist es auf dem Chromosom 7p21 lokalisiert. Es besteht aus mehreren funktionellen Domänen (Abbildung 2). Am N-Terminus befindet sich eine NH₂-terminale Signalsequenz für die Lokalisation im ER von Aminosäure (AS) 1-21, eine Thioredoxin-ähnliche Domäne von AS 81-84 sowie eine COOH-terminale ER-Retentionssequenz am C-Terminus von AS 172-175. Des Weiteren enthält AGR2 eine Adhäsionsdomäne von AS 21-44, eine Dimerisierungsdomäne von AS 60-64 und eine Peptid-Bindungsschleife von AS 104-111 (Delom et al., 2020, Jach et al., 2021).

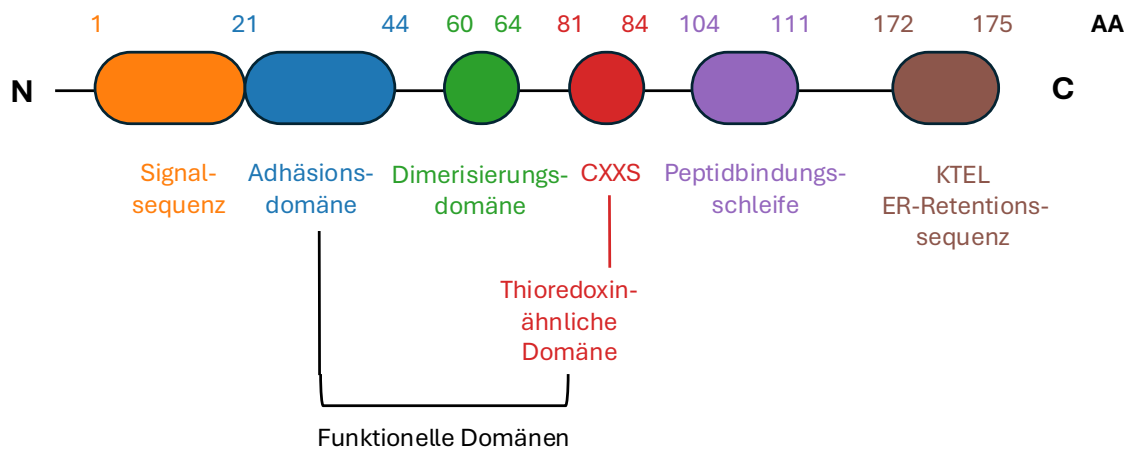


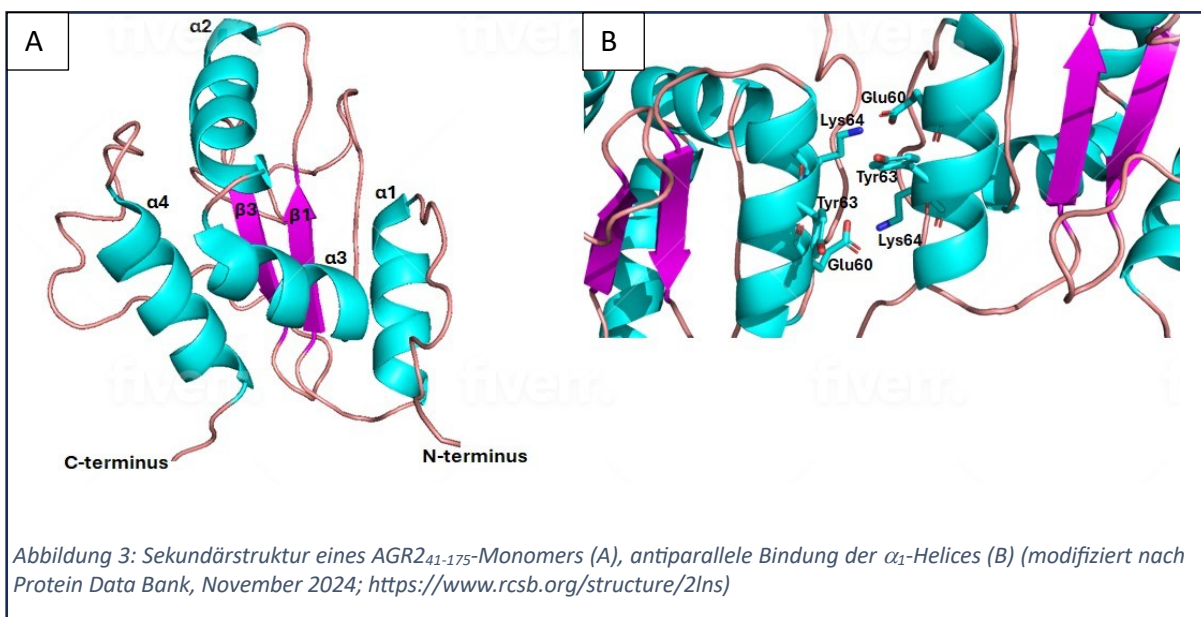
Abbildung 2: Domänen von AGR2 (modifiziert nach Delom et al., 2020)

AGR2 ist als Mitglied der Familie der Proteindisulfid-Isomerasen an der oxidativen Proteinfaltung im ER beteiligt. Hierfür wird die thioredoxin-ähnliche Domäne (CXXS) benötigt welche aus Cystein, Prolin, Histidin und Serin besteht (Galligan and Petersen, 2012). Proteindisulfid-Isomerasen haben eine bis vier aktive CXXC-Domänen. Diese katalysieren den Prozess der oxidativen Proteinfaltung und die Isomerisierung von Disulfidbindungen, um die thermodynamisch günstigste und korrekte Form eines Proteins zu erhalten. Außerdem können sie als Chaperon fungieren und die Aggregation von Proteinen verhindern. Die Disulfidbindungen (S-S) zwischen Proteinen werden zwischen den Cystein-Residuen der jeweiligen Aminosäureketten ausgebildet (Zhang et al., 2023). Obwohl AGR2 nur eine thioredoxin-ähnliche Domäne mit einem einzelnen Cystein enthält, ist seine Redoxkapazität der einer klassischen CXXC-Domäne ebenbürtig. Kernspinresonanz zeigt, dass AGR2 vor allem als Homodimer vorliegt. Die CXXS-Domänen des Dimers befinden sich dabei gegenüberliegend und distant zur Dimerisierungsdomäne (Moidu et al., 2020, Delom et al., 2020, Patel et al., 2013).

Zur Lokalisation von AGR2 im ER sind zwei Mechanismen erforderlich. Zum einen wird die N-terminale Signalsequenz benötigt, um das translatierte Protein in das ER zu befördern, zum anderen eine ER-Retentionssequenz (KTEL), welche zur Retention des Proteins im ER führt. Die Sequenz besteht aus den Aminosäuren Lysin, Threonin, Glutamat und Leucin und bindet an drei bekannte KDEL-Rezeptoren (Gupta et al., 2012). Diese Mechanismen lassen vermuten, dass das ER die physiologische Umgebung von AGR2 ist (Moidu et al., 2020).

1.2 Struktur

AGR2 kann als Monomer und als Homodimer vorliegen. Modelle, ermittelt über Kernspinresonanzspektroskopie und Residuale Dipolare Kopplung, zeigen, dass jede AGR2-Untereinheit aus einem viersträngigen β -Faltblatt-Kern gebildet wird, welcher wiederum von vier α -Helices umgeben ist (Abbildung 3A). Es handelt sich um eine α - β - α - α - β - β - α -Anordnung, welche wie folgt gegliedert ist: α_1 AS 58-67, β_1 AS 72-77, α_2 AS 82-93, α_3 AS 95-103, β_2 AS 105-108, β_3 AS 127-132, β_4 AS 135-138, α_4 AS 157-168. Die Formierung zu einem Homodimer erfolgt an den α_1 -Helices der zwei AGR2-Untereinheiten, über welche diese antiparallel miteinander interagieren. Die Bindungssequenz befindet sich an den AS-Positionen 60-64 und wird als EAYLK (Glutamat, Alanin, Thyrosin, Leucin, Lysin) bezeichnet. Die AGR2-Untereinheiten interagieren dabei untereinander über eine Salzbrücke zwischen der Carboxylatgruppe von E60 und der Ammoniumgruppe von K64 (Abbildung 3B). Mutationen dieser Sequenz führen zu einer gestörten Dimerisierung. (Patel et al., 2013).



1.3 Funktion

Nach der Proteintranslation werden bestimmte Proteine in das Lumen des ER transportiert und dort gefaltet (Chevet et al., 2001). Das ER verfügt über eine Proteinqualitätskontrolle (ERQC), wodurch gewährleistet wird, dass nur korrekt gefaltete Proteine das Lumen des ER verlassen und weiter entlang des sekretorischen Weges transportiert werden können (Higa et al., 2011). Die Expression von AGR2 ist bei ER-Stress hochreguliert und wird im Rahmen der Unfolded Protein Response (UPR) von IRE1 α (Inositol-requiring Enzyme 1) und ATF6 α (Activating Transcription Factor 6) reguliert. Es wird vermutet, dass AGR2 als Mitglied der Familie der PDI in der Aufrechterhaltung der ER-Homöostase involviert ist (Higa et al., 2011). Proteindisulfid-Isomerasen katalysieren den Prozess der oxidativen Proteinfaltung, indem ihre Cystein-Residuen die Elektronen von fehlerhaft gefalteten Proteinen aufnehmen, wodurch sie die Ausbildung korrekter Disulfidbindungen initiieren (Vincenz-Donnelly and Hipp, 2017).

Des Weiteren wird AGR2 eine Rolle in der Muzinreifung bei Mäusen zugesprochen. Bei der Untersuchung einer AGR2-defizienten Maus wurde festgestellt, dass die MUC2 mRNA der Becherzellen um das Dreifache reduziert war und somit weniger intestinaler Mukus produziert werden konnte. Aufgrund der Abwesenheit von AGR2 und der dadurch verminderten Mukusproduktion resultierte eine geschwächte Barriere der Darmschleimhaut sowie eine Colitis. Es besteht die These, dass die thioredoxin-ähnliche Domäne von AGR2 mit den Cystein-Residuen von MUC2 interagiert, mit diesen gemischte Disulfidbindungen bildet und somit an der Muzinreifung und Mukusproduktion beteiligt ist (Park et al., 2009). Alle Mitglieder der AGR-Familie (AG1, AGR2 und AGR3) werden mit der Regeneration von Gliedmaßen- und Schwanzregulation von Kaulquappen des *Xenopus laevis* assoziiert. (Ivanova et al., 2013). Es konnte mittels Western-Blot und AGR2-Immunfärbung festgestellt werden, dass AGR2 und der Keratinozyten-Proliferationsmarker (K14) zwei bis neun Tage nach der Verletzung der Haut einer Maus signifikant erhöht waren. Daraufhin wurden Hautverletzungen von Mäusen mit verschiedenen Konzentrationen von AGR2 (25, 100 und 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) topisch behandelt. Die Resultate zeigten eine Korrelation zwischen hoher AGR2-Konzentration und beschleunigter Wundheilung. Zusätzlich wurde festgestellt, dass AGR2 die Migration von Fibroblasten und Keratinozyten im Wundgewebe erhöht sowie die Aktivierung von Fibroblasten fördert. Generierte Varianten von AGR2, bei denen die jeweiligen funktionellen Domänen Mutationen aufweisen, offenbarten den stimulierenden Effekt der Adhäsionsdomäne von AGR2 auf die Zellmigration im Wundgewebe. Die Zellmigration dieser Variante war im Vergleich zum Wildtyp AGR2 um das Dreifache reduziert (Zhu et al., 2017).

Weitere Studien zeigen, dass AGR2 im Zusammenhang mit der Geweberegeneration steht. Bei einer durch Caerulein induzierten Pankreatitis der Maus wurde mittels

Immunhistochemie (IHC) eine erhöhte AGR2-Expression festgestellt, während im gesunden Pankreasgewebe die Expression von AGR2 nicht vorhanden war. Die Autoren stellten im Verlauf der Pankreatitis eine Lokalisationsveränderung des EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) vom ER (Co-Lokalisation mit Calretikulin) zur Zellmembran (Co-Lokalisation mit E-Cadherin) der Azinuszellen fest. Im Gegensatz dazu verblieb der EGFR bei einer AGR2-/- Maus während der durch Caerulein ausgelösten Pankreatitis im ER zurück und zeigte keine Translokation zur Zellmembran. In dieser Versuchsreihe konnten alle Mäuse mit suffizienter AGR2-Expression regenerieren, während die Mäuse mit einer AGR2-Defizienz starben. Nukleäres YAP1 (Yes Associated Protein 1), ein Co-Aktivatoren des Hippo-Signalweges, war bei suffizienter AGR2-Expression signifikant erhöht. Bei Aktivierung transloziert YAP1 vom Zytoplasma in den Zellkern, wo es die Expression mehrerer Gene, einschließlich des EGFR-Liganden AREG (Amphiregulin) induziert (Wodziak et al., 2016). EGFR kann nur durch die physische Interaktion mit AGR2 vom ER in den Golgi-Apparat und weiter entlang des sekretorischen Weges transportiert werden. Durch das Fehlen von EGFR an der Zellmembran kann das Signal von Liganden nicht adäquat weitergeleitet und regenerationsfördernde Signale wie z.B. Zellproliferation nicht vermittelt werden (Dong et al., 2015).

Aufgrund der Funktionen von AGR2 in der Wundheilung und Geweberegeneration in anderen Wirbeltieren, wird von den Autoren vermutet, dass AGR2 einen diesbezüglich potenziell nützlichen Effekt im menschlichen Gewebe haben könnte (Zhu et al., 2017, Kosykh et al., 2023).

1.4 Krankheitsbezug

Das IBD (Inflammatory Bowel Disease) wird hauptsächlich in die zwei Krankheitsentitäten Morbus Crohn und Colitis ulcerosa eingeteilt. Sie sind chronische, entzündliche Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, die kontinuierlich oder in Krankheitsschüben rezidivierende, entzündliche Veränderung des Dünns- und Dickdarms verursachen. Obwohl zahlreiche Studien zur Erkrankung publiziert worden sind, ist die Ätiologie der IBD noch nicht vollständig geklärt. Es besteht die These, dass es sich um eine komplexe multifaktorielle Erkrankung handelt, bei der genetische Prädispositionen, Mikroorganismen sowie autoimmunologische Prozesse die wesentlichen Faktoren sind (Zhang and Li, 2014). Ein Verlust der AGR2-Expression wurde von mehreren Studien mit einer Entzündung der Darmschleimhaut assoziiert. Ursächlich dafür ist zum einen die durch den AGR2-Verlust reduzierte Produktion von intestinalem MUC2, wodurch eine geschwächte Mukusbarriere und Abwehrfähigkeit des Epithels der Darmschleimhaut resultiert (Park et al., 2009, Zhao et al., 2010). Zum anderen kann eine gestörte regulatorische Funktion von AGR2 auf die ER-Homöostase einen Effekt auf spontane

intestinale Entzündungen ausüben (Kaser et al., 2013). Die Konstitution von AGR2 kann über die Stressregulation einer Zelle geändert werden. Somit kann AGR2 als Homodimer sowie als Monomer in Abhängigkeit der spezifischen Umgebungsbedingung vorliegen. Unter physiologischen Bedingungen liegt AGR2 hauptsächlich als Homodimer vor, während die Stressreaktion einer Zelle eine Störung der Dimerisierung verursachen kann. Infolgedessen bilden AGR2-Monomere funktionelle Komplexe mit der ER-assoziierten Proteindegradierung (ERAD), wodurch fehlerhafte Proteine abgebaut werden können. Eine gestörte AGR2-Expression wird mit IBD assoziiert, jedoch sind die exakten Pathomechanismen noch nicht vollständig verstanden, sodass weitere Studien zu dieser Thematik indiziert sind (Maurel et al., 2019).

1.5 Rolle von AGR2 in Tumoren

Die Expression von AGR2 ist in Tumoren zahlreicher Organe wie beispielsweise der Prostata (Zhang et al., 2007), Brust (Guo et al., 2017), Lunge (Pizzi et al., 2012a), Pankreas (Ramachandran et al., 2008) und Ovar (Park et al., 2011) erhöht. Eine erhöhte Expression von AGR2 kann zur Tumorentstehung beitragen, indem sie verschiedene pro-onkogene Prozesse fördert. Potenzielle Effekte umfassen die Stimulation von Zellproliferation (Takabatake et al., 2021, Fessart et al., 2021, Arumugam et al., 2015) und Migration (Arumugam et al., 2015, Zhang et al., 2021), epithelial-mesenchymale Transition (Zhang et al., 2021), Invasion (Luu et al., 2020, Di Maro et al., 2014) sowie eine erhöhte Resistenz gegenüber zytostatischen Medikamenten (Arumugam et al., 2015).

In der Brustkrebs-Zelllinie vom Typ MCF-7 wurde mittels siRNA (small interfering RNA) gegen AGR2 festgestellt, dass AGR2 als Inhibitor von p53 fungiert. In Abwesenheit von AGR2 war die Expression von p53 erhöht und an Ser15 und Ser392 phosphoryliert. Aufgrund der höheren p53-Konzentration wurde auch das negative Regulatorprotein Mdm2 (Mouse double minute 2 homolog) verstärkt exprimiert. Die Autoren beschreiben einen Mechanismus, bei dem AGR2 die DUSP10 (Dual Specificity Protein Phosphatase 10) hochreguliert, wodurch p38 MAPK (p38-mitogenaktivierte Proteinkinase) dephosphoryliert wird. Infolgedessen wird die Phosphorylierung von p53 an Ser15 und Ser392 inhibiert. Aus der reduzierten Phosphorylierung von p53 resultiert damit eine Inaktivierung des Tumorsuppressors (Hrstka et al., 2016).

Darüber hinaus wird beschrieben, dass eAGR2 die Zellproliferation in Tumorzellen der Lunge fördert, indem es p21/CDKN1A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A) negativ reguliert (Fessart et al., 2021). p21/CDKN1A kann über die Inhibition von CDKs (Cyclin Dependent Kinase) deren Komplexbildung mit Cyclinen verhindern und somit den Zellzyklus regulieren und arretieren (Manousakis et al., 2023). AGR2-eliminierte Zellen weisen ein reduziertes Zellwachstum und eine erhöhte p21-Expression auf, während das

Hinzufügen von AGR2 für entgegengesetzte Ergebnisse sorgt und somit die inverse Korrelation bestätigt. Der genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt. Die Autoren suggerieren, dass eAGR2 als Ligand für einen noch unbekanntem Rezeptor an der Zelloberfläche von Tumorzellen der Lunge fungieren könnte (Fessart et al., 2021).

Zhang et. al. beschreiben einen Mechanismus, bei dem iAGR2 (intrazelluläres AGR2) über seine KTEL-Domäne an drei KDEL-Rezeptoren der cis-Seite des Golgiapparats bindet und einen Signalweg fördert, der über die Genexpression der Transkriptionsfaktoren SNAIL (Snail Family Transcriptional Repressor 1) und SLUG (Snail Family Transcriptional Repressor 2) zur epithelial-mesenchymalen Transition und Metastasierung in kolorektalen Tumorzellen führt (Zhang et al., 2021).

Im dukalen Adenokarzinom des Pankreas der Maus wird AGR2 über eine Interaktion mit C4.4A (LY6/PLAUR domain containing 3) mit einer gesteigerten Proliferation, Migration, Invasion und Chemoresistenz in Verbindung gebracht. Eine Erhöhung des eAGR2 verstärkte die tumorfördernden Effekte, während durch siRNA und Antikörper gegen C4.4A die Wirkung von AGR2 eliminiert werden konnte. Die Autoren gehen davon aus, dass C4.4A, welches auf der Oberfläche von Tumorzellen des Pankreas lokalisiert ist, als funktioneller Rezeptor für eAGR2 wirken kann (Arumugam et al., 2015).

AGR2 kann im Prostatakarzinom einer Maus über seine thioredoxin-ähnliche Domäne mit VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor A) interagieren, wodurch die Aktivität der VEGFR/VEGRF2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 und 2) Signalkaskade gesteigert wird. Mutationen dieser Domäne hatten einen hemmenden Effekt auf die Angiogenese. Die Angiogenese ist ein wichtiger Faktor für das Tumorstadium und schafft einen Zugang zum Blutkreislauf, welcher für die Bildung von Metastasen in entfernten Organen relevant ist (Jia et al., 2018).

Während der Tumorzellproliferation findet eine vermehrte Translation zahlreicher Proteine statt, wodurch ER-Stress resultiert. Als Proteindisulfid-Isomerase kann AGR2 durch die korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine den proteotoxischen Stress in Tumorzellen reduzieren. Somit nimmt AGR2 eine nicht redundante Rolle bei der Tumoradaptation ein und bewahrt die Tumorzelle vor einer durch Stress induzierten Apoptose (Salmans et al., 2013).

Bisher wurden mindestens 30 Studien publiziert, welche die AGR2-Expression in insgesamt nur 20 Tumorentitäten mittels IHC untersucht haben (Medline November 2024). In 12 Entitäten, zu denen mehrere Studien existieren, ist die Diskrepanz der vorhandenen Daten teilweise groß. Beispielsweise wurden für Adenokarzinome der Lunge AGR2-Positivitätsraten von 56.8-100% (Ci and Wu, 2022, Pizzi et al., 2012a), 57-95.4% in Prostatakarzinomen (Bu et al., 2011, Zhang et al., 2007) und 19-46.1% in serösen Ovarialkarzinomen (Park et al., 2011, Armes et al., 2013) erzielt. Die Verwendung

unterschiedlicher Antikörper, die Nutzung verschiedener Färbeprotokolle sowie das subjektive Empfinden des Auswerters könnte ursächlich für die Datendiskrepanzen sein.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Klärung der Prävalenz und Muster der AGR2-Expression in menschlichen Tumor- und Normalgeweben. Aufgrund der hohen Diskrepanzen vorheriger Studien hinsichtlich dieser Expression sowie der vergleichsweise geringen Fallzahlen, wurde eine Studie im Tissue-Microarray-Format durchgeführt. Diese beinhaltete 14,966 Tumoren aus 134 Tumortypen und -subtypen sowie 608 Normalgewebeproben aus 76 verschiedenen Normalgewebstypen, welche immunhistochemisch untersucht wurden. Mit Hilfe dieser Prozedur soll die Expression von AGR2 eindeutig eingeordnet und ebenso die diagnostische und prognostische Relevanz des Proteins abgeschätzt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Tissue Microarray Technik

Ein Tissue Microarray (TMA) enthält eine große Anzahl kleiner Gewebefragmente in einem Tumorblock. Diese Technik ermöglicht die simultane Untersuchung vieler unterschiedlicher Gewebetypen auf einem Objektträger. Die Methode der TMA-Technik wurde 1998 zum ersten Mal von Kononen et. al vorgestellt, einer Arbeitsgruppe, in der Professor Dr. Guido Sauter, damals tätig am Institut für Pathologie am Universitätsspital Basel (Schweiz), mitgewirkt hat (Kononen et al., 1998). Ein TMA ist ein Paraffinblock, in welchen zylindrische Gewebeslots aus Spendergewebe eingebettet werden. Bis zu 1000 Gewebeslots können auf einem Objektträger simultan betrachtet und ausgewertet werden. Die Gewebeslots werden dabei in vordefinierter Anordnung in dem Paraffinblock positioniert. Mittels Mikrotom werden dünne Schnitte des TMA-Blocks angefertigt und auf Objektträgern platziert. Die Objektträger können anschließend immunhistochemisch gefärbt und von Pathologen ausgewertet werden. Die TMA-Methode ermöglicht eine erhebliche Reduktion von Zeit und Kosten sowie eine effiziente Nutzung des limitierten Spendergewebes. Zusätzlich ist der identische und hoch standardisierte Herstellungsprozess von Schnitten, die mit der TMA-Technik hergestellt werden, von großer Relevanz für eine repräsentative Auswertung (Jawhar, 2009).

Die Herstellung eines TMAs ist ein aufwändiger Prozess, der sich grundsätzlich in vier Arbeitsschritte gliedern lässt.

2.1.1 Selektion potenziell geeigneter Fälle

Über eine Volltextsuche in der Datenbank des Instituts für Pathologie am UKE (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) können potenziell geeignete Fälle ermittelt werden. Dabei kann über bestimmte Suchbegriffe, bezogen auf Tumor und Gewebe, nach verschiedensten Tumorentitäten gefiltert werden. Weitere Suchparameter hinsichtlich der Tumorgroße können hilfreich sein, um Fälle zu ermitteln, deren Paraffinblöcke ausreichend Gewebe zur Entnahme enthalten. Anhand der zugehörigen Pathologieberichte kann eine Vorselektion durchgeführt werden, sodass nur Fälle verwendet werden, die eine eindeutige Diagnose aufweisen. Des Weiteren soll das Tumorgewebe durch den Therapieverlauf oder durch ausgedehnte Nekrosen nicht verändert sein.

2.1.2 Untersuchung der Schnitte und Blöcke der vorselektierten Fälle

Die jeweiligen Schnitte der ausgewählten Fälle werden aus dem Archiv herausgesucht und mikroskopisch durch einen Pathologen beurteilt. Am Hämatoxylin-Eosin (HE) Schnitt wird das Tumoreal mit einem Filzstift markiert. Wenn das auf dem Schnitt dargestellte Tumoreal kleiner als 1cm^2 ist, wird der Fall ausgeschlossen. Auch Schnitte auf denen ausgedehnte Nekrosen erkennbar sind, werden ausgeschlossen. Anschließend werden die zugehörigen Paraffinblöcke der Schnitte mit einem ausreichend großen Tumoreal aus dem Archiv herausgesucht und in ihrer Qualität von einer erfahrenen MTA (Medizinisch Technische Assistenz) überprüft. Ein wichtiges Kriterium der Blockauswahl für die TMA-Herstellung ist eine Mindesttiefe des Gewebes von 2mm. Es ist von Vorteil möglichst dicke Gewebelöcke auszuwählen, da durch diese die Länge der entnommenen Stanze definiert wird. Je dicker der Gewebelöck, desto mehr Gewebe kann in den TMA übernommen werden, wodurch im Folgenden mehr Schnitte angefertigt und auf Objektträger übertragen werden können.

2.1.3 Planung des TMA

Nach der Auswahl der geeigneten Blöcke für die TMA-Herstellung wird die Anordnung der Gewebeproben in dem TMA festgelegt. Jeder Gewebespot erhält dabei eine eindeutig definierte Position, wobei Spots des gleichen Gewebetyps bevorzugterweise nebeneinander lokalisiert werden. Vor der Entnahme der Gewebestanze werden die Schnitte und Blöcke hinsichtlich ihrer Position im TMA sortiert. Die TMA-Blöcke, die am UKE hergestellt werden, haben grundsätzlich eine ähnliche Struktur (Abbildung 4). Sie sind in sechs Sektoren aufgeteilt, welche als A bis F definiert werden. Um eine Verwechslung zu vermeiden, werden die Sektoren asymmetrisch aufgebaut. Somit sind die Sektoren „A“ und „B“ größer als beispielsweise „C“ und „D“. Die Sektoren werden horizontal eingeteilt durch eine Nummerierung von „1“ bis „9“. Die vertikale Einteilung erfolgt durch die Vergabe von

Buchstaben von „a“ bis höchstens „r“. Der Buchstabe „j“ entfällt bei diesem System, um Verwechslungen mit dem Buchstaben „i“ zu vermeiden. In diesem Schema erhält jeder in dem TMA integrierte Gewebespot eine Bezeichnung von „A1a“ bis „F9e“.

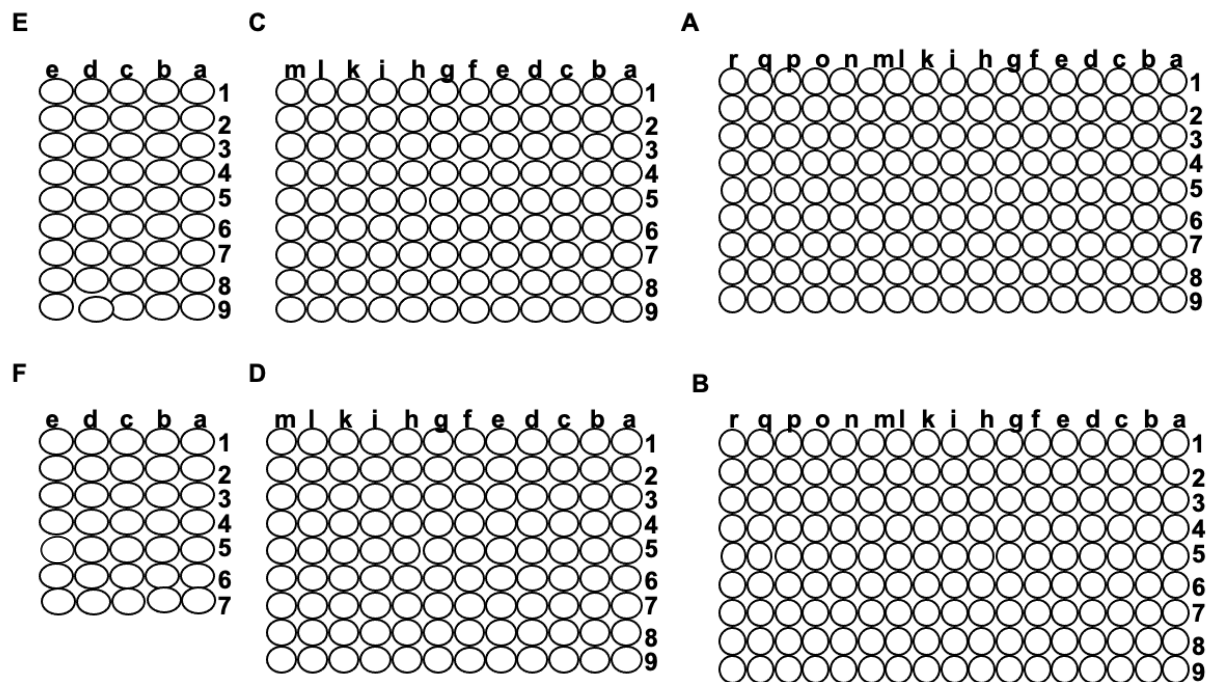


Abbildung 4: Beispielhafter Aufbau eines TMA am UKE. Die sechs asymmetrischen Sektoren sind mit A-F, die Spalten alphabetisch bis maximal zum Buchstaben r und die Zeilen numerisch gekennzeichnet.

2.1.4 Herstellung des TMA

Nach erfolgreicher Fallsektion und Planung wird der TMA mithilfe eines halbautomatischen Gewebearrayers (Abbildung 5C) hergestellt, welcher von Mitarbeitern des Instituts für Pathologie am UKE (Christian und Martina Mirlacher) entwickelt wurde. Der Gewebearray besteht aus einem Bohrer mit 0.6mm Durchmesser (Abbildung 5D), einer Hohlzylinder mit einem Innendurchmesser von 0.6mm (Abbildung 5E), einer Umschaltvorrichtung (Abbildung 5F), einem elektrischen Schrittmotor (Abbildung 5G) und einem Mehrfachblockhalter (Abbildung 5H).



Abbildung 5: Wichtige Komponenten der TMA-Herstellung. Dargestellt ist der Gewebeschnitt mit dem korrespondierenden Gewebeblock (A), Vorsortierung der Spenderblöcke (B), der Gewebearray (C), der Bohrer mit 0.6mm Durchmesser (D), die Hohlneedle mit 0.6mm Innendurchmesser (E), die Umschaltvorrichtung (F), der elektrische Schrittmotor (G), der Mehrfachblockhalter (H), ein fertiger TMA (I), Entnahme von Gewebe aus dem Spenderblock (J), Platzierung des Gewebezylinders im Empfängerblock (K), Voreinstellung der Koordinaten (L).

Grundsätzlich wird bei der TMA-Herstellung Gewebe aus einem Paraffinblock entnommen (Spenderblock) und in den TMA-Paraffinblock (Empfängerblock) übertragen. In einem TMA-Datenfile werden die Positionen gespeichert, in welche die Gewebezylinder übertragen werden sollen, sodass es als Orientierungshilfe während der TMA-Herstellung genutzt werden kann. Der Herstellungsprozess beginnt mit der Bohrung eines 0.6mm großen Loches im Empfängerblock an Position A1a. Anschließend wird die Umschaltvorrichtung betätigt, wodurch das Gerät vom Bohrer zur Hohlzylinder wechselt. Mit der Hohlzylinder wird aus dem zuvor selektierten Spenderblock ein 0.6mm großer Gewebezylinder entnommen (Abbildung 5J). Hierbei ist es entscheidend, dass die Hohlzylinder sich in dem Areal befindet, das zuvor im korrespondierenden HE-Schnitt von dem Pathologen mit einem Stift als Tumor markiert wurde. Anschließend wird die Hohlzylinder zur vorgebohrten Position des Empfängerblocks geführt und das entnommene Gewebe übertragen (Abbildung 5K). Über den elektrischen Schrittmotor wird der Bohrer zur nächsten Position A1b bewegt. Die Abstände der Bohrungen werden über zuvor eingestellte Koordinaten definiert (Abbildung 5L). Dieser Prozess wird so lange wiederholt, bis alle Bohrungen der 6 Sektoren durchgeführt und das jeweilige Gewebe übertragen wurde. Die Sektoren E und F enthalten Normalgewebe, die als Referenz dienen.

Da die Auswahl geeigneter Fälle und Blöcke sehr zeitaufwändig ist, besteht beim Gewebearray die Möglichkeit den Mehrfachblockhalter zu verwenden, wodurch bis zu 6 TMA-Blöcke gleichzeitig hergestellt werden können. Dabei befinden sich mehrere Empfängerblöcke im Mehrfachblockhalter, welche an identischer Position gebohrt werden können. Hierfür muss der Mehrfachblockhalter nur in seiner Position verschoben werden. Wenn mehrere TMA-Blöcke hergestellt werden sollen, muss der Abstand von entnommenen Gewebestücken im Spenderblock so klein wie möglich gewählt werden, um die Heterogenität des Gewebes zu minimieren und somit eine Vergleichbarkeit der TMA-Blöcke zu gewährleisten.

2.2 TMA-Blöcke der AGR2-Studie

Für die AGR2-Studie wurde ein TMA-Kollektiv verwendet, das Normalgewebe und Tumorgewebe beinhaltet. Der TMA des Normalgewebes besteht aus 8 Proben von 8 verschiedenen Patienten für jeden der 76 verschiedenen Normalgewebetypen (Tabelle 1) dieser Studie. Somit beinhaltet dieser Array 608 Gewebeslots.

Tabelle 1: Organe und Gewebetypen auf dem Normalgewebe-TMA. Von allen 76 Gewebetypen existieren acht Proben von acht unterschiedlichen Patienten.

Nr.	Organ/Gewebe	Nr.	Organ/Gewebe
1.	Aorta, Endothel	39.	Rektum, Mukosa
2.	Aorta, Media	40.	Gallenblase, Epithel
3.	Herz, Muskulatur	41.	Leber
4.	Quergestreifte Muskulatur	42.	Pankreas
5.	Zunge, Muskulatur	43.	Gl. parotis
6.	Uterus, Myometrium	44.	Gl. submandibularis
7.	Appendix, muskuläre Wand	45.	Gl. sublingualis
8.	Ösophagus, muskuläre Wand	46.	Knochenmark
9.	Magen, muskuläre Wand	47.	Duodenum, Brunnerdrüse
10.	Ileum, muskuläre Wand	48.	Nierenrinde
11.	Colon descendens, muskuläre Wand	49.	Nierenmark
12.	Nierenbecken, muskuläre Wand	50.	Prostata
13.	Harnblase, muskuläre Wand	51.	Gl. vesiculosa
14.	Penis, Corpus spongiosum	52.	Nebenhoden
15.	Ovar, Stroma	53.	Hoden
16.	Fettgewebe	54.	Bronchus, Mukosa
17.	Haut	55.	Bronchus, Drüsen
18.	Haut, Haarfollikel, Talgdrüse	56.	Sinus paranasales
19.	Lippe, Mundschleimhaut	57.	Lunge
20.	Mundhöhle	58.	Brust
21.	Tonsille, Oberflächenepithel	59.	Uterus, Endozervix
22.	Analkanal, Zona cutanea	60.	Uterus, Endometrium (Proliferation)
23.	Analkanal, Zona transitionalis	61.	Uterus, Endometrium (Sekretion)
24.	Uterus, Ektozervix	62.	Tuba uterina, Mukosa
25.	Ösophagus, Plattenepithel	63.	Uterus, Endometrium (Schwangerschaft)
26.	Nierenbecken, Urothel	64.	Ovar, Corpus luteum
27.	Harnblase, Urothel	65.	Ovar, folliculäre Zyste
28.	Plazenta, Amnion und Chorion	66.	Plazenta, früh
29.	Lymphknoten	67.	Plazenta, reif
30.	Milz	68.	Nebenniere
31.	Thymus	69.	Nebenschilddrüse
32.	Tonsille	70.	Schilddrüse

Tabelle 1 (Fortsetzung): Organe und Gewebetypen auf dem Normalgewebe-TMA. Von allen 76 Gewebetypen existieren acht Proben von acht unterschiedlichen Patienten.

33.	Magen, Antrum	71.	Cerebellum, Cortex (grau)
34.	Magen, Corpus	72.	Cerebellum, Cortex (grau und weiß)
35.	Duodenum, Mukosa	73.	Cerebrum (grau)
36.	Ileum, Mukosa	74.	Cerebrum (weiß)
37.	Appendix, Mukosa	75.	Hypophyse, Hinterlappen
38.	Colon descendes, Mukosa	76.	Hypophyse, Vorderlappen

Die Tumor-TMAs beinhalten insgesamt 14,966 Tumoren aus 134 verschiedenen Tumortypen und -subtypen. Die Anzahl der jeweiligen Tumorentitäten ist in Tabelle 2 dargestellt. Alle verwendeten Proben stammen aus den Archiven der Institute für Pathologie des UKE in Hamburg, des Klinikums Osnabrück und des Klinikums Fürth.

Tabelle 2: Tumorentitäten mit den jeweiligen Fallzahlen in dieser Studie.

Tumorgruppe	Tumorentität	Auf TMA (n)
<i>Hauttumoren</i>	Basalzellkarzinom	41
	Plattenepithelkarzinom der Haut	95
	Malignes Melanom	19
	Malignes Melanom mit Lymphknotenmetastasen	86
	Merkelzellkarzinom	2
<i>Kopf- und Halstumoren</i>	Plattenepithelkarzinom des Larynx	109
	Plattenepithelkarzinom, Pharynx	60
	Plattenepithelkarzinom, Mundboden	130
	Pleomorphes Adenom, Gl. Parotis	50
	Warthin Tumor, Gl. Parotis	49
	Basalzellenadenom, Speicheldrüse	15
<i>Tumoren der Lunge, Pleura und Thymus</i>	Adenokarzinom, Lunge	196
	Plattenepithelkarzinom, Lunge	80
	Mesotheliom, epitheloid	40
	Mesotheliom, biphasisch	29
	Thymom	29
	Neuroendokriner Tumor (NET), Lunge	29
<i>Tumoren des weiblichen Genitaltraktes</i>	Plattenepithelkarzinom, Vagina	30
	Plattenepithelkarzinom, Vulva	107
	Plattenepithelkarzinom, Cervix	88
	Adenokarzinom, Cervix	23
	Endometroides Karzinom, Endometrium	288
	Seröses Karzinom, Endometrium	36
	Karzinoid, Uterus	57
Endometriumkarzinom, high grade, G3	13	

Tabelle 2 (Fortsetzung): Tumorentitäten mit den jeweiligen Fallzahlen in dieser Studie.

Tumorgruppe	Tumorentität	Auf TMA (n)
	Klarzelliges Karzinom, Endometrium	9
	Ovarialkarzinom, endometroid	93
	Ovarialkarzinom, serös	530
	Ovarialkarzinom, muzinös	75
	Ovarialkarzinom, klarzellig	51
	Karzinoid, Ovar	47
	Granulosazelltumor, Ovar	44
	Leydig-Zelltumor, Ovar	4
	Sertoli-Zelltumor, Ovar	1
	Sertoli-Leydig-Zelltumor, Ovar	3
	Steroidzelltumor, Ovar	3
	Brenner Tumor	32
<i>Brusttumoren</i>	Invasives Mammakarzinom, kein spezieller Typ	499
	Lobuläres Mammakarzinom	150
	Medulläres Mammakarzinom	8
	Tubuläres Mammakarzinom	2
	Muzinöses Mammakarzinom	7
<i>Tumoren des Verdauungstraktes</i>	Polyp, adenomatös, low-grade Dysplasie	50
	Polyp, adenomatös, high-grade Dysplasie	50
	Adenokarzinom, Kolon	2483
	Adenokarzinom, Magen, diffuser Typ	215
	Adenokarzinom, Magen, intestinaler Typ	215
	Adenokarzinom, Magen, gemischter Typ	62
	Adenokarzinom, Ösophagus	83
	Plattenepithelkarzinom, Ösophagus	76
	Plattenepithelkarzinom, Analkanal	91
	Cholangiokarzinom	58
	Adenokarzinom, Gallenblase	51
	Klatskintumor, Gallenblase	42
	Hepatozelluläres Karzinom	312
	Duktales Adenokarzinom, Pankreas	659
	Ampulläres Adenokarzinom, Pankreas	98
	Azinuszellkarzinom, Pankreas	18
	Gastrointestinaler Stromatumor	62
	Neuroendokriner Tumor, Appendix	25
	Neuroendokriner Tumor, Kolorektum	12
	Neuroendokriner Tumor, Ileum	53
	Neuroendokriner Tumor, Pankreas	101
	Neuroendokrines Karzinom, Kolorektum	14
Neuroendokrines Karzinom, Ileum	8	
Neuroendokrines Karzinom, Gallenblase	4	

Tabelle 2 (Fortsetzung): Tumorentitäten mit den jeweiligen Fallzahlen in dieser Studie.

Tumorgruppe	Tumorentität	Auf TMA (n)
<i>Tumoren des Harntraktes</i>	Neuroendokrines Karzinom, Pankreas	14
	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2, low grade	87
	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2, high grade	80
	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G3	126
	Urothelkarzinom, pT2-4 G3	735
	Plattenepithelkarzinom, Harnblase	22
	Neuroendokrines Karzinom, kleinzellig, Harnblase	5
	Urothelkarzinom, sarkomatoid	25
	Urothelkarzinom, Nierenbecken	62
	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	1287
	Papilläres Nierenzellkarzinom	368
	Klarzelliges Nierenzellkarzinom, papillär	26
	Chromophobes Nierenzellkarzinom	170
	Onkozytom, Niere	257
<i>Tumoren des männlichen Genitaltraktes</i>	Adenokarzinom, Prostata, Gleason 3+3	83
	Adenokarzinom, Prostata, Gleason 4+4	80
	Adenokarzinom, Prostata, Gleason 5+5	85
	Adenokarzinom, Prostata, Rezidiv	258
	Neuroendokrines Karzinom, kleinzellig, Prostata	2
	Seminom	682
	Embryonales Karzinom, Hoden	54
	Leydig-Zelltumor, Hoden	31
	Sertoli-Zelltumor, Hoden	2
	Sex-cord-Stromatumor, Hoden	1
	Spermatozystischer Tumor, Hoden	1
	Dottersacktumor	53
	Teratom	53
	Plattenepithelkarzinom, Penis	92
<i>Tumoren des endokrinen Systems</i>	Adenom, Schilddrüse	63
	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	341
	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	109
	Medulläres Schilddrüsenkarzinom	57
	Adenom, Nebenschilddrüse	43
	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	19
	Nebennierenrindenadenom	48
	Nebennierenrindenkarzinom	27
<i>Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes</i>	Phäochromozytom	51
	Hodgkin-Lymphom	103
	Kleines lymphatisches Lymphom, B-Zell Typ (B-SLL/B-CLL)	50
	Diffuses großes B-Zell Lymphom (DLBCL)	113
	Follikuläres Lymphom	88

Tabelle 2 (Fortsetzung): Tumorentitäten mit den jeweiligen Fallzahlen in dieser Studie.

Tumorgruppe	Tumorentität	Auf TMA (n)
<i>Tumoren des Weichgewebes und Knochen</i>	T-Zell Non-Hodgkin Lymphom	25
	Mantelzell Lymphom	18
	Marginalzonen Lymphom	16
	Diffuses großes B-Zell Lymphom (DLBLC), Hoden	16
	Burkitt Lymphom	5
	Granularzelltumor	23
	Leiomyom	50
	Leiomyosarkom	94
	Liposarkom	96
	Maligner Nervenscheidentumor (MPNST)	15
	Myofibrosarkom	26
	Angiosarkom	42
	Angiomyolipom	91
	Dermatofibrosarkom protuberans	21
	Ganglioneurom	14
	Kaposi Sarkom	8
	Neurofibrom	117
	Sarkom, nicht spezifiziert (NOS)	74
	Paragangliom	41
	Ewing Sarkom	23
	Rhabdomyosarkom	7
	Schwannom	122
	Synovialsarkom	12
	Osteosarkom	19
	Chondrosarkom	15
	Rhabdoidtumor	5
	Solitärer fibröser Tumor	17

2.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) ist in der Pathologie eine weitverbreitete Technik zur Detektion eines bestimmten Proteins in einer Zelle oder einem Gewebe, welche über eine Antigen-Antikörper-Reaktion vermittelt wird (Schacht and Kern, 2015). Dies erfolgt durch die Bindung eines spezifischen Antikörpers an das Zielprotein. Durch die visuelle Darstellung bestimmter Proteine unter dem Mikroskop revolutionierte die IHC die pathologische Diagnostik (Hussaini et al., 2023).

Zusätzlich zur visuellen Bestätigung der Protein-Expression, ist auch die Lokalisation des Proteins erkennbar. Somit sind sie auffindbar im Zytoplasma, im Zellkern, an der Zellmembran, oder extrazellulär (Sukswai and Khoury, 2019). Die Technik wird besonders

an Gewebe angewendet, das in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet ist, wodurch es eine gute Lagerfähigkeit erhält (Obi et al., 2023).

Die bei der IHC verwendeten Antikörper sind monoklonal oder polyklonal und stammen beispielsweise von Ratten, Mäusen und Kaninchen. Monoklonale Antikörper können nur an ein bestimmtes Epitop binden, während die polyklonalen Antikörper ein Gemisch von Antikörpern darstellen, wobei immer multiple Epitope eines Proteins gebunden werden. Die Herstellung polyklonaler Antikörper erfolgt über die Injektion eines Antigens in ein Tier, welches im Laufe der Immunreaktion Antikörper gegen das Antigen produziert (Janardhan et al., 2018). Bei der Herstellung monoklonaler Antikörper wird ebenfalls ein Antigen einem Tier, meistens einer Maus, injiziert und nach der Immunreaktion die B-Zellen der Milz entnommen. Da die B-Zellen nur eine begrenzte Überlebenszeit haben, werden diese mit den Myelomzellen der Maus fusioniert. Anschließend werden die entstandenen Hybridome nach der gewünschten Spezifität selektiert. Somit entsteht ein Hybridom, das monoklonale Antikörper gegen ein bestimmtes Epitop eines Proteins produzieren kann. Polyklonale Antikörper haben eine höhere Bindungsaffinität und ein breiteres Reaktionsspektrum, allerdings sind sie hinsichtlich ihrer spezifischen Bindung an ein bestimmtes Antigen den monoklonalen Antikörpern unterlegen. Monoklonale Antikörper haben somit ein geringeres Risiko für eine Kreuzreaktivität mit anderen Antigenen (Ramos-Vara, 2005, Magaki et al., 2019).

In der IHC wird zwischen der direkten und der indirekten Nachweismethode unterschieden. Bei der direkten Nachweismethode wird nur ein Antikörper verwendet, welcher bereits mit einem Färbesystem konjugiert ist. Diese Methode ermöglicht den schnellen Nachweis eines Proteins. Das Signal ist jedoch schwach, so dass höhere Antikörperkonzentrationen erforderlich sind (Chen et al., 2010). Bei der indirekten Nachweismethode (Abbildung 6) wird ein Primär- und ein Sekundärantikörper verwendet. Der Primärantikörper bindet an das Epitop des Antigens, ist allerdings nicht mit einem Färbesystem konjugiert. Der Sekundärantikörper bindet wiederum an den Primärantikörper und ist mit einem Enzym konjugiert, das die Bindung über eine Farbreaktion bestätigt. Der Sekundärantikörper verstärkt das Signal, wodurch geringere Konzentrationen des Primärantikörpers verwendet werden können (Chi and Chandy, 2007). Ein gängiges System für die indirekte Nachweismethode ist die Nutzung von HRP (Horse Radish Peroxidase) und DAB (3,3Diaminobenzidin). Dabei wird ein Polymer, welches zahlreiche HRP-Enzyme enthält, mit dem Sekundärantikörper konjugiert. Nach der Zugabe von DAB wird eine Farbreaktion katalysiert, die den Antigen-Antikörper-Komplex über ein braunes Farbprodukt visualisiert (Lilyquist et al., 2017). Die Reduzierung unspezifischer Hintergrundfärbungen ist als enormer Vorteil der indirekten Nachweismethode zu bewerten (Chi and Chandy, 2007).

Aufgrund der höheren Sensitivität ist die indirekte Nachweismethode der direkten Nachweismethode überlegen (Im et al., 2019).

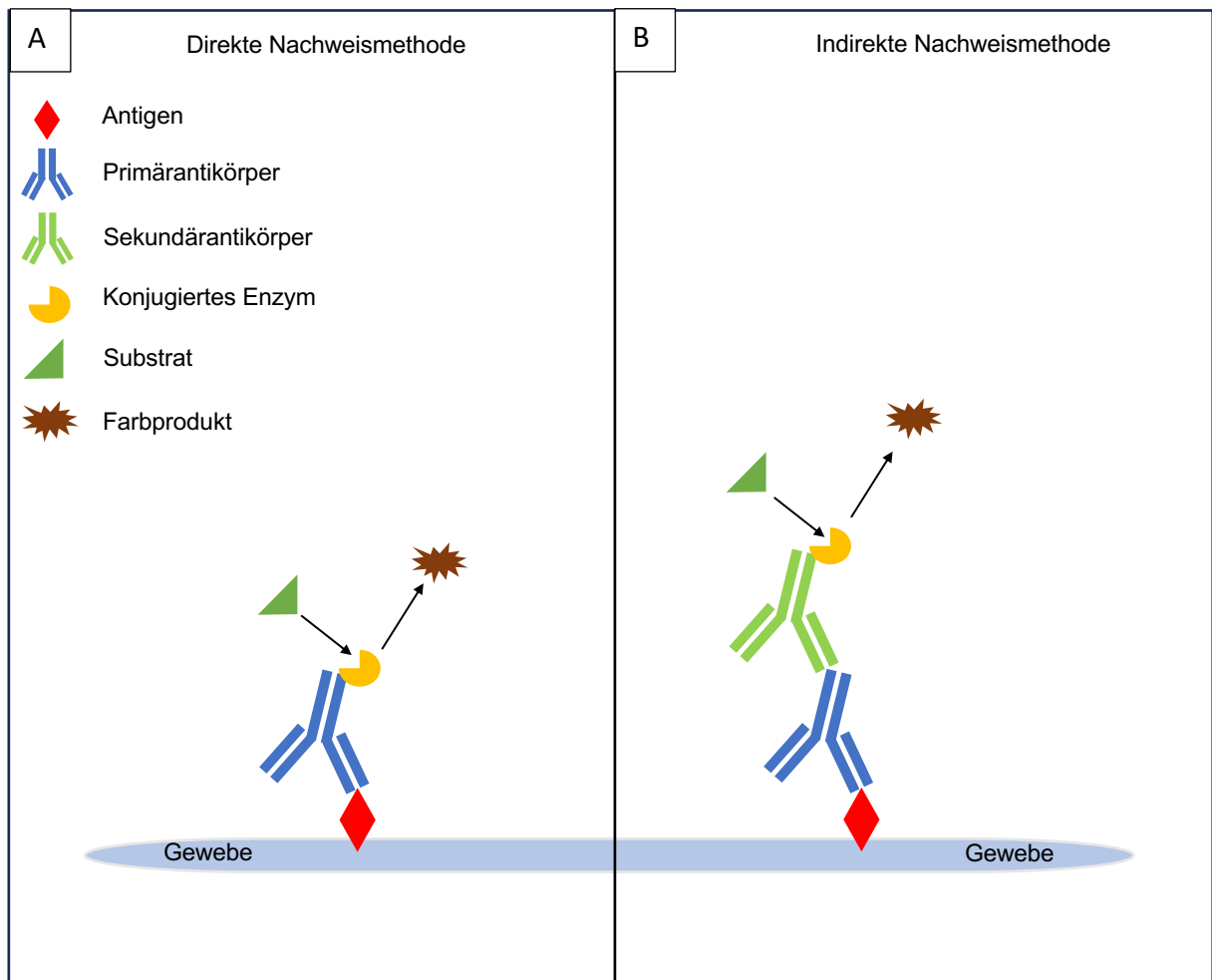


Abbildung 6: Vereinfachte Abbildung der direkten (A) und indirekten Nachweismethode (B). Eigene Erstellung auf Basis der Doktorandenseminare.

2.4 Immunhistochemischer Färbeablauf unserer Studie

Die immunhistochemische Färbung von Präparaten am UKE erfolgt nach einem strikten Protokoll (Tabelle 3). Der Färbeablauf selbst wird für alle Schnitte einer Studie am selben Tag unter identischen Bedingungen durchgeführt. Dadurch wird eine hohe Standardisierung der Färbeargebnisse unserer Studien gewährleistet. Die TMA-Schnitte werden vom TMA-Block mittels eines Mikrotoms hergestellt und haben eine Dicke von 2,5 µm. Die Schnitte werden anschließend auf Objektträger platziert und bei einer Temperatur von 60°C über Nacht vorbehandelt. Durch diesen Vorgang kann bereits ein Großteil des Paraffins von den Schnitten abfließen. Am nächsten Tag beginnt der eigentliche Färbeablauf. Da die Schnitte in Paraffin eingebettet und mit Formalin fixiert sind, bedarf es weiterer Schritte, damit der Antikörper an das Zielprotein binden kann. Zur Entparaffinierung werden die Schnitte zunächst 3-mal 5 Minuten mit Xylol behandelt und anschließend über eine absteigende

Alkoholreihe bis Aqua destillata (A. dest.) rehydriert. Dabei sollen die Schnitte in die jeweilige Flüssigkeit kurz eingetaucht und 10-mal geschwenkt werden. Durch die Formalinfixierung entstehen Aldehydvernetzungen, die das Epitop des Zielproteins maskieren. Damit die Epitope demaskiert werden, müssen die TMA-Schnitte mit einem Tris-EDTA-Citrat-Puffer (TEC-Puffer, pH7,8, hergestellt von Mitarbeitern des Instituts für Pathologie am UKE) vorbehandelt und im Autoklav bei 121°C für 5 Minuten inkubiert werden. Im Anschluss wird der TEC-Puffer von den Schnitten entfernt. Dies erfolgt durch das Spülen mit A. dest. (2-mal) und einem TBST-Puffer (1-mal 5 Minuten). Trotz der Formalinfixierung und der Einbettung in Paraffin sind im Gewebe noch endogene Enzymaktivitäten vorhanden. Da diese Enzymaktivitäten im weiteren Verlauf zu einer Hintergrundfärbung führen und den enzymatischen Nachweis der Antikörper-Antigen-Bindung stören können, werden die TMA-Schnitte mit einer H₂O₂-haltigen Peroxidase Blocking Solution (DAKO) für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer ausgelegt. Die Reagenzien werden daraufhin erneut mit dem TBST-Puffer 2-mal für jeweils 5 Minuten abgespült. Nach Abschluss der Vorbehandlung der TMA-Schnitte kann nun die Behandlung mit den Antikörpern erfolgen. In unserer Studie wird die Methode des indirekten Nachweises eines Proteins genutzt. Hierfür wird der AGR2-spezifische Primärantikörper (HMV325, Verdünnung 1:150, rekombinanter Antikörper, Kaninchen) auf den Objektträgern aufgetragen und bei 37°C für 60 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Schnitte 3-mal für 5 Minuten mit dem TBST-Puffer gespült worden sind, kann die Applikation des Sekundärantikörpers erfolgen. Dafür wird das EnVision Kit (#K5007, DAKO) verwendet. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C für 30 Minuten. Die TMA-Schnitte werden erneut 3-mal für jeweils 5 Minuten mit dem TBST-Puffer behandelt, um überschüssige Reagenzien abzuspülen. Das verwendete Chromogen löst über eine enzymatische Umsetzung eine Farbreaktion aus, wodurch die Antigen-Antikörper-Reaktion visualisiert wird. Das 3,3-Diaminobenzidin-Chromogen (DAB-Chromogen) des EnVision Kits wird mit dem ebenso enthaltenen Substratpuffer auf 1:50 verdünnt, auf den Schnitten appliziert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das DAB-Chromogen erzeugt ein braunes Farbprodukt als Nachweis der Proteinexpression in dem Gewebe. Anschließend werden die TMA-Schnitte mit A. dest. gespült. Zuletzt werden die Objektträger für 15 Sekunden mit Hämalaun behandelt und zur Bläuung für 15 Sekunden mit Leitungswasser gespült. Zum Schutz der fertigen TMA-Schnitte erfolgt die Eindeckung mit einer Folie über den Folieneindecker (Sakura). Der immunhistochemische Ablauf wurde im Rahmen der Seminare für Doktoranden des Instituts für Pathologie am UKE erlernt.

Tabelle 3: Immunhistochemisches Färbeprotokoll der TMA-Schnitte am UKE.

Ziel	Schritte und Materialien	Zeit und Temperatur
1. <i>Vorbereitung der Objekträger</i>	Mittels eines Mikrotoms werden vom TMA-Block 2.5 µm dicke Schnitte angefertigt	
2. <i>Entparaffinierung</i>	Schnitte im Brutschrank „backen“ Behandlung mit Xylol Anschließende Rehydrierung über eine absteigende Alkoholreihe bis A. dest.	60°C, über Nacht 3x5min Jeweils kurz eintauchen und 10x schwenken
3. <i>Antigen retrieval</i>	Inkubation im Autoklav mit Tris-EDTA-Citrat-Puffer bei pH7.8 (TEC-Puffer) Spülung mit A. dest. Spülung mit TBST-Puffer	5min bei 121°C 2x 1x5min
4. <i>Peroxidaseblock</i>	Schnitte werden in eine feuchte Kammer gelegt und mit einer Peroxidase Blocking Solution (DAKO) behandelt Spülung mit TBST-Puffer	10min bei Raumtemperatur 2x5min
5. <i>Inkubation Primärantikörper</i>	Primärantikörper verdünnen und Inkubation im Brutschrank HMV325, Verdünnung 1:150 Spülung mit TBST-Puffer	60min bei 37°C 3x5min
6. <i>Inkubation Sekundärantikörper</i>	DAKO EnVision Kit (#K5007) Inkubation im Brutschrank Spülung mit TBST-Puffer	30min bei 37°C 3x5min
7. <i>Chromogen</i>	DAB-Chromogen (DAKO EnVision Kit) wird verdünnt mit Substratpuffer zu 1:50 Spülung mit A.dest.	10min bei Raumtemperatur 1x
8. <i>Gegenfärbung</i>	Gegenfärbung mittels Hämalaun und Bläuen mit Leitungswasser	15s 15s
9. <i>Einbettung</i>	Dehydration über eine aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol Eindeckung der Schnitte über den Folieneindecker (Sakura)	Jeweils kurz eintauchen und 10x schwenken

2.5 Auswertung

Alle Gewebespots wurden von einem Pathologen des UKE ausgewertet. Das Normalgewebe wird semiquantitativ beurteilt und in die Kategorien „negativ“, „schwach“, „moderat“ und „stark“ eingeteilt. Das Tumorgewebe wird nach der Färbeintensität (0, 1+, 2+, 3+) und dem prozentuellen Anteil gefärbter Tumorzellen, verglichen mit allen Tumorzellen auf dem Gewebespot, eingeteilt. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse und der statistischen Analyse wird die Bewertung jedes Tumorspots einer von vier Kategorien zugeordnet. Tumorspots, auf denen keine Färbung zu erkennen ist, werden als „negativ“

(0) bezeichnet. In die Kategorie „schwach positiv“ werden Tumorspots eingeteilt, die in $\leq 70\%$ aller Tumorzellen eine Färbeintensität 1+ oder in $\leq 30\%$ aller Tumorzellen eine Färbeintensität 2+ aufweisen. Als „moderat positiv“ werden Fälle eingeordnet, die in $> 70\%$ der Tumorzellen eine Färbeintensität von 1+ oder in $> 30\%$, jedoch $\leq 70\%$ der Tumorzellen die Färbeintensität 2+ aufweisen sowie diejenigen Spots, die bei einer Färbeintensität von 3+ eine prozentuelle Färbung von $\leq 30\%$ zeigen. Zu der Kategorie „stark positiv“ zählen Gewebesspots mit einer Färbeintensität von 2+ bei $>70\%$ der gefärbten Tumorzellen und Spots, die eine Färbeintensität von 3+ bei $>30\%$ der Tumorzellen aufweisen. Die Einteilung der Kategorien ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Einteilung der Bewertung des Tumorgewebes in die vier Kategorien „negativ“, „schwach positiv“, „moderat positiv“, „stark positiv“.

Kategorie	Färbeintensität	Anteil gefärbte Tumorzellen
<i>Negativ</i>	0	
<i>Schwach positiv</i>	1+	$\leq 70\%$
	2+	$\leq 30\%$
<i>Moderat positiv</i>	1+	$> 70\%$
	2+	$> 30\%, \leq 70\%$
	3+	$\leq 30\%$
<i>Stark positiv</i>	2+	$>70\%$
	3+	$>30\%$

2.6 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit der JMP 14 Software (SAS Institute Inc., NC, USA) durchgeführt. Um Zusammenhänge zwischen der AGR2-Expression und Tumortyp sowie molekularen Parametern zu identifizieren, wurden Kontingenztabellen angefertigt und der χ^2 -Test durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Technische Aspekte

In unserer Studie wurden insgesamt 14,966 Tumorproben untersucht, wobei 12,434 (83.1%) Proben in der TMA-Analyse interpretiert werden konnten. Die Tumorspots, die nicht interpretiert werden konnten, wiesen entweder keine eindeutigen Tumorzellen auf oder die Gewebesspots fehlten. Eine ausreichende Anzahl an Normalgewebeproben (≥ 4) von jedem Normalgewebetyp konnte evaluiert werden.

3.2 AGR2-Immunfärbung des Normalgewebes

Eine starke und überwiegend zytoplasmatische AGR2-Immunfärbung ist in vielen verschiedenen epithelialen Zelltypen aufgetreten, wie zum Beispiel im Kolorektum, Magen (außer Parietalzellen), Gallenblase, Pankreas (Schaltstücke und Ausführungsgänge), Samenbläschen, Urothel, respiratorisches Epithel, Lunge (Anteil der Pneumozyten), Brust (Anteil der luminalen Zellen), Endozervix, Endometrium und Eileiter. Eine etwas schwächere AGR2-Immunfärbung wurde erzielt in den Drüsenzellen (insbesondere muköse) und Epithelzellen der Ausführungsgänge von Speicheldrüsen, Brunnerdrüsen des Duodenums, kleinen Anteilen der Tubuli und Sammelrohren der Niere sowie in Anteilen der epithelialen Zellen von Nebenhoden und Adenohypophyse. Die AGR2-Immunfärbung variierte von negativ bis zu einer starken Intensität in den Azinuszellen des Pankreas sowie in den Azinus- und Basalzellen der Prostata. Eine AGR2-Färbung fehlte meist im Plattenepithel (außer Tonsille), in Zellen der Hassall-Körperchen vom Thymus und der Huxley-Schicht in Haarfollikeln der Haut. In Schilddrüsengewebe kam es ebenfalls selten zu einer Anfärbung von AGR2; nur gelegentlich konnte eine schwache bis moderate Immunfärbung identifiziert werden. Eine AGR2-Immunfärbung war nie nachweisbar in Hepatozyten, Hoden, Ovar, Plazenta, Nebenniere, Nebenschilddrüse, Gehirn, mesenchyalem Gewebe und hematolymphatischen Zellen. Repräsentative Bilder sind in den Abbildungen 7-14 dargestellt.

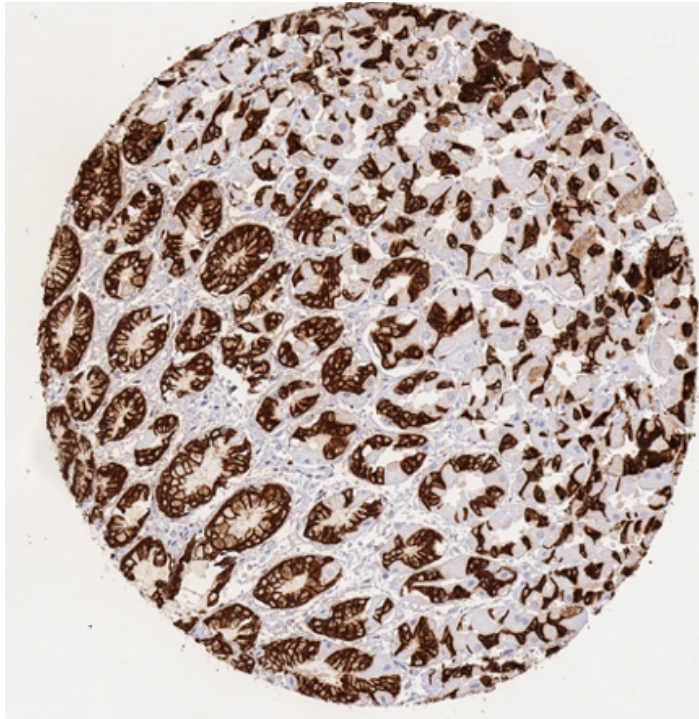


Abbildung 7: Kräftige, zytoplasmatische AGR2-Immunfärbung aller epithelialen Zellen (außer Parietalzellen) des Magens.

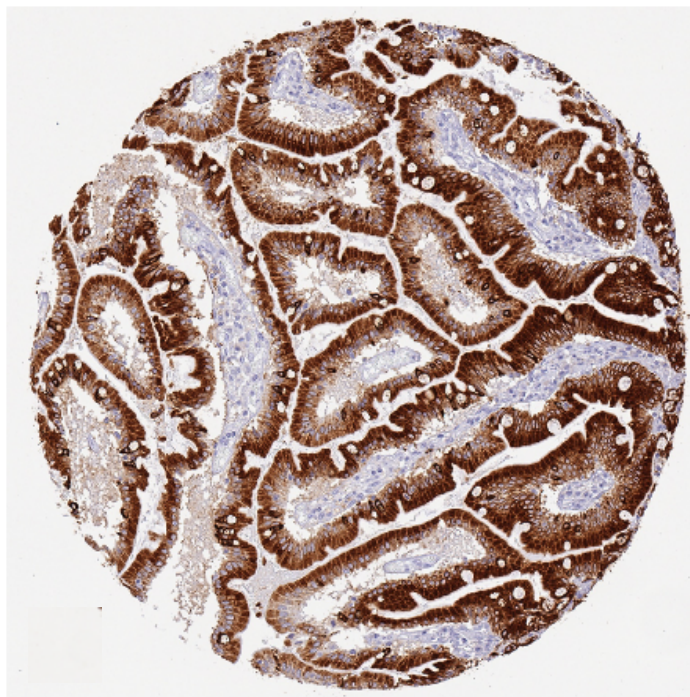


Abbildung 8: Kräftige, diffuse AGR2-Immunfärbung aller epithelialen Zellen des Duodenums.

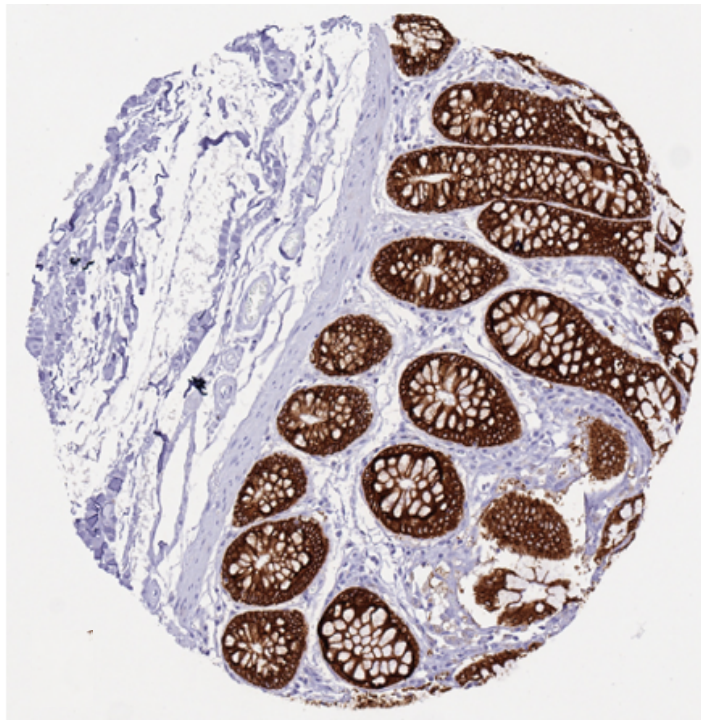


Abbildung 9: Kräftige AGR2-Positivität der epithelialen Zellen des Colons.

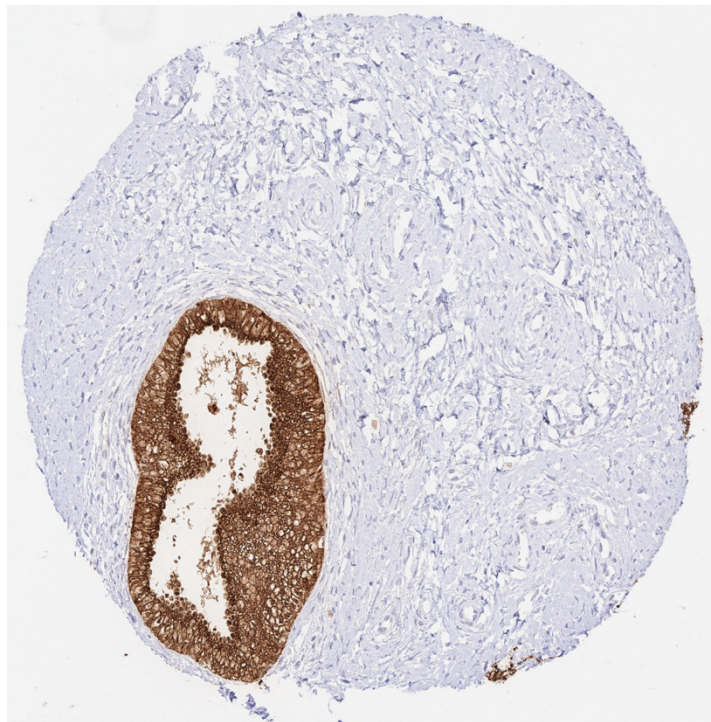


Abbildung 10: Kräftige, zytoplasmatische AGR2-Färbung aller epithelialen Zellen der Endozervix.

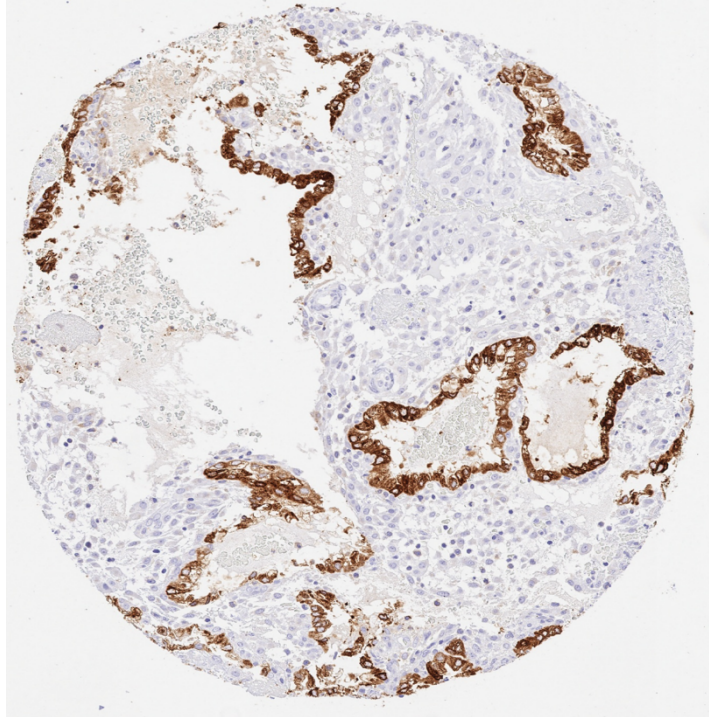


Abbildung 11: Diffuse, kräftige AGR2-Immunfärbung der Endometriumdrüsen im Uterus während einer Schwangerschaft.

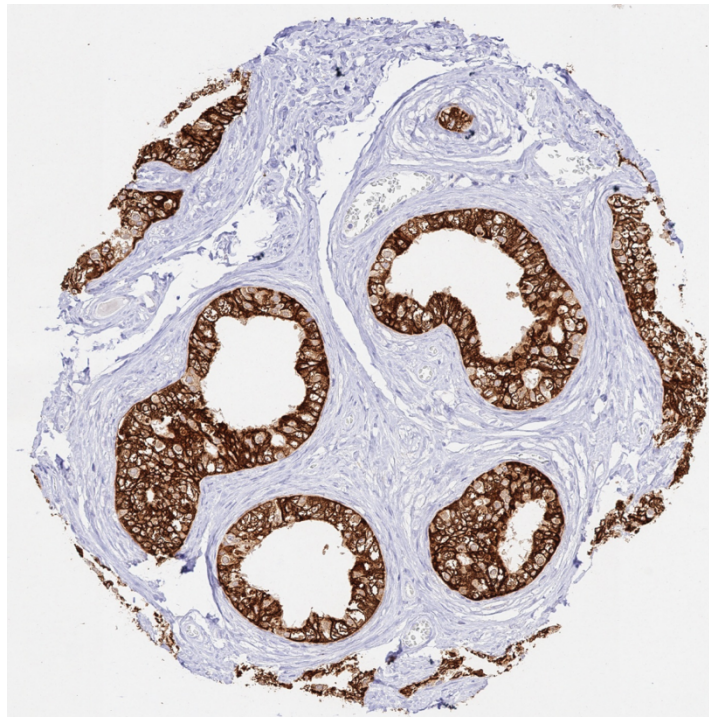


Abbildung 12: Kräftige AGR2-Färbung aller epithelialen Zellen des Nebenhodens.

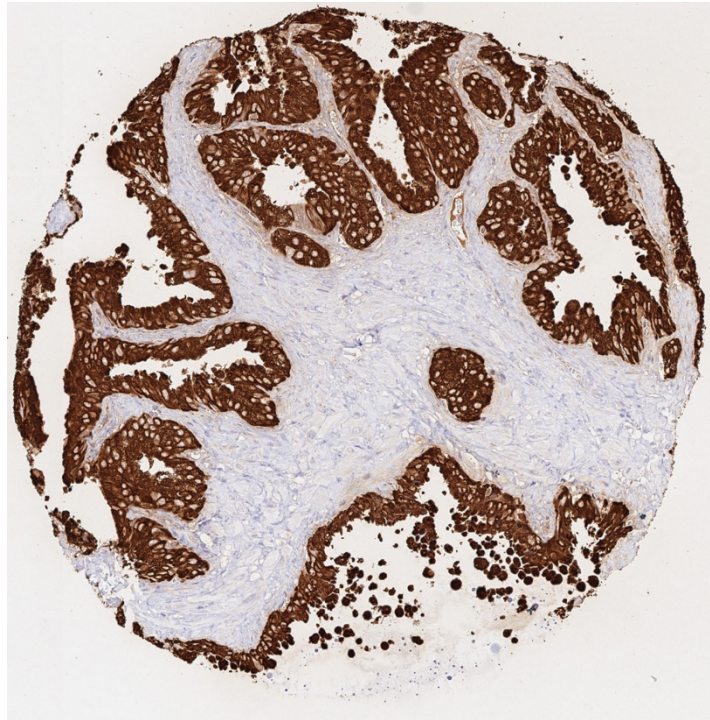


Abbildung 13: Kräftige AGR2-Positivität aller epithelialen Zellen der Samenblase.

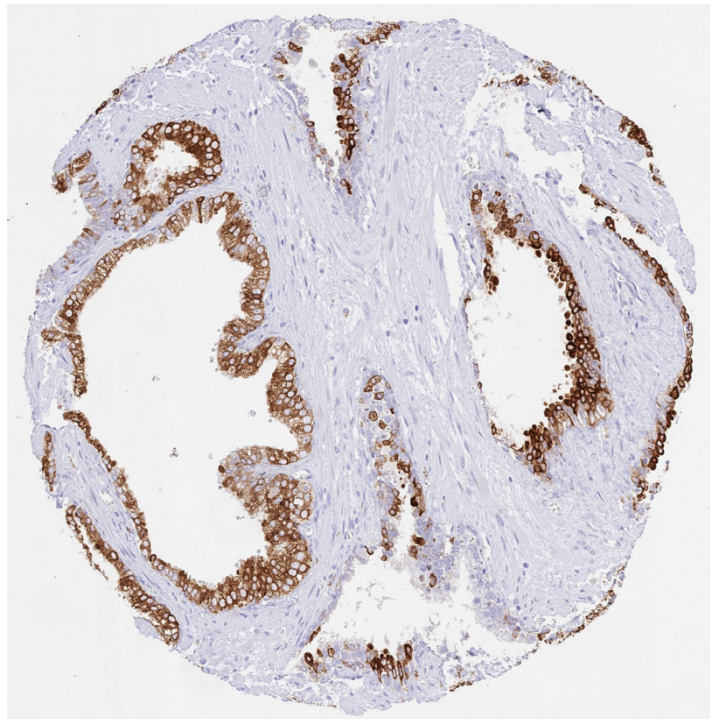


Abbildung 14: Kräftige, zytoplasmatische AGR2-Immunfärbung der meisten epithelialen Zellen der Prostata.

Die Ergebnisse aller Zelltypen, die mit dem AGR2-spezifischen Antikörper HMV325 immunhistochemisch als positiv klassifiziert wurden, konnten durch den Vergleich mit einem zweiten Antikörper, EPR3278, bestätigt werden (Abbildungen 15-30). Die Gewebeslots zeigen eine Übereinstimmung der immunhistochemischen Färbung des Gewebes und beweisen somit die Spezifität unseres Studienantikörpers für AGR2 (Antikörper-Kreuzvalidierung). Das Risiko für potenziell falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse wird dadurch minimiert. Die verglichenen Gewebeslots stammen aus aufeinanderfolgenden Schnitten des Normalgewebe-TMAs.

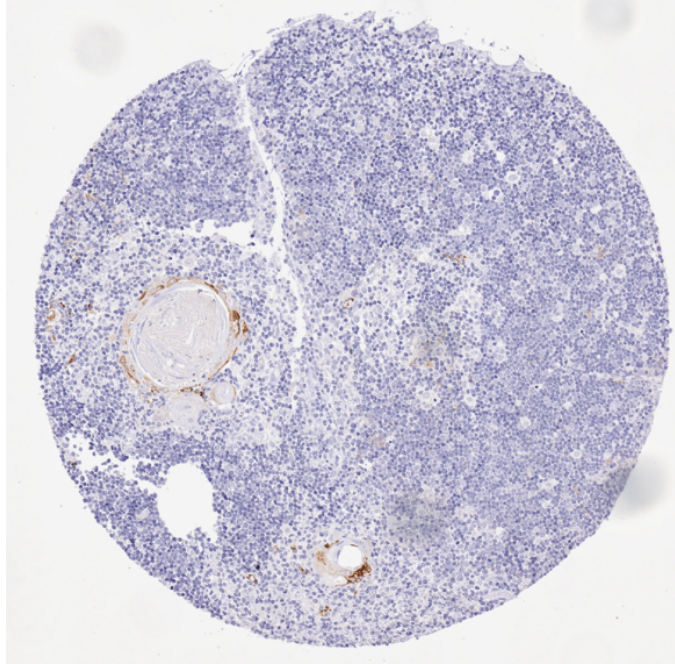


Abbildung 15: Immunfärbung von einem Teil der Plattenepithelzellen des Hassall-Körperchens des Thymus (HMV325)

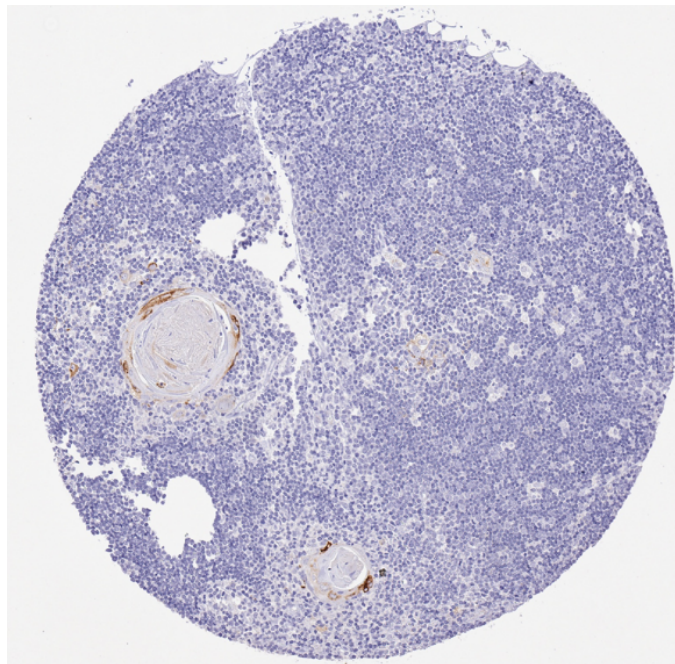


Abbildung 16: Immunfärbung von einem Teil der Plattenepithelzellen des Hassall-Körperchens des Thymus (EPR3278)

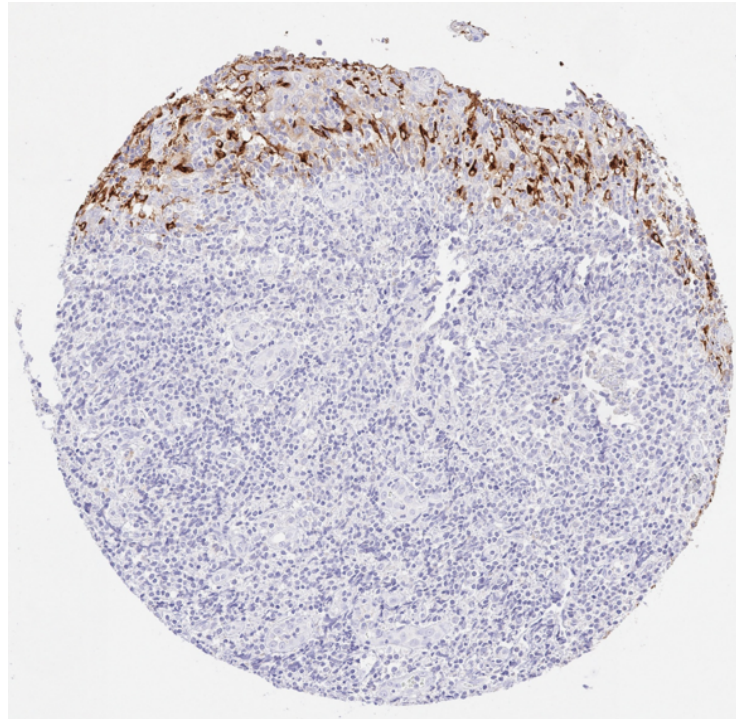


Abbildung 17: Immunfärbung von einem Teil der Plattenepithelzellen der Tonsille (HMV325)

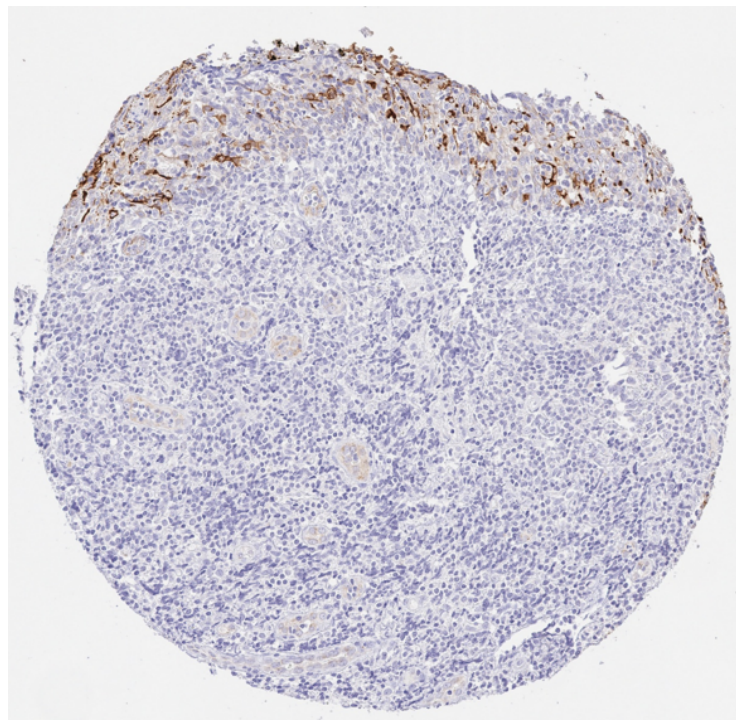


Abbildung 18: Immunfärbung von einem Teil der Plattenepithelzellen der Tonsille (EPR3278)

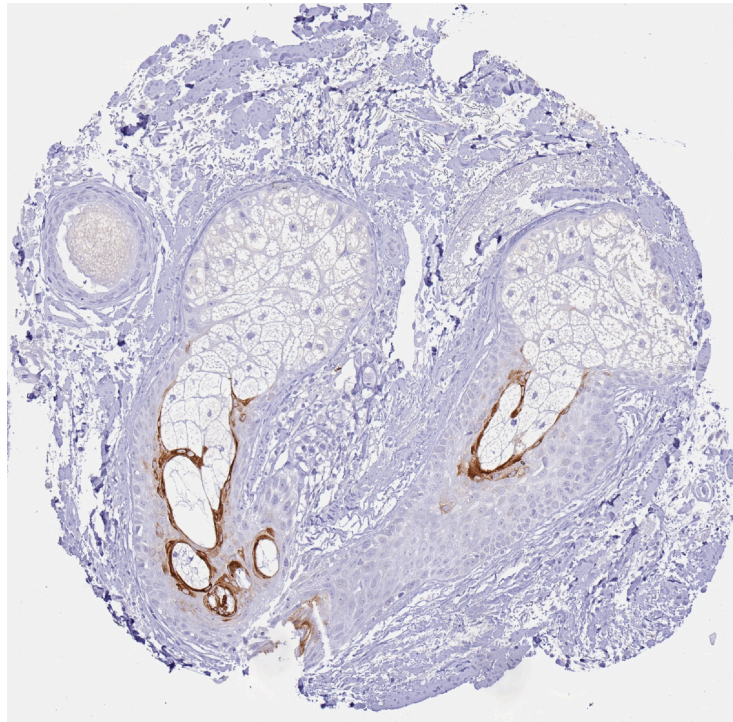


Abbildung 19: Immunfärbung der Huxley-Schicht von Haarfollikeln (HMV325)

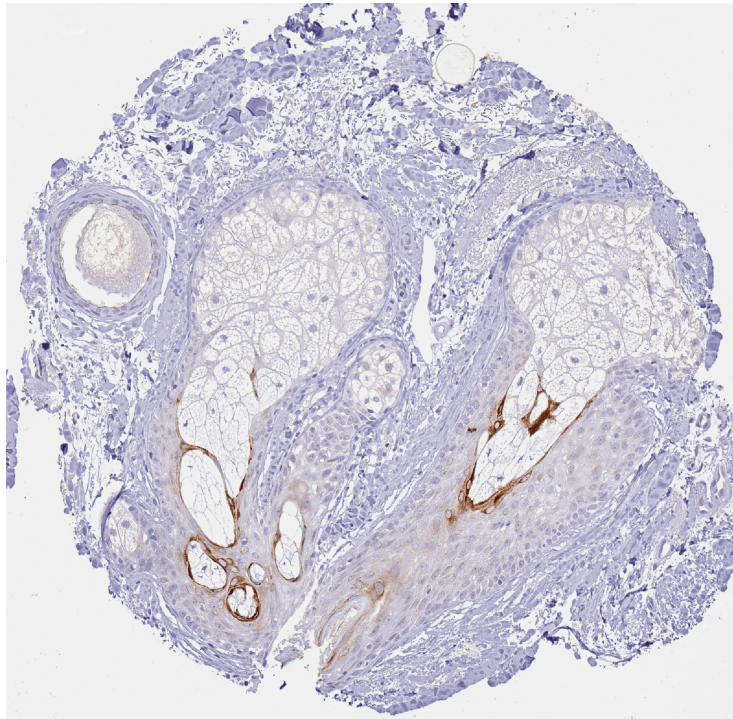


Abbildung 20: Immunfärbung der Huxley-Schicht von Haarfollikeln (EPR3278)

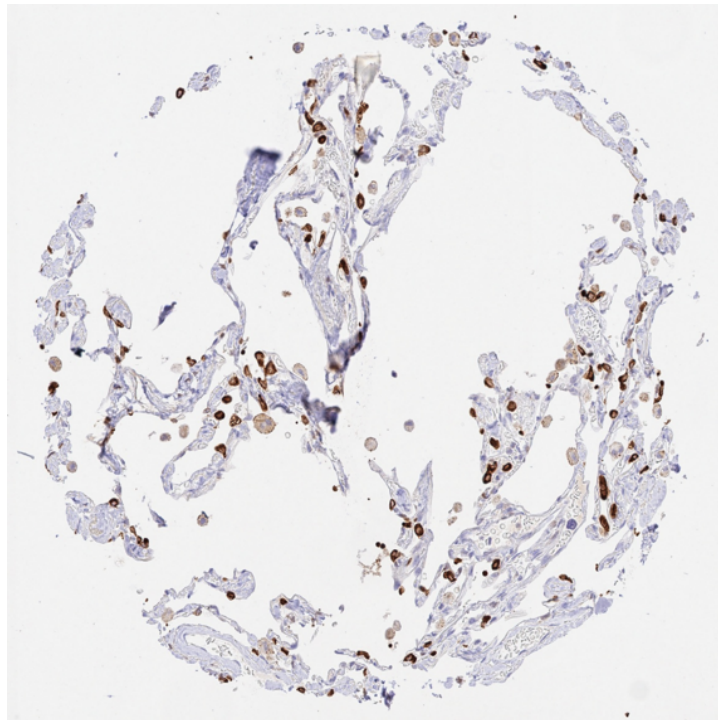


Abbildung 21: Immunfärbung von einem Teil der Pneumozyten der Lunge (HMV325)

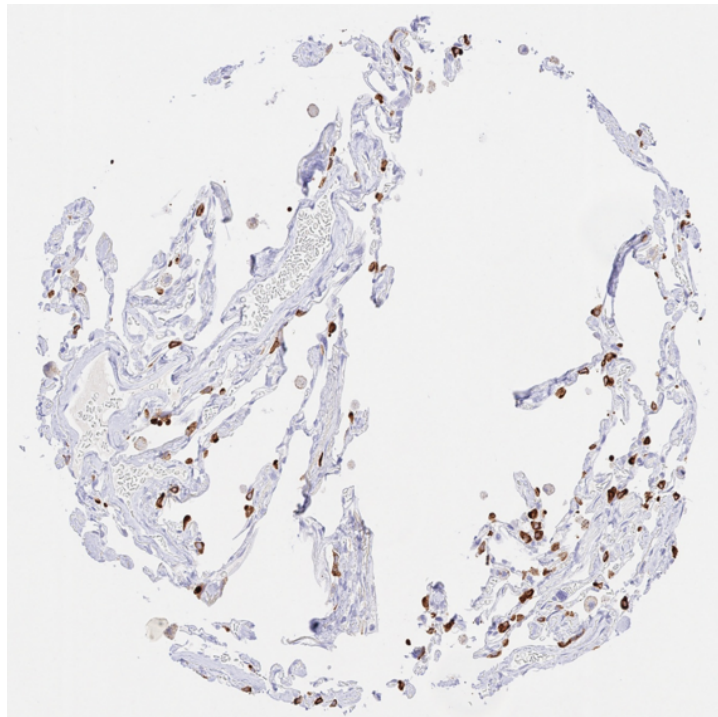


Abbildung 22: Immunfärbung von einem Teil der Pneumozyten der Lunge (EPR3278)

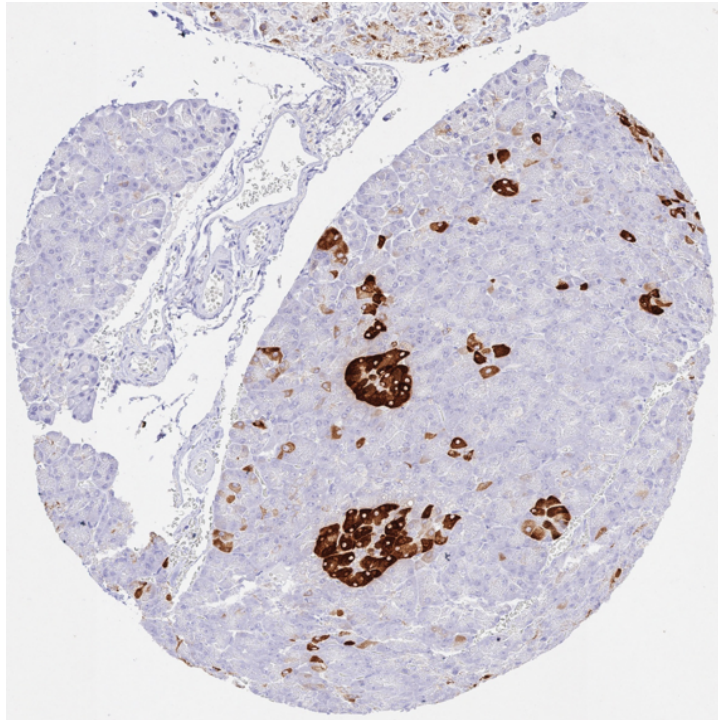


Abbildung 23: Immunfärbung der Schaltstücke und Azinuszellen des Pankreas (HMV325)

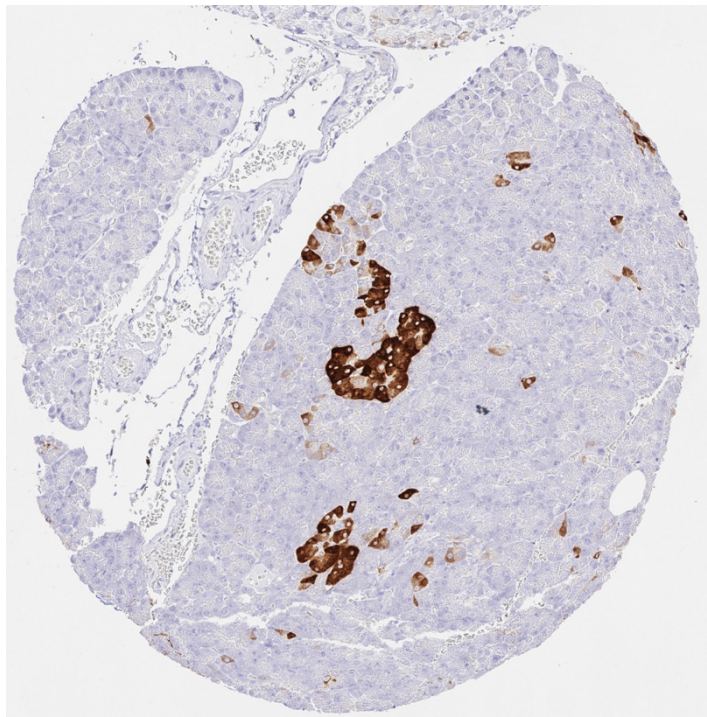


Abbildung 24: Immunfärbung der Schaltstücke und Azinuszellen des Pankreas (EPR3278)

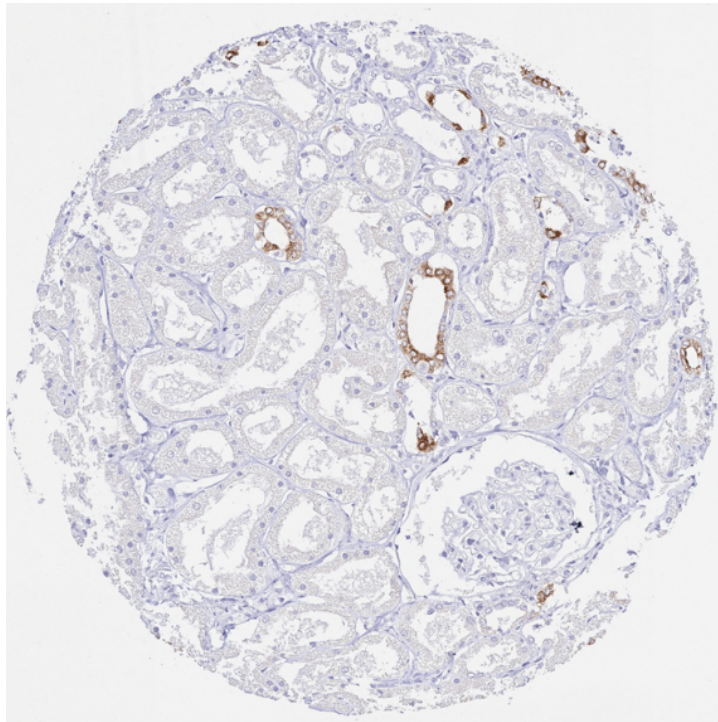


Abbildung 25: Immunfärbung von einem Teil der Tubuli und Sammelrohre der Niere (HMV325)

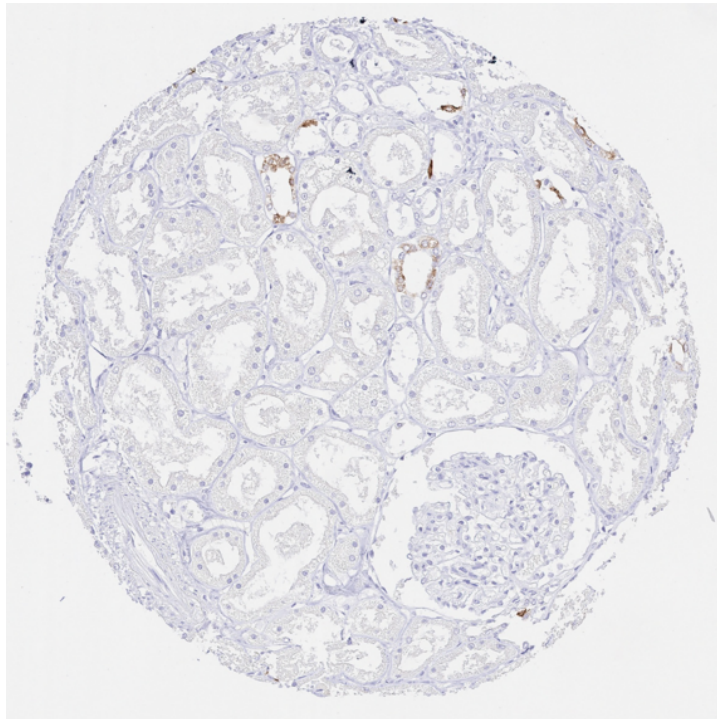


Abbildung 26: Immunfärbung von einem Teil der Tubuli und Sammelrohre der Niere (EPR3278)

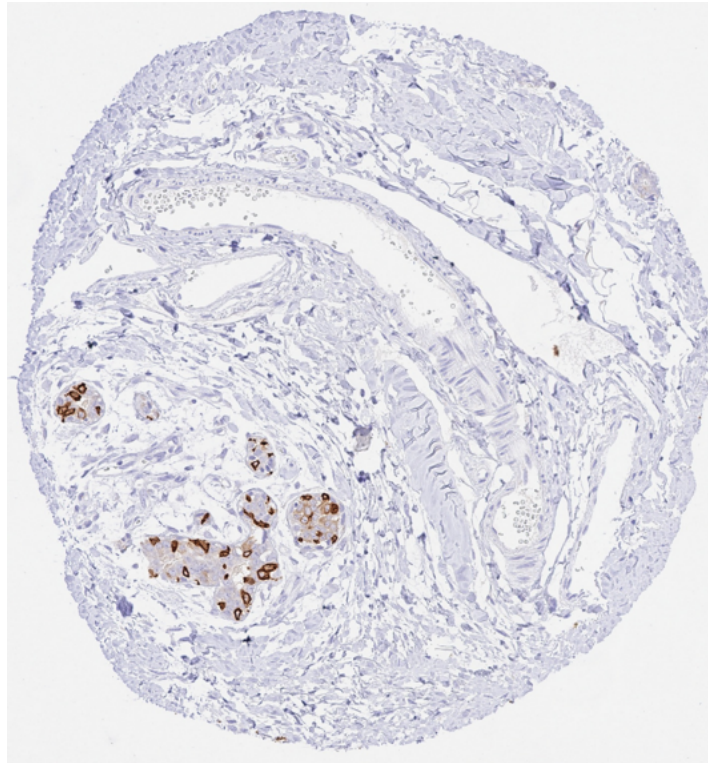


Abbildung 27: Immunfärbung von einem Teil der luminalen Zellen der Brust (HMV325)

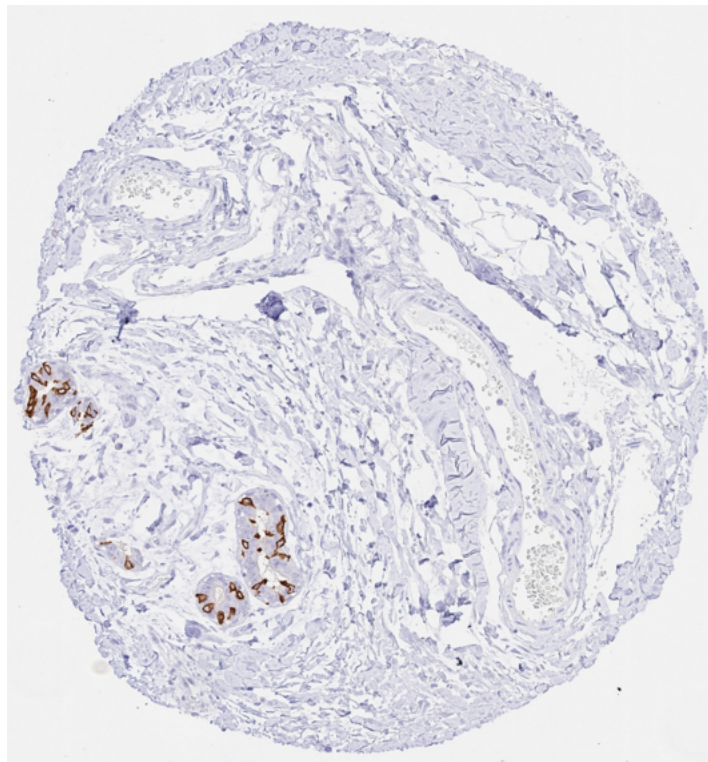


Abbildung 28: Immunfärbung von einem Teil der luminalen Zellen der Brust (EPR3278)

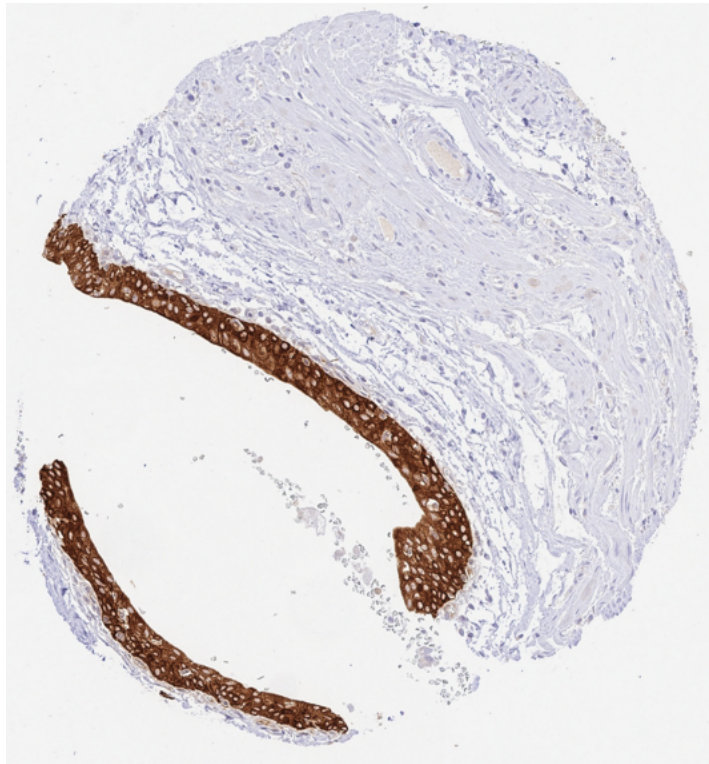


Abbildung 29: Immunfärbung der Urothelzellen des Nierenbeckens (HMV325)

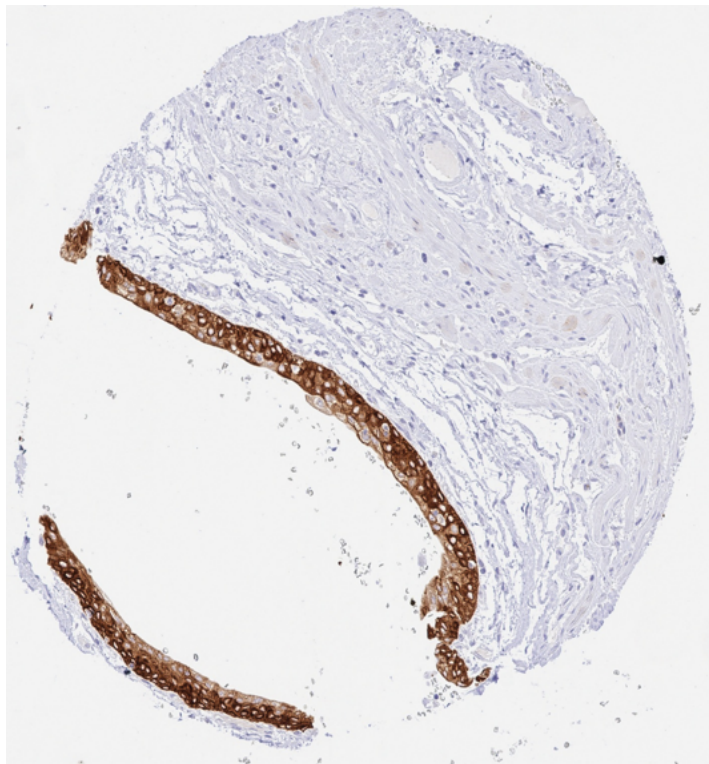


Abbildung 30: Immunfärbung der Urothelzellen des Nierenbeckens (EPR3278)

3.3 AGR2-Immunfärbung von Tumoren

Eine zytoplasmatische AGR2-Immunfärbung konnte in 7,514 (60.43%) der 12,434 interpretierbaren Tumoren entdeckt werden. Die Intensität der Färbung war in 732 Fällen (5.89%) schwach, in 874 Fällen (7.03%) moderat und in 5908 Fällen (47.51%) stark ausgeprägt. In 103 der 134 Tumortypen und -subtypen konnte mindestens eine schwache AGR2-Immunfärbung festgestellt werden. 83 Entitäten enthielten mindestens einen Fall mit einer starken AGR2-Immunfärbung. Am häufigsten trat eine AGR2-Immunfärbung in Tumoren des weiblichen Genitaltraktes, insbesondere beim Adenokarzinom des Cervix (100%) und beim muzinösen Ovarialkarzinom (100%), auf. Des Weiteren zeigten die Resultate eine verstärkte Färbung in verschiedensten Subtypen vom Mammakarzinom (57.1-100%), Urothelkarzinom (75.6-100%), Adenokarzinom des oberen und unteren Gastrointestinaltraktes (93.6-99.6%) sowie bei Karzinomen des biliären Systems und des Pankreas (65.2-98.2%). Die Positivitätsrate fiel bei neuroendokrinen Neoplasien (20-100%) und bei Plattenepithelkarzinomen (46.4-77.3%) etwas geringer aus. Eine Färbung konnte nur selten detektiert werden in Tumoren der Nebennierenrinde (4.3-9.3%) sowie in Nierenzellkarzinomen (7.8-26.5%) und war in Melanomen, Seminomen, embryonalen Karzinomen, Tumoren des hematopoetischen und lymphatischen Gewebes und mesenchymalen Tumoren meist abwesend. Repräsentative Bilder sind in den Abbildungen 31-38 dargestellt. Die Ergebnisse der AGR2-Immunfärbung aller untersuchten Tumoren sind organsystematisch in Tabelle 5 sowie in einer Rangliste, sortiert nach ihrer Positivitätsrate und Intensität, in Abbildung 39 dargestellt.

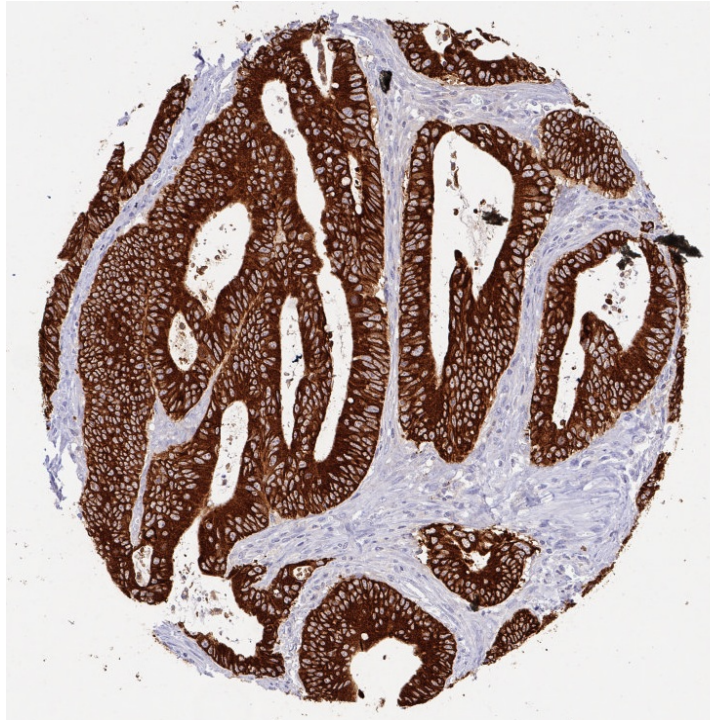


Abbildung 31: Kräftige zytoplasmatische AGR2-Färbung aller Zellen eines kolorektalen Adenokarzinoms.

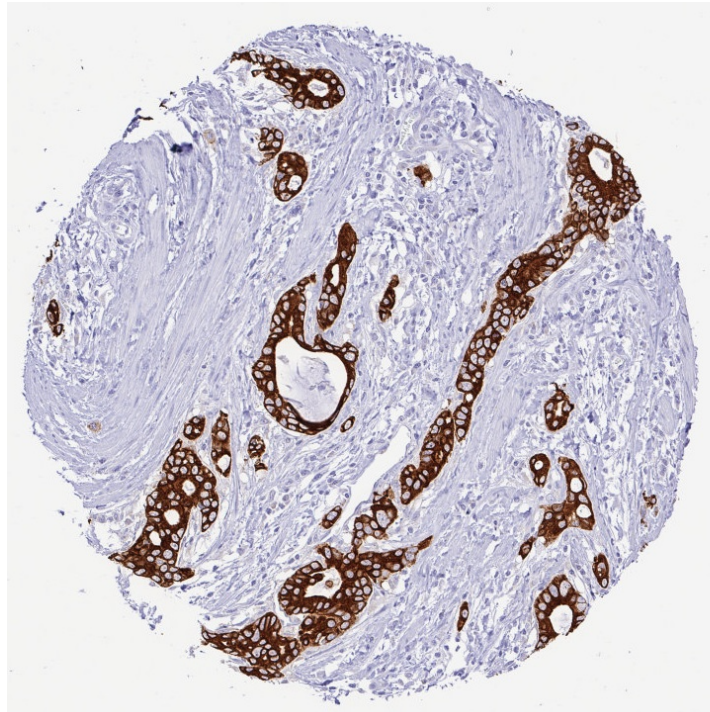


Abbildung 32: Diffuse kräftige AGR2-Färbung aller Tumorzellen eines Adenokarzinoms des Magens.

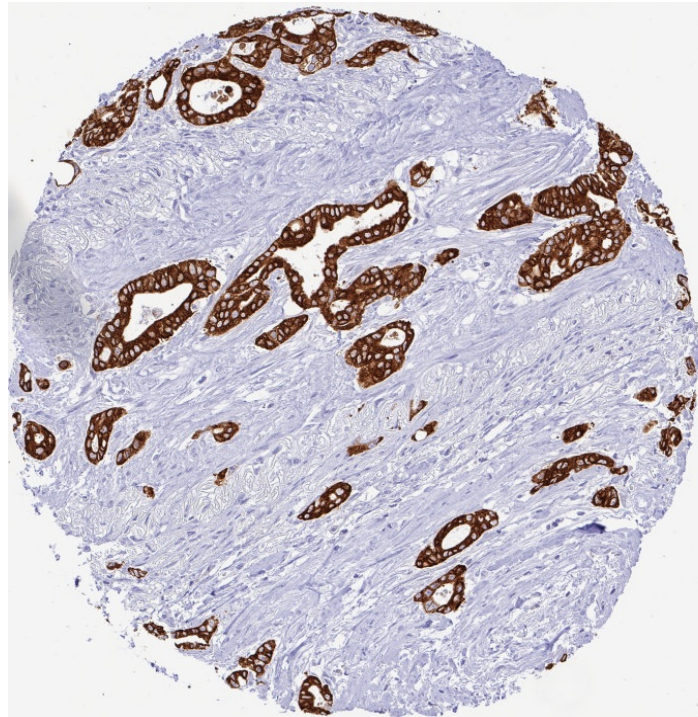


Abbildung 33: Diffuse kräftige Positivität der Tumorzellen eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas.

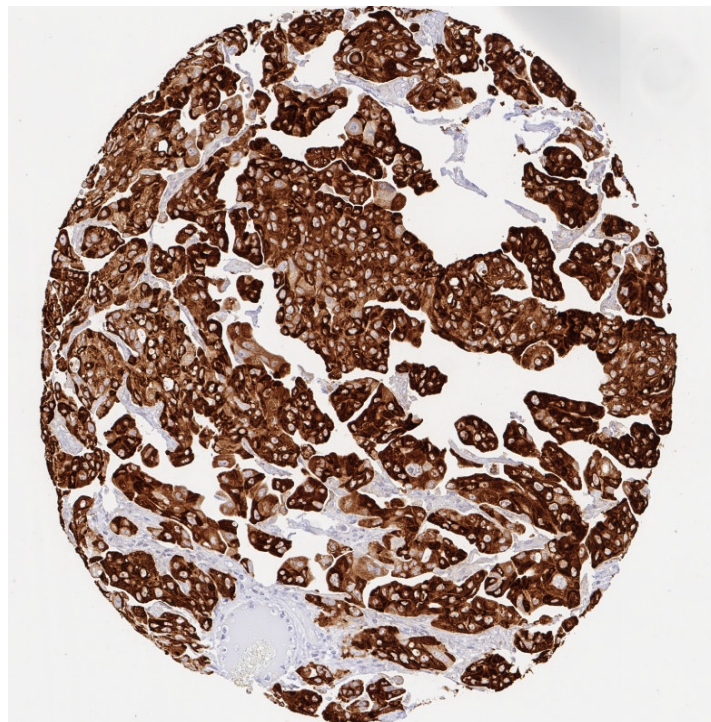


Abbildung 34: Diffuse AGR2-Positivität aller Tumorzellen eines Urothelkarzinoms (muskelinvasiv).

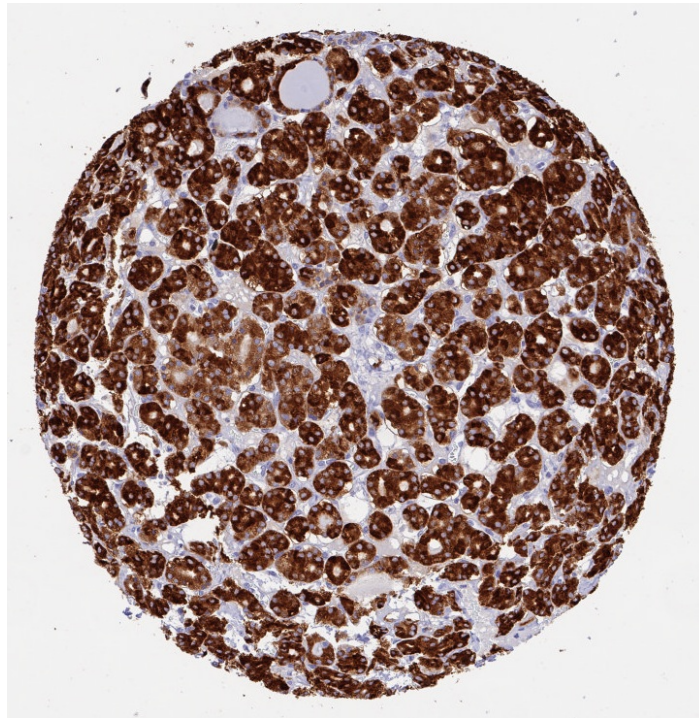


Abbildung 35: Diffuse kräftige AGR2-Positivität aller Tumorzellen eines folliculären Schilddrüsenkarzinoms.

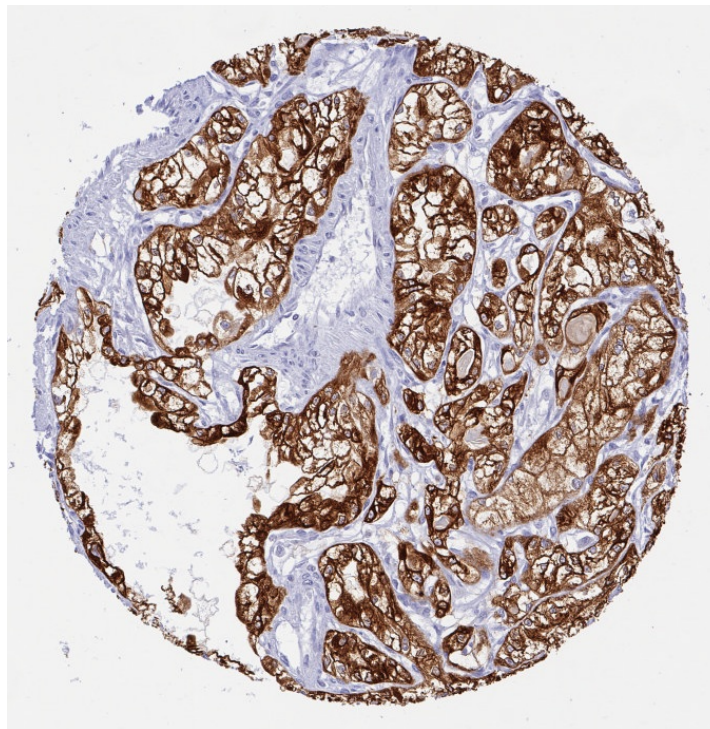


Abbildung 36: Kräftige AGR2-Positivität der Tumorzellen eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms.

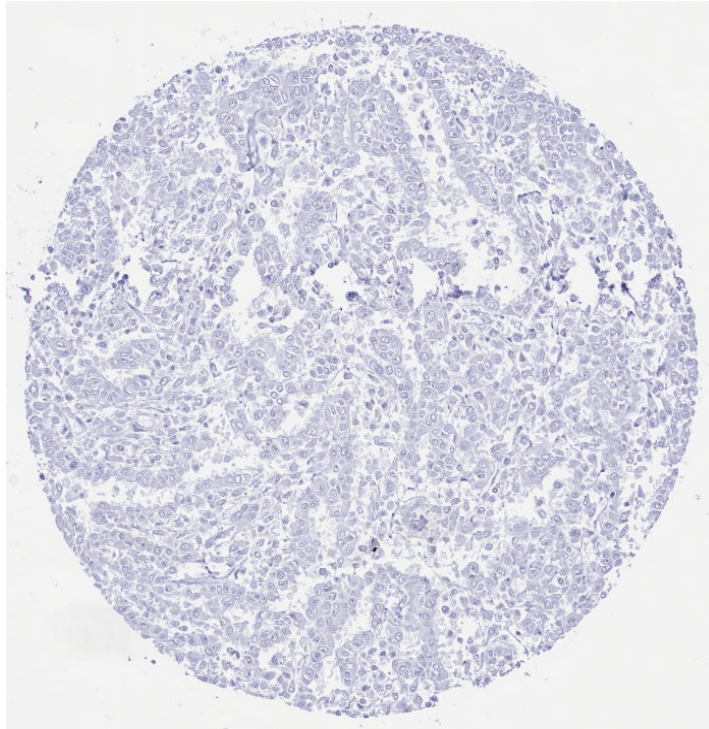


Abbildung 37: Malignes Mesotheliom (Thorax) ohne Nachweis einer AGR2-Immunfärbung.

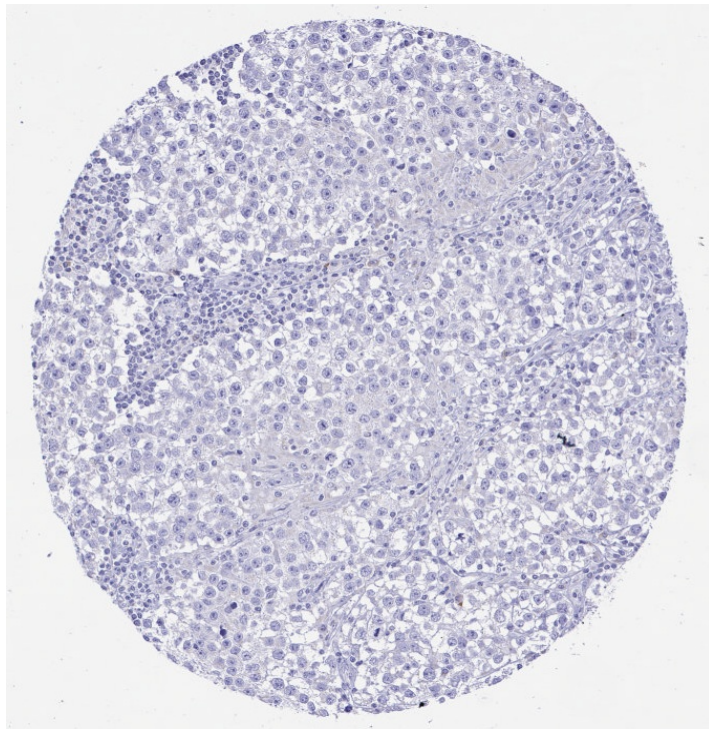


Abbildung 38: Testikuläres Seminom ohne Nachweis einer AGR2-Immunfärbung.

Tabelle 5: AGR2-Expression in humanen Tumoren.

	Tumorentität	Auf TMA (n)	auswertbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
Hauttumoren	Basalzellkarzinom	41	13	46,2	23,1	23,1	7,7
	Plattenepithelkarzinom der Haut	95	81	59,3	23,5	11,1	6,2
	Malignes Melanom	19	18	83,3	16,7	0,0	0,0
	Malignes Melanom mit Lymphknotenmetastasen	86	83	96,4	2,4	1,2	0,0
	Merkelzellkarzinom	2	2	50,0	0,0	50,0	0,0
Kopf- und Halstumoren	Plattenepithelkarzinom des Larynx	109	92	44,6	17,4	16,3	21,7
	Plattenepithelkarzinom, Pharynx	60	41	31,7	26,8	22,0	19,5
	Plattenepithelkarzinom, Mundboden	130	103	47,6	30,1	10,7	11,7
	Pleomorphes Adenom, Gl. Parotis	50	45	44,4	15,6	26,7	13,3
	Warthin Tumor, Gl. Parotis	49	48	12,5	33,3	41,7	12,5
	Basalzelladenom, Speicheldrüse	15	15	33,3	26,7	40,0	0,0
Tumoren der Lunge, Pleura und Thymus	Adenokarzinom, Lunge	196	130	4,6	3,1	5,4	86,9
	Plattenepithelkarzinom, Lunge	80	44	22,7	20,5	15,9	40,9
	Mesotheliom, epitheloid	40	25	92,0	0,0	8,0	0,0
	Mesotheliom, biphasisch	29	17	88,2	5,9	0,0	5,9
	Thymom	29	29	72,4	10,3	17,2	0,0
	Neuroendokriner Tumor (NET), Lunge	29	24	45,8	0,0	33,3	20,8
Tumoren des weiblichen Genitaltraktes	Plattenepithelkarzinom, Vagina	30	26	38,5	23,1	23,1	15,4
	Plattenepithelkarzinom, Vulva	107	89	50,6	29,2	12,4	7,9
	Plattenepithelkarzinom, Cervix	88	75	38,7	13,3	18,7	29,3
	Adenokarzinom, Cervix	23	23	0,0	0,0	4,3	95,7
	Endometroides Karzinom, Endometrium	288	266	3,8	3,4	12,4	80,5
	Seröses Karzinom, Endometrium	36	33	24,2	9,1	24,2	42,4
	Karzinom, Uterus	57	46	30,4	4,3	26,1	39,1
	Endometriumkarzinom, high grade, G3	13	13	53,8	7,7	15,4	23,1
	Klarzelliges Karzinom, Endometrium	9	8	37,5	0,0	0,0	62,5
	Ovariakarzinom, endometroid	93	71	9,9	8,5	15,5	66,2
	Ovariakarzinom, serös	530	439	32,8	19,1	32,1	15,9
	Ovariakarzinom, muzinös	75	51	0,0	0,0	0,0	100,0
	Ovariakarzinom, klarzellig	51	40	10,0	7,5	30,0	52,5
	Karzinom, Ovar	47	35	54,3	14,3	22,9	8,6
	Granulosazelltumor, Ovar	44	42	95,2	2,4	0,0	2,4
	Leydig-Zelltumor, Ovar	4	4	75,0	25,0	0,0	0,0
	Sertoli-Zelltumor, Ovar	1	1	100,0	0,0	0,0	0,0
Sertoli-Leydig-Zelltumor, Ovar	3	3	100,0	0,0	0,0	0,0	
Steroidzelltumor, Ovar	3	3	66,7	33,3	0,0	0,0	
Brenner Tumor	32	28	3,6	0,0	0,0	96,4	

Tabelle 5 (Fortsetzung): AGR2-Expression in humanen Tumoren.

	Tumorentität	Auf TMA (n)	auswertbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	
Brusttumoren	Invasives Mammakarzinom, kein spezieller Typ	499	344	10,2	4,4	5,5	79,9	
	Lobuläres Mammakarzinom	150	107	2,8	0,9	2,8	93,5	
	Medulläres Mammakarzinom	8	7	42,9	14,3	0,0	42,9	
	Tubuläres Mammakarzinom	2	1	0,0	0,0	0,0	100,0	
	Muzinöses Mammakarzinom	7	5	0,0	0,0	0,0	100,0	
Tumoren des Verdauungstraktes	Polyp, adenomatös, low-grade Dysplasie	50	26	0,0	0,0	0,0	100,0	
	Polyp, adenomatös, high-grade Dysplasie	50	38	0,0	0,0	0,0	100,0	
	Adenokarzinom, Kolon	2483	2236	0,4	0,7	1,4	97,5	
	Adenokarzinom, Magen, diffuser Typ	215	191	1,6	0,0	0,5	97,9	
	Adenokarzinom, Magen, intestinaler Typ	215	186	5,4	1,1	4,8	88,7	
	Adenokarzinom, Magen, gemischter Typ	62	48	2,1	2,1	2,1	93,8	
	Adenokarzinom, Ösophagus	83	78	6,4	1,3	5,1	87,2	
	Plattenepithelkarzinom, Ösophagus	76	70	35,7	17,1	25,7	21,4	
	Plattenepithelkarzinom, Analkanal	91	65	43,1	20,0	9,2	27,7	
	Cholangiokarzinom	58	46	34,8	4,3	8,7	52,2	
	Adenokarzinom, Gallenblase	51	46	4,3	2,2	2,2	91,3	
	Klatskintumor, Gallenblase	42	33	12,1	0,0	0,0	87,9	
	Hepatozelluläres Karzinom	312	277	61,4	6,5	7,2	24,9	
	Duktales Adenokarzinom, Pankreas	659	435	1,8	0,5	2,8	94,9	
	Ampulläres Adenokarzinom, Pankreas	98	69	4,3	1,4	1,4	92,8	
	Azinuszellkarzinom, Pankreas	18	17	23,5	5,9	5,9	64,7	
	Gastrointestinaler Stromatumor	62	60	98,3	0,0	1,7	0,0	
	Neuroendokriner Tumor, Appendix	25	16	25,0	0,0	25,0	50,0	
	Neuroendokriner Tumor, Kolorektum	12	9	11,1	0,0	11,1	77,8	
	Neuroendokriner Tumor, Ileum	53	45	4,4	2,2	13,3	80,0	
	Neuroendokriner Tumor, Pankreas	101	76	55,3	7,9	18,4	18,4	
	Neuroendokrines Karzinom, Kolorektum	14	12	50,0	0,0	0,0	50,0	
	Neuroendokrines Karzinom, Ileum	8	7	0,0	0,0	0,0	100,0	
	Neuroendokrines Karzinom, Gallenblase	4	4	75,0	0,0	0,0	25,0	
	Neuroendokrines Karzinom, Pankreas	14	9	44,4	11,1	33,3	11,1	
	Tumoren des Harntraktes	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2, low grade	87	81	0,0	0,0	0,0	100,0
		Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2, high grade	80	76	0,0	0,0	1,3	98,7
Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G3		126	117	0,0	3,4	6,0	90,6	
Urothelkarzinom, pT2-4 G3		735	540	19,1	11,7	13,3	55,9	
Plattenepithelkarzinom, Harnblase		22	21	42,9	38,1	9,5	9,5	
Neuroendokrines Karzinom, kleinzellig, Harnblase		5	5	80,0	0,0	0,0	20,0	
Urothelkarzinom, sarkomatoid		25	12	50,0	16,7	25,0	8,3	

Tabelle 5 (Fortsetzung): AGR2-Expression in humanen Tumoren.

Tumorentität	Auf TMA (n)	auswertbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
Urothelkarzinom, Nierenbecken	62	59	25,4	11,9	13,6	49,2
Klarzelliges Nierenzellkarzinom	1287	1048	92,2	4,5	1,5	1,8
Papilläres Nierenzellkarzinom	368	275	73,5	16,4	6,2	4,0
Klarzelliges Nierenzellkarzinom, papillär	26	17	88,2	0,0	5,9	5,9
Chromophobes Nierenzellkarzinom	170	132	84,1	11,4	3,0	1,5
Onkozytom, Niere	257	190	63,2	21,6	13,7	1,6
Tumoren des männlichen Genitaltraktes						
Adenokarzinom, Prostata, Gleason 3+3	83	83	3,6	3,6	8,4	84,3
Adenokarzinom, Prostata, Gleason 4+4	80	80	12,5	3,8	15,0	68,8
Adenokarzinom, Prostata, Gleason 5+5	85	85	14,1	4,7	20,0	61,2
Adenokarzinom, Prostata, Rezidiv	258	240	11,3	6,3	18,8	63,8
Neuroendokrines Karzinom, kleinzellig, Prostata	2	2	0,0	0,0	50,0	50,0
Seminom	682	649	99,1	0,2	0,8	0,0
Embryonales Karzinom, Hoden	54	45	93,3	0,0	6,7	0,0
Leydig-Zelltumor, Hoden	31	30	90,0	10,0	0,0	0,0
Sertoli-Zelltumor, Hoden	2	2	50,0	50,0	0,0	0,0
Sex-cord-Stromatumor, Hoden	1	1	100,0	0,0	0,0	0,0
Spermatozystischer Tumor, Hoden	1	1	100,0	0,0	0,0	0,0
Dottersacktumor	53	41	80,5	0,0	17,1	2,4
Teratom	53	41	65,9	2,4	19,5	12,2
Plattenepithelkarzinom, Penis	92	69	53,6	21,7	8,7	15,9
Tumoren des endokrinen Systems						
Adenom, Schilddrüse	63	63	38,1	15,9	14,3	31,7
Papilläres Schilddrüsenkarzinom	341	330	10,3	7,9	10,6	71,2
Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	109	106	34,0	13,2	16,0	36,8
Medulläres Schilddrüsenkarzinom	57	56	3,6	7,1	3,6	85,7
Adenom, Nebenschilddrüse	43	41	87,8	4,9	7,3	0,0
Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	19	19	68,4	10,5	10,5	10,5
Nebennierenrindenadenom	48	43	90,7	9,3	0,0	0,0
Nebennierenrindenkarzinom	27	23	95,7	4,3	0,0	0,0
Phäochromozytom	51	48	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes						
Hodgkin-Lymphom	103	93	100,0	0,0	0,0	0,0
Kleines lymphatisches Lymphom, B-Zell Typ (B-SLL/B-CLL)	50	39	100,0	0,0	0,0	0,0
Diffuses großes B-Zell Lymphom (DLBCL)	113	101	98,0	1,0	1,0	0,0
Follikuläres Lymphom	88	77	100,0	0,0	0,0	0,0
T-Zell Non-Hodgkin Lymphom	25	18	100,0	0,0	0,0	0,0
Mantelzell Lymphom	18	15	100,0	0,0	0,0	0,0
Marginalzonen Lymphom	16	12	100,0	0,0	0,0	0,0
Diffuses großes B-Zell Lymphom (DLBCL), Hoden	16	14	100,0	0,0	0,0	0,0
Burkitt Lymphom	5	2	100,0	0,0	0,0	0,0

Tabelle 5 (Fortsetzung): AGR2-Expression in humanen Tumoren.

Tumorentität		Auf TMA (n)	auswertbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
Tumoren des Weichgewebes und Knochen	Granularzelltumor	23	13	100,0	0,0	0,0	0,0
	Leiomyom	50	49	100,0	0,0	0,0	0,0
	Leiomyosarkom	94	90	100,0	0,0	0,0	0,0
	Liposarkom	96	81	100,0	0,0	0,0	0,0
	Maligner Nervenscheidentumor (MPNST)	15	13	92,3	0,0	0,0	7,7
	Myofibrosarkom	26	25	100,0	0,0	0,0	0,0
	Angiosarkom	42	28	100,0	0,0	0,0	0,0
	Angiomyolipom	91	69	89,9	10,1	0,0	0,0
	Dermatofibrosarkom protuberans	21	11	100,0	0,0	0,0	0,0
	Ganglioneurom	14	10	100,0	0,0	0,0	0,0
	Kaposi Sarkom	8	2	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neurofibrom	117	82	100,0	0,0	0,0	0,0
	Sarkom, nicht spezifiziert (NOS)	74	62	96,8	0,0	3,2	0,0
	Paragangliom	41	28	96,4	3,6	0,0	0,0
	Ewing Sarkom	23	12	100,0	0,0	0,0	0,0
	Rhabdomyosarkom	7	6	100,0	0,0	0,0	0,0
	Schwannom	122	92	100,0	0,0	0,0	0,0
	Synovialsarkom	12	9	100,0	0,0	0,0	0,0
	Osteosarkom	19	11	90,9	9,1	0,0	0,0
	Chondrosarkom	15	8	100,0	0,0	0,0	0,0
Rhabdoidtumor	5	5	100,0	0,0	0,0	0,0	
Solitärer fibröser Tumor	17	17	100,0	0,0	0,0	0,0	

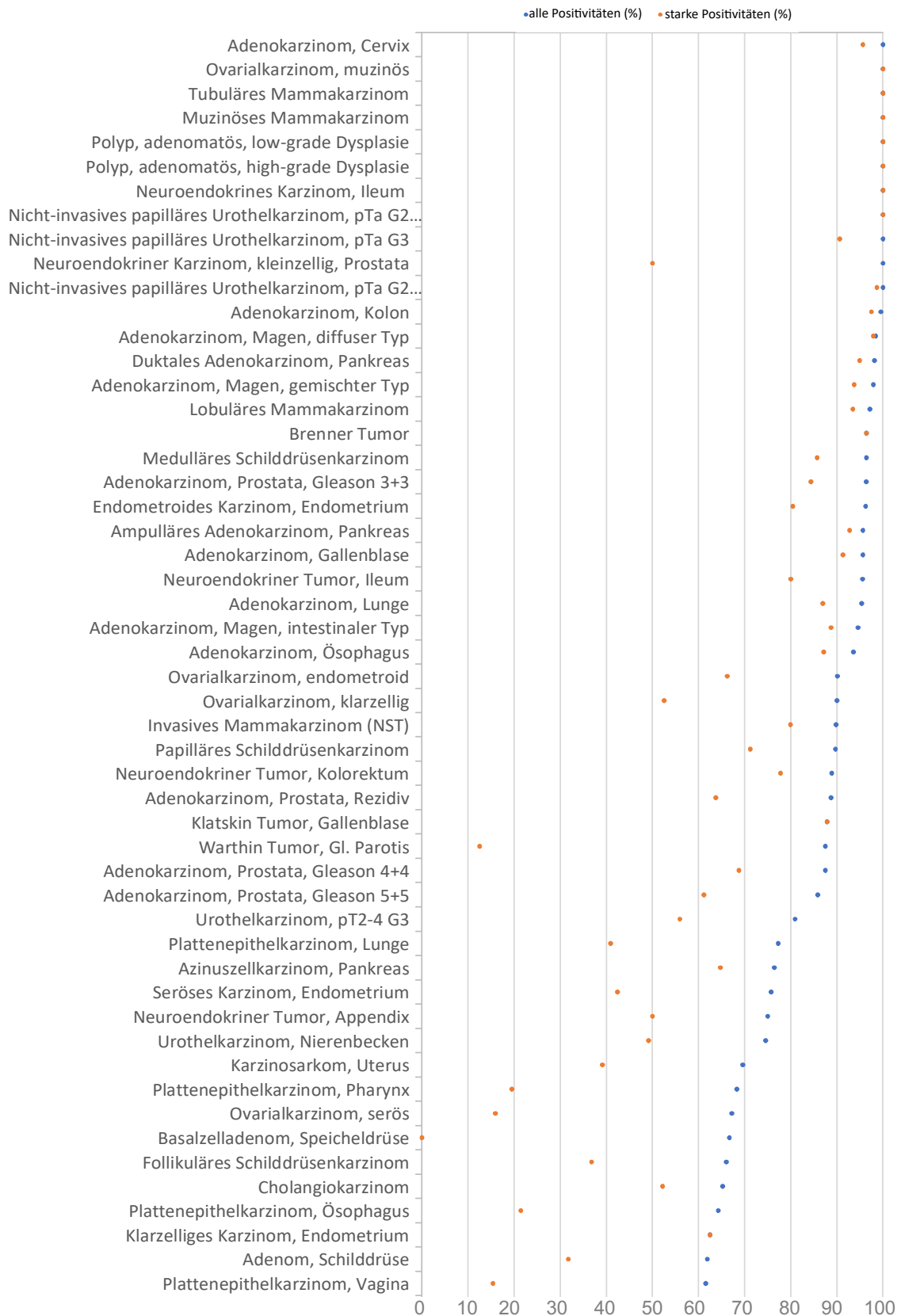


Abbildung 39: Positivität der AGR2-Immunfärbung in verschiedenen menschlichen Tumoren. Orange: Perzentil der Proben mit einer starken Immunfärbung. Blau: Perzentil der Proben mit einer Immunfärbung aller Intensitäten.

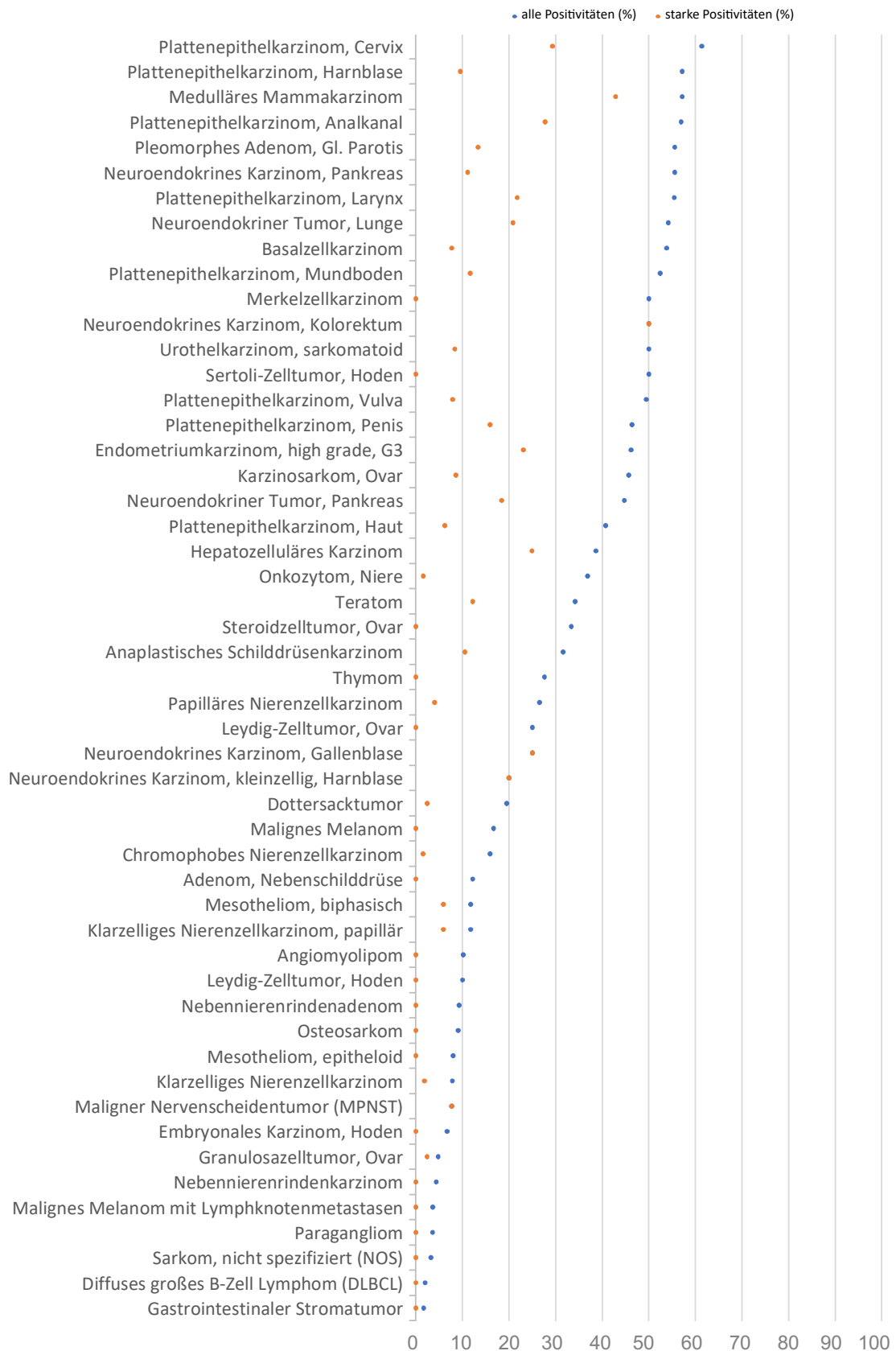


Abbildung 39 (Fortsetzung): Positivität der AGR2-Immunfärbung in verschiedenen menschlichen Tumoren. Orange: Perzentil der Proben mit einer starken Immunfärbung. Blau: Perzentil der Proben mit einer Immunfärbung aller Intensitäten.

Die Beziehung zwischen dem Nachweis einer AGR2-Expression und histopathologischen oder molekularen Tumorparametern (verfügbar aus früheren Studien und aus den jeweiligen Patientenakten) wurde für die folgenden Tumortypen untersucht: kolorektales Adenokarzinom, endometrioides Endometriumkarzinom, seröses high grade Karzinom des Ovars (endometrioides Karzinom des Ovars), klarzelliges Nierenzellkarzinom, papilläres Nierenzellkarzinom, duktales Adenokarzinom des Pankreas, papilläres Schilddrüsenkarzinom, follikuläres Schilddrüsenkarzinom, invasives Mammakarzinom von keinem speziellen Typ (NST) und Urothelkarzinom.

Beim kolorektalen Adenokarzinom (Tabelle 6) fand sich trotz nur geringgradigen Unterschieden ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer geringfügig höheren AGR2-Expression und einem positiven Nodalstatus ($p=0.0275$) und auch ein signifikanter (ebenfalls marginaler) Zusammenhang mit RAS-Mutationen ($p=0.0136$).

		AGR2-Immunfärbung					p-Wert
		n	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	
Kolorektales Adenokarzinom	Alle Tumoren	2168	0,5	0,7	1,3	97,5	
	pT1	83	1,2	0	1,2	97,6	0,1215
	pT2	421	0	0,2	0,7	99	
	pT3	1200	0,5	0,6	1,4	97,5	
	pT4	430	0,7	1,6	1,6	96	
	pN0	1109	0,2	0,5	0,9	98,4	0,0275
	pN+	1018	0,8	0,9	1,9	98,5	
	V0	1535	0,3	0,5	1,4	97,9	0,0514
	V+	558	1,1	1,3	1,3	96,4	
	L0	696	0,1	0,7	0,9	98,3	0,1817
	L1	1407	0,6	0,7	1,6	97,1	
	Left colon	1228	0,2	0,6	1,1	98	0,3608
	Right colon	465	0,9	0,4	1,5	97,2	
	MSI	88	0	0	1,1	98,9	0,7543
	MSS	1158	0,2	0,5	1,3	98	
	RAS mutated	356	0	0	1,4	98,6	0,0136
	RAS wildtype	451	0,7	1,3	1,1	96,9	
	BRAF mutated	22	0	0	0	100	0,6245
	BRAF wildtype	131	0	0,8	1,5	97,7	

Tabelle 6: AGR2-Expression und Tumorphänotyp beim kolorektalen Adenokarzinom.

Für das duktales Adenokarzinom des Pankreas (Tabelle 7) fanden sich keine signifikanten Korrelationen zwischen der AGR2-Expression und histopathologischen Tumorparametern.

		AGR2-Immunfärbung					p-Wert
		n	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	
Duktales Adenokarzinom vom Pankreas	Alle Tumoren	327	2,1	0,6	3,1	94,2	
	pT1	7	0	0	0	100	0,8717
	pT2	44	2,3	2,3	2,3	93,2	
	pT3	259	1,9	0,4	3,5	94,2	
	pT4	17	5,9	0	0	94,1	
	G1	9	0	0	0	100	0,073
	G2	230	2,6	0,9	1,7	94,8	
	G3	70	0	0	8,6	91,4	
	pN0	65	0	1,5	3,1	95,4	0,3114
	pN+	261	2,3	0,4	3,1	94,3	

Tabelle 7: AGR2-Expression und Tumorphänotyp beim duktales Adenokarzinom vom Pankreas.

Im Falle des Mammakarzinoms (NST) (Tabelle 8) fand sich eine signifikante Korrelation zwischen einer verminderten AGR2-Expression und einem hohen Malignitätsgrad ($p=0.0049$).

		AGR2-Immunfärbung					p-Wert
		n	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	
Invasives Mammakarzinom (NST)	pT1	115	7,8	0,9	6,1	85,2	0,6069
	pT2	147	9,5	4,8	4,8	81	
	pT3-4	27	7,4	3,7	3,7	85,2	
	G1	8	0	0	0	100	0,0049
	G2	162	4,3	1,9	4,3	89,5	
	G3	122	15,6	4,9	7,4	72,1	
	pN0	147	7,5	2	6,1	84,4	0,7739
	pN+	117	7,7	4,3	6	8,2	

Tabelle 8: AGR2-Expression und Tumorphänotyp beim invasiven Mammakarzinom (NST).

Beim endometrioiden Endometriumkarzinom (Tabelle 9) zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen einer etwas höheren AGR2-Expression und dem Fehlen von Lymphknotenmetastasen ($p=0.0482$).

		AGR2-Immunfärbung					p-Wert
		n	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	
Endometrioides Endometriumkarzinom	pT1	104	1,9	2,9	12,5	82,7	0,297
	pT2	24	4,2	0	29,2	66,7	
	pT3-4	37	5,4	5,4	18,9	70,3	
	pN0	50	4	0	20	76	0,0482
	pN+	30	0	10	16,7	73,3	

Tabelle 9: AGR2-Expression und Tumorphänotyp beim endometrioiden Endometriumkarzinom.

Bei den Tumoren des Ovars (Tabelle 10) fanden sich weder für seröse high grade Karzinome, noch für endometroide Karzinome signifikante Resultate bezüglich des AGR2-Status.

		AGR2-Immunfärbung					p-Wert
		n	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	
Seröses Ovarialkarzinom	pT1	30	33,3	20	20	26,7	0,2592
	pT2	42	42,9	23,8	21,4	11,9	
	pT3	245	32,2	16,3	33,9	17,6	
	pN0	80	28,8	22,5	26,3	22,5	0,1028
	pN1	158	39,9	17,1	30,4	12,7	
Endometroides Ovarialkarzinom	pT1	26	0	11,5	19,2	69,2	0,2769
	pT2	5	0	20	0	80	
	pT3	6	16,7	16,7	0	66,7	
	pN0	24	0	12,5	4,2	83,3	0,0673
	pN1	8	12,5	0	25	62,5	

Tabelle 10: AGR2-Expression und Tumorphänotyp bei serösen und endometroiden Endometriumkarzinomen.

Bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen (Tabelle 11) zeigte sich eine signifikante Beziehung zwischen einer erhöhten AGR2-Expression und einem ungünstigen ISUP-Grad ($p=0.0013$), einem ungünstigen Fuhrman-Grad ($p<0.0001$), einem ungünstigen Thoenes-Grad ($p<0.0001$) und einem fortgeschrittenen Tumorstadium ($p=0.0035$).

		AGR2-Immunfärbung					p-Wert
		n	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	
Klarzelliges Nierenzellkarzinom	Alle Tumoren	1001	96,9	0,7	0,7	1,7	
	ISUP						
	1	227	99,6	0	0	0,4	0,0013
	2	356	97,8	0,3	0,3	1,7	
	3	219	95,9	0,5	0,9	2,7	
	4	70	87,1	5,7	1,4	5,7	
	Fuhrman						
	1	55	98,2	0	0	1,8	<0,0001
	2	596	98,8	0,2	0,2	0,8	
	3	249	96,4	0,4	1,6	1,6	
	4	84	83,3	6	2,4	8,3	
	Thoenes						
	1	302	100	0	0	0	<0,0001
	2	414	97,1	0,2	0,7	1,9	
	3	92	85,9	5,4	2,2	6,5	
	UICC						
	1	259	97,7	0,8	0	1,5	0,2976
	2	31	96,8	0	3,2	0	
	3	83	97,6	1,2	0	1,2	
	4	66	92,4	3	1,5	3	
	pT1	569	98,2	0,4	0,4	1,1	0,0035
	pT2	118	99,2	0	0,8	0	
	pT3-4	303	93,4	1,7	1,3	3,6	
	pN0	149	96	2	0	2	0,5371
	pN+	25	96	0	0	4	
	pM0	88	98,9	0	0	1,1	0,0542
	pM+	86	91,9	3,5	2,3	2,3	

Tabelle 11: AGR2-Expression und Tumorphänotyp beim klarzelligen Nierenzellkarzinom.

Beim papillären Nierenzellkarzinom (Tabelle 12) fanden sich keine signifikanten Assoziationen zwischen AGR2 und dem Tumorphänotyp.

		AGR2-Immunfärbung					p-Wert
		n	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	
Papilläres Nierenzellkarzinom	Alle Tumoren	240	72,1	17,9	6,3	3,8	
	ISUP						
	1	29	89,7	6,9	3,4	0	0,194
	2	112	64,3	21,4	8,9	5,4	
	3	64	71,9	21,9	3,1	3,1	
	4	5	80	20	0	0	
	Fuhrman						
	1	2	100	0	0	0	0,5608
	2	151	70,9	17,9	7,9	3,3	
	3	65	73,8	21,5	1,5	3,1	
	4	9	77,8	11,1	11,1	0	
	Thoenes						
	1	45	77,8	15,6	6,7	0	0,2377
	2	128	66,4	23,4	6,3	3,9	
	3	15	86,7	6,7	6,7	0	
	UICC						
	1	76	72,4	15,8	6,6	5,3	0,7206
	2	11	63,6	27,3	9,1	0	
	3	4	50	25	25	0	
	4	9	55,6	11,1	22,2	11,1	
	pT1	166	72,3	17,5	6,6	3,6	0,9371
	pT2	41	70,7	22	4,9	2,4	
	pT3-4	27	70,4	18,5	3,7	7,4	
	pN0	18	50	27,8	22,2	0	0,1321
	pN+	13	61,5	7,7	15,4	15,4	
	pM0	22	40,9	27,3	18,2	13,6	0,3536
	pM+	11	72,7	9,1	9,1	9,1	

Tabelle 12: AGR2-Expression und Tumorphänotyp beim papillären Nierenzellkarzinom

Für das Urothelkarzinom der Harnblase (Tabelle 13) fanden sich sowohl bei nicht-invasiven Karzinomen ($p=0.0003$) wie auch bei muskelinvasiven Karzinomen ($p=0.0066$) eine signifikante Abhängigkeit zwischen einer verminderten AGR2-Expression und einem ungünstigen Differenzierungsgrad. Zudem war die AGR2-Positivität bei invasiven Karzinomen deutlich geringer als bei pTa Tumoren ($p<0.0001$).

		AGR2-Immunfärbung					p-Wert
		n	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	
Urothelkarzinom	Alle Tumoren	637	11,3	7,5	9,9	71,3	
	pTa G2 low	81	0	0	0	100	0,0003
	pTa high	76	0	0	1,3	98,7	
	pTa G3	86	0	4,7	5,8	89,5	
	pT2	101	16,8	7,9	9,9	65,3	0,2196
	pT3	190	17,4	12,1	17,4	53,2	
	pT4	93	22,6	14	15,1	48,4	
	G2	18	0	5,6	5,6	88,9	0,0066
	G3	366	19,4	11,7	15,3	53,6	
	pN0	212	18,9	11,8	13,7	55,7	0,8212
	pN+	146	17,1	12,3	17,1	53,4	

Tabelle 13: AGR2-Expression und Tumorphänotyp beim Urothelkarzinom

Die AGR2-Immunfärbung war nicht assoziiert mit Parametern der Tumoraggressivität in Tumoren des Pankreas, Ovars, Schilddrüse und des papillären Nierenzellkarzinoms, wobei Tumoren mit niedriger AGR2-Expression oft dazu neigten, ungünstigere Tumormerkmale aufzuweisen.

4. Diskussion

Die erfolgreiche Untersuchung von 12.433 Tumoren von 134 verschiedenen Tumorkategorien ergab eine umfassende Übersicht über die Häufigkeit der AGR2-Expression in den meisten wichtigen humanen Tumorarten. Die Daten zeigen, dass die AGR2-Befunde in Tumoren weitgehend die Expression von AGR2 in Normalgewebe reflektieren. Eine signifikante AGR2-Expression fand sich besonders häufig in epithelialen Tumoren, ausgehend von Epithelien, die normalerweise eine AGR2-Expression zeigen. Eine AGR2 Expression in nicht-epithelialen Neoplasien war hingegen nur selten zu finden. Dass Adenokarzinome häufiger AGR2-positiv waren als Plattenepithelkarzinome, passt zu der nur geringgradigen AGR2-Expression im normalen Plattenepithel. Die Tatsache, dass nur wenige Nierenzellkarzinome AGR2-positiv waren, ist ebenso in Übereinstimmung mit den Normalgewebefunden. In normalem Nierengewebe zeigte sich typischerweise nur in vereinzelten Tubuli und Sammelrohren eine AGR2-Färbung. Für die wenigen Tumorentitäten, für die bereits frühere Daten zur AGR2- Expression vorlagen, lagen unsere Positivitätsraten meist im oberen Bereich der bisher publizierten Daten. Ein graphischer Vergleich der Positivitätsraten dieser Studie und früher publizierter Daten ist in Abbildung 40 dargestellt.



Abbildung 40: AGR2-Daten dieser Studie (X) im Vergleich zur bisher publizierten Literatur. Die Farben der Punkte repräsentieren die Anzahl der verwendeten Tumoren der jeweiligen Studie. Rot: $n \leq 20$; Gelb: $n = 21-100$; Grün: ≥ 100 .

Literaturverweise zu den Daten aus Abbildung 40:

Hepatozelluläres Karzinom: (Lepreux et al., 2011)

Kolorektales Karzinom: (Riener et al., 2014)

Lunge Adenokarzinom: (Ci and Wu, 2022, Fritzsche et al., 2007, Pizzi et al., 2012a, Chung et al., 2012)

Lunge Plattenepithelkarzinom: (Pizzi et al., 2012a, Fritzsche et al., 2007)

Magen Adenokarzinom, diffuser Typ: (Zhang et al., 2016)

Magen Adenokarzinom, intestinaler Typ: (Zhang et al., 2016)

Mammakarzinom, lobulär: (Guo et al., 2017)

Mammakarzinom (NST): (Guo et al., 2017, Duran et al., 2008, Innes et al., 2006)

Mammakarzinom, invasiv (NST): (Guo et al., 2017, Fritzsche et al., 2006)

Ovarialkarzinom, endometroid: (Armes et al., 2013, Darb-Esfahani et al., 2012)

Ovarialkarzinom, klarzellig: (Armes et al., 2013, Darb-Esfahani et al., 2012)

Ovarialkarzinom, muzinös: (Park et al., 2011, Armes et al., 2013, Darb-Esfahani et al., 2012)

Ovarialkarzinom, serös: (Park et al., 2011, Armes et al., 2013, Darb-Esfahani et al., 2012)

Ösophagus Adenokarzinom: (Pizzi et al., 2012b, DiMaio et al., 2012)

Ösophagus Plattenepithelkarzinom: (DiMaio et al., 2012, Takabatake et al., 2021)

Pankreas duktales Adenokarzinom: (Liu et al., 2018, Ramachandran et al., 2008, Riener et al., 2009, Nishimon et al., 2023, Mizuuchi et al., 2015)

Prostata Adenokarzinom: (Rodriguez-Blanco et al., 2018, Wambach et al., 2024, Bu et al., 2011, Kristiansen et al., 2005, Zhang et al., 2007)

Schilddrüse papilläres Karzinom: (Di Maro et al., 2014)

Die relativ hohe Positivitätsrate in unserer Studie spricht für eine vergleichsweise hohe Sensitivität unseres Assays. Dementsprechend war unsere Positivitätsrate, beispielsweise für Plattenepithelkarzinome der Lunge (77.3%), höher als die 49%, welche früher von Fritzsche et. al., und die 45%, welche vorher von Pizzi et. al., publiziert worden waren (Fritzsche et al., 2007, Pizzi et al., 2012a). Für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus war unsere Positivitätsrate (64.3%) höher als die 28.4% von Takabatake et. al. und die 37% von DiMaio et. al. (Takabatake et al., 2021, DiMaio et al., 2012). Für klarzellige Ovarialkarzinome war unsere Positivitätshäufigkeit (90%) deutlich höher als die 45%, welche von Armes et. al., und die 11.1%, die von Darb-Esfahani et. al. publiziert worden sind (Armes et al., 2013, Darb-Esfahani et al., 2012). Auch für seröse high-grade Karzinome des Ovars lag unsere Positivitätsrate (67.2%) deutlich höher als die publizierten Daten von Darb-Eshfani et. al. (32.3%), von Park et. al. (50%) und von Armes et. al. (19%) (Armes et al., 2013, Darb-Esfahani et al., 2012, Park et al., 2011). In unserem hochsensitiven AGR2-Assay fanden wir eine positive Immunfärbung auch in 38.6% unserer 277 hepatozellulären Karzinome. In dieser Tumorkategorie hatten Lepreux et. al. bei der Untersuchung von zwölf Tumoren keinen einzigen positiven Fall gefunden (Lepreux et al., 2011).

Eine vergleichende Untersuchung der immunhistochemischen Färbemuster in Tumoren und den korrespondierenden Normalgeweben ist eine wichtige Voraussetzung für die Abschätzung eines potenziellen diagnostischen Nutzens und ist somit essenziell für die Differenzierung zwischen Normalgeweben und neoplastischen Geweben eines bestimmten Organs. Die umfassende Normalgewebsuntersuchung unserer Studie an 76 verschiedenen Normalgewebstypen erlaubte es, für grundsätzlich alle untersuchten Tumoren auch Vergleiche mit dem entsprechenden Normalgewebe vorzunehmen. Dieser Teil unserer

Untersuchung ergab eine möglicherweise wertvolle diagnostische Relevanz der AGR2-Expression für die Unterscheidung von Neoplasien der Schilddrüse von normalen Schilddrüsengewebe. Während die AGR2-Expression im normalen Schilddrüsengewebe nur geringgradig war oder gar fehlte, fand sich eine mäßig starke bis starke AGR2-Positivität in 46% der 63 untersuchten Schilddrüsenadenome, 52.8% der 106 untersuchten follikulären Schilddrüsenkarzinome, 81.8% der 330 evaluierten papillären Schilddrüsenkarzinome sowie in 31.6% der 19 gefärbten anaplastischen Karzinome der Schilddrüse. Die AGR2-Immunhistochemie könnte somit für die Unterscheidung zwischen neoplastischem und nicht-neoplastischem Schilddrüsengewebe wertvoll sein. Diese Unterscheidung ist für Pathologen gelegentlich herausfordernd. Insbesondere die Sensitivität der Zytologie für den Nachweis von Neoplasien der Schilddrüse ist noch ausbaufähig. Sie reicht, je nach untersuchtem Tumortyp, von 45-95.2% (Trimboli et al., 2015, Hajmanoochehri and Rabiee, 2015, Sinna and Ezzat, 2012, Musani et al., 2011, Elisei et al., 2004, Cap et al., 1999). Am besten ist die diagnostische Sensitivität der Zytologie für die papillären Schilddrüsenkarzinome (Serna de la Saravia et al., 2006). Weitere mögliche diagnostische Anwendungen der AGR2-Immunhistochemie könnte die Unterscheidung der Nierenzellkarzinome (typischerweise negativ) von Urothelkarzinomen (typischerweise positiv) der Niere beinhalten sowie die Unterscheidung der Mesotheliome (typischerweise negativ) von Adenokarzinomen (typischerweise positiv) der Lunge. Die Anzahl der untersuchten Tumoren ist in unserer Studie aber nicht ausreichend, um eine abschließende Bewertung zuzulassen. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um diese diagnostische Relevanz von AGR2 zu bestätigen.

Die Verfügbarkeit großer Subkollektive von Tumoren klinisch wichtiger und häufiger Tumorentitäten ermöglichte es uns zudem die prognostische Bedeutung von AGR2 in diversen Entitäten zu untersuchen. Insgesamt zeigten die Untersuchungen der Zusammenhänge zwischen der AGR2-Expression und histologischen oder klinischen Malignitätsparametern in zwölf verschiedenen Tumorentitäten, dass die potenzielle prognostische Rolle von AGR2 vom Tumortyp abhängig ist. In den meisten Tumoren, die sich von Normalgeweben ableiten, welche bereits eine hohe AGR2-Expression aufweisen, war eine verminderte Expression von AGR2 mit histopathologischen oder klinischen Parametern für eine erhöhte Tumoraggressivität, wie beispielsweise einem ungünstigen Malignitätsgrad oder einem fortgeschrittenen Tumorstadium, assoziiert. Zusammenhänge zwischen einer verminderten AGR2-Expression und ungünstigen Tumorparametern fanden sich in unserer Studie für kolorektale Adenokarzinome ($p=0.0275$), Mammakarzinome (NST) ($p=0.0049$) (Tabelle 8), endometroide Endometriumkarzinome ($p=0.0482$) (Tabelle 9) und für Urothelkarzinome - sowohl bei nicht-invasiven Karzinomen ($p=0.0003$), wie auch bei muskelinvasiven Karzinomen ($p=0.0066$) (Tabelle 13).

Unsere diesbezüglichen Befunde stimmen mit den Daten verschiedener früherer Studien überein. Assoziationen zwischen einer verminderten AGR2-Expression und einem ungünstigen Tumorphänotyp wurden bisher für das kolorektale Karzinom (Riener et al., 2014), das duktales Adenokarzinom des Pankreas (Mizuuchi et al., 2015), Prostatakarzinome (Ho et al., 2013), Ovarialkarzinome (Alves et al., 2018, Armes et al., 2013) und Adenokarzinome der Lunge (Chung et al., 2012) beschrieben. Allerdings hatten andere Forschungsgruppen diese Zusammenhänge beim Ovarialkarzinom (Darb-Esfahani et al., 2012) und Lungenkarzinom (Fritzsche et al., 2007) nicht bestätigen können. Andere Autoren fanden beim Lungenkarzinom (Ci and Wu, 2022), Ovarialkarzinom (Darb-Esfahani et al., 2012) und Adenokarzinom der Prostata (Zhang et al., 2007) sogar signifikante Assoziationen zwischen einer geringeren AGR2-Expression und günstigen Tumorparametern. Die Gründe für einen Zusammenhang zwischen einem AGR2-Verlust und der Tumorprogression sind nicht geklärt. Funktionelle Untersuchungen haben suggeriert, dass ein AGR2-Expressionsverlust zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Apoptose (Chanda et al., 2014) und einer verminderten zellulären Adhäsion (Chanda et al., 2014, Mizuuchi et al., 2015) führen könnte. Alternativ wäre es aber auch denkbar, dass eine verminderte AGR2-Expression in Tumoren, welche sich von Normalzellen ableiten die AGR2 exprimieren, lediglich eine Tumorzelledifferenzierung reflektieren, welche typischerweise die Tumorprogression begleitet. Im Rahmen der Entdifferenzierung von Tumorzellen verlieren die neoplastischen Zellen zunehmend die morphologischen Eigenschaften ihrer Ursprungszellen. Ebenso kann die Expression von physiologischerweise exprimierter Proteine zunehmend verloren gehen. Beispielsweise können entdifferenzierte Prostatakarzinome die Expression von PSA (Prostata-spezifisches Antigen) verlieren (Erbersdobler et al., 2009).

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer erhöhten AGR2-Expression und ungünstigen Tumorparametern fand sich in unseren Tumorproben bei lediglich einer Tumorentität. In klarzelligen Nierenzellkarzinomen (ccRCC) war der statistische Zusammenhang zwischen einer erhöhten AGR2-Expression mit einem ungünstigen Differenzierungsgrad und einem fortgeschrittenen Tumorstadium stark ausgeprägt (Tabelle 11). Unser Befund ist in Übereinstimmung mit den RNA-Daten des Cancer Genom Atlas (TCGA), welcher hinsichtlich der AGR2-Expression ebenfalls eine deutlich ungünstigere Prognose bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen beschreibt. Obwohl die Anzahl an positiven Fällen in dieser Tumorentität gering war (in unserer Kohorte 7.8%), könnte der Nachweis einer vermehrten AGR2-Expression auch klinische Relevanz erhalten, da bei einem hohen Progressionsrisiko dieser Tumorentität zunehmend adjuvante Chemotherapien eingesetzt werden. Somit ist beim klarzelligen Nierenzellkarzinom die Einschätzung der Patientenprognose für eine adäquate Therapieplanung bedeutsam. Die

Prognoseabschätzung, basierend auf morphologischen Parametern allein, ist trotz statistisch signifikanten Zusammenhängen zwischen pT, pN und Grad nicht ausreichend, da immer wieder auch Tumoren mit einem günstigen Phänotyp metastasieren und Tumoren mit aggressiv erscheinender Morphologie einen günstigen Verlauf aufweisen können. Andere Autoren hatten auch beim Mammakarzinom (Barraclough et al., 2009), Prostatakarzinom (Zhang et al., 2007), bei Plattenepithelkarzinomen aus dem Bereich der HNO (Sun et al., 2018) und bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (Takabatake et al., 2021) statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen einer vermehrten AGR2-Expression und einer ungünstigen Patientenprognose bzw. einem ungünstigen Tumorphänotyp gefunden.

Zahlreiche verschiedene Mechanismen wurden als mögliche Ursache für einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten AGR2-Expression und einer gesteigerten Tumoraggressivität vorgeschlagen. Dazu gehört ein stimulierender Effekt auf die Zellproliferation (Takabatake et al., 2021, Fessart et al., 2021, Arumugam et al., 2015), die Zellmigration (Arumugam et al., 2015, Zhang et al., 2021), die epithelial-mesenchymale Transition (Zhang et al., 2021), die Fähigkeit zum invasiven Tumorwachstum (Luu et al., 2020, Di Maro et al., 2014) und einer vermehrten Resistenz gegenüber zytostatischen Medikamenten (Arumugam et al., 2015). Verschiedene funktionelle Auswirkungen einer erhöhten AGR2-Expression in Tumoren wurden in der Literatur beschrieben. So wirkt AGR2 als p53-Inhibitor in MCF7-Zellen und als p21/CDKN1A-Inhibitor in Tumoren der Lunge, wodurch die Proliferationsrate der Tumorzellen gesteigert wird (Hrstka et al., 2016, Manousakis et al., 2023). Zudem kann AGR2 in kolorektalen Tumorzellen die Genexpression von SNAIL und SLUG erhöhen, was eine gesteigerte epithelial-mesenchymale Transition zur Folge hat (Zhang et al., 2021). Des Weiteren wird beschrieben, dass AGR2 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas mit C4.4A interagiert und dort Einfluss auf die Zellproliferation, Zellmigration, Invasion und Chemoresistenz hat (Arumugam et al., 2015). Zusätzlich interagiert die CXXS-Domäne von AGR2 mit dem VEGFA in Prostatakarzinomen, wodurch die VEGFR/VEGFR2-Signalkaskade aktiviert wird, was zur Angiogenese, vermehrter Invasivität und Metastasierung führt (Jia et al., 2018). Die exakten Funktionen von AGR2 in Tumoren sind noch nicht vollständig verstanden und es bedarf weiterer Studien, um die Mechanismen von AGR2 in Tumoren einzuordnen (Brychtova et al., 2011).

Trotz aller beschriebenen funktionellen Ergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, dass die AGR2-Neoexpression in Tumoren, welche von nicht-AGR2-exprimierenden Zellen abstammen, lediglich ein Zufallsereignis darstellt, das im Rahmen einer vermehrten Tumorzellendifferenzierung entsteht. Entdifferenzierte Tumorzellen können im Verlauf der zunehmenden Entfernung ihres Phänotyps von der Ausgangszelle Proteine exprimieren,

die in der Ursprungszelle nicht exprimiert werden. Ein Beispiel hierfür ist die Expression neuroendokriner Marker in stark entdifferenzierten Karzinomen der Prostata (Hu et al., 2015). Klinisch bekannt ist auch die Entwicklung sogenannter paraneoplastischer Syndrome durch die aberrante Expression von Hormonen durch Karzinomzellen (Pelosof and Gerber, 2010).

Die große Anzahl an untersuchten Tumoren ist ein besonderes Merkmal dieser Studie. Während in allen 30 früher durchgeführten Untersuchungen zur AGR2-Expression in Tumoren insgesamt lediglich 5830 Tumoren zur Untersuchung gelangten, wurden in unserer Studie 12,434 Tumoren erfolgreich untersucht. Damit wurde in einer einzigen Studie die Datenlage der Weltliteratur um 213.28% gesteigert. Ermöglicht wurde die umfangreiche Untersuchung mit Hilfe der Verwendung der Tissue-Microarray-Methode, in Kombination mit ausgiebigen Vorarbeiten durch die Mitarbeiter des Instituts für Pathologie und zahlreiche Forscher, einschließlich vieler früherer Doktoranden des Instituts für Pathologie. Nur durch die gemeinsame Aktion einer großen Zahl von Personen war es möglich, Studien im Umfang unseres Projektes durchzuführen. Angesichts der Kosten von mindestens 5 Euro zur Durchführung einer immunhistochemischen Färbung wäre unser Projekt finanziell kaum realisierbar gewesen. Die Kosten der Reagenzien für die Färbung unserer 12,434 Tumoren hätten einen Betrag von 62,170 Euro erfordert. Neben den ökonomischen Aspekten dürfte die maximale Standardisierung der wesentlichste Vorteil der Tissue-Microarray-Methode darstellen. Die Standardisierung ermöglicht nicht nur eine Färbung aller Tumoren mit identischen Reagenzien unter identischen Bedingungen (Parameter, welche auch in einem Färbeautomaten theoretisch standardisiert sind), sondern auch weitere Parameter, welche in konventionellen Großschnittstudien kaum zu standardisieren wären. Dazu gehören insbesondere das Schnittalter und die pro Tumor untersuchte Gewebemenge. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Intensitäten immunhistochemischer Färbungen von Schnitten bereits nach zwei bis vier Wochen Lagerung nach Herstellung markant abnehmen können (Kim et al., 2016, Economou et al., 2014, Mirlacher et al., 2004, Fergenbaum et al., 2004). Wegen des erheblichen Einflusses des Schnittalters auf die immunhistochemischen Färbeergebnisse werden am Institut für Pathologie des UKE Schnitte immer wenige Tage nach ihrer Herstellung gefärbt. Da die Untersuchung von 12,434 Tumoren im TMA-Format nur die Färbung von 47 Schnitten (Kosten: 235 Euro) bedingt, ist es ohne Weiteres möglich, dass eine MTA die Gesamtzahl der Schnitte an einem Tag herstellt und wiederum an einem folgenden Tag färbt. Eine derartige Standardisierung der Schnittlagerungszeit wäre bei der Herstellung von Großschnitten von 12,434 Tumoren äußerst schwierig. Die Tissue-Microarray-Methode wurde 1998 erstmals beschrieben (Kononen et al., 1998). In der Folge haben mehrere Autoren die Eignung des TMA-Verfahrens wegen eingeschränkter „Repräsentativität“ in

Frage gestellt, da pro Patient/Tumor nur eine geringe untersuchte Gewebemenge untersucht wird (Eckel-Passow et al., 2010, Camp et al., 2000, Hoos et al., 2001). Tatsächlich haben vereinzelte Studien gezeigt, dass die Verwendung von nur einer einzigen kleinen Gewebeprobe aus einem Tumorblock, verglichen mit der Verwendung entsprechender Großschnitte, zu einer geringeren Positivitätsrate führt (Kim et al., 2013, Coppola et al., 2012, Awadelkarim et al., 2013). Während diese Befunde eindeutig zeigen, dass die zu erwartende Positivitätsrate von der untersuchten Gewebemenge abhängt, muss allerdings festgehalten werden, dass die Verwendung von Großschnitten zwei erheblichen Problemen unterliegt. Erstens sind auch Großschnitte für die untersuchten Tumoren nicht repräsentativ. Beispielsweise würde ein 3x2 cm messender und 2.5µm tiefer Schnitt (untersuchtes Gewebivolumen: 1.5mm³) nur 0.000835% eines im Durchschnitt 7cm messenden Tumors (Tumolvolumen: 179,594mm³) ausmachen. Zweitens – und möglicherweise gravierender – enthalten Großschnitte keine standardisierte Gewebemenge. Die untersuchten Schnitte von Großschnittstudien enthalten teilweise nur wenige Tumorzellen, aber gelegentlich auch größere Tumormassen wie bei einem 3x2cm messenden Tumorareal. Die bei Großschnittuntersuchungen pro Patient evaluierte Tumormenge ist deswegen nie standardisiert, sodass Tumoren, von denen nur geringere Mengen untersucht werden, deutlich weniger oft positiv sein dürften als Tumoren, von denen größere Gewebemengen untersucht werden. Die einzige bisher durchgeführte Studie, in welcher Prognosemarker sowohl an Großschnitten als auch an TMAs der entsprechenden Tumorblöcke untersucht wurden, stammt von Torhorst et. al. (Torhorst et al., 2001). In diesem Projekt wurden mehr als 500 Mammakarzinome an TMAs und Großschnitten auf die Expression von Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor und p53 untersucht. Das bedeutsamste Ergebnis wurde für p53 erzielt. Vier unterschiedliche TMAs ergaben für p53 eine Positivität von jeweils ca. 20%. Die entsprechende Großschnittuntersuchung zeigte aber eine Positivität von mehr als 40%. Wären von dieser Tumorkohorte keine klinischen Verlaufsdaten vorhanden gewesen, wäre die logische Interpretation gewesen, dass TMAs nur ungenügend zur Detektion von p53-Alterationen in Mammakarzinomen geeignet sind. Da aber die am TMA ermittelten Daten für p53 hoch signifikant mit der Patientenprognose korrelierten und die Großschnittuntersuchung keine Korrelation der p53-Daten und Patientenprognose zeigte, mussten die Ergebnisse anders gedeutet werden (Torhorst et al., 2001). In dieser Studie scheint die Untersuchung von Großschnitten zur Erkennung von biologisch irrelevanten oder möglicherweise artifiziellen Färbungen geführt und dadurch die Aussagekraft vermindert zu haben. Die standardisierte Untersuchung von Gewebeproben eines Durchmessers von 0.6mm pro Patient eliminiert den Einfluss unterschiedlicher Gewebemengen und ist somit für die Evaluation von potenziellen Prognosemarkern bestens geeignet. Dementsprechend haben TMA-Studien

eine etablierte Prognoserelevanz für den Östrogenrezeptor, den Progesteronrezeptor, p53 und die Proliferationsaktivität bei Mammakarzinomen (Torhorst et al., 2001).

Eine weitere Stärke unseres Projektes ist die sorgfältige Validierung unseres Immunhistochemie-Assays. Die Validierung wurde gemäß der Empfehlungen der internationalen Arbeitsgruppe für Antikörpervalidierungen (Uhlen) vorgenommen. Der Vergleich unserer immunhistochemischen Färbungen an Normalgeweben mit einem zweiten unabhängigen Antikörper für AGR2 bestätigten unsere immunhistochemischen Färbeargebnisse (Abbildung 15-30). Die Durchführung dieser Validierungsexperimente an einer sehr breiten Palette verschiedener Normalgewebe (76 verschiedene Normalgewebekategorien) ist von besonderer Bedeutung. Die Untersuchung von praktisch allen Geweben eines adulten Menschen stellt weitgehend sicher, dass nahezu alle in diesen Geweben exprimierten Proteine unserem Assay unterzogen wurden. Dadurch konnten alle in relevanter Menge exprimierten Proteine auf mögliche Kreuzreaktivitäten unseres Studienantikörpers untersucht werden. Unsere Validierung belegt die hohe Spezifität unseres Assays. Die Untersuchung der Normalgewebe ergab eine AGR2-Immunfärbung in allen Organen, für welche zuvor eine RNA-Expression beschrieben worden war (Speicheldrüse, Magen, Duodenum, Dünndarm, Appendix, Kolon, Gallenblase, Harnblase, Lunge, Hypophyse, Nebenhoden, Prostata, Samenblase, Brust, Cervix uteri, Eileiter). In einigen Organen, für die früher keine AGR2-RNA-Expression beschrieben worden ist (wie im Endometrium, Pankreas, Niere, Plattenepithel der Tonsille, Haarfollikel, Hassall-Körperchen des Thymus), wurde die Expression durch die Färbung identischer Zelltypen mit einem zweiten Antikörper bestätigt. Wahrscheinlich waren die jeweils positiven Zellen in ihrer Anzahl zu gering, als dass eine RNA-Expressionsanalyse ganzer Organe zum Nachweis von AGR2-RNA hätte führen können. Insgesamt dokumentieren unsere Validierungsexperimente eine hohe Spezifität unseres Assays.

Zusammengefasst ergeben die Daten unserer Studie einen umfassenden Überblick über die AGR2-Expression in verschiedenen Tumorentitäten und identifizieren die AGR2-Immunhistochemie als eine potenziell diagnostisch relevante Prozedur für die Identifikation von Schilddrüsenneoplasien. Darüber hinaus ergeben sich Hinweise für eine mögliche prognostische Bedeutung der AGR2-Expression in verschiedenen Tumortypen.

5. Zusammenfassung

Anterior Gradient 2 (AGR2) ist ein Protein, das im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und eine Rolle in der Embryonalentwicklung, Mukusproduktion, Geweberegeneration und Wundheilung spielt. Um die Häufigkeit der Expression und die klinische Bedeutung von AGR2 in menschlichen Tumoren zu bestimmen, wurde eine Studie im Tissue-Microarray-Format durchgeführt, welche eine große Anzahl an Tumoren beinhaltete. Insgesamt wurden 14,966 Tumoren von 134 verschiedenen Tumortypen und -subtypen, sowie 608 Normalgewebeproben von 76 verschiedenen Normalgewebstypen immunhistochemisch gefärbt und analysiert. Eine positive AGR2-Immunfärbung konnte in 103 der 134 verschiedenen Tumorkategorien detektiert werden, wobei sich in 83 Tumorkategorien mindestens ein Fall mit einer stark positiven Immunfärbung fand. Eine AGR2-Expression wurde am häufigsten ermittelt im weiblichen Genitaltrakt, insbesondere Adenokarzinome (bis zu 100%), verschiedene Subtypen von Brustkrebs (57.1-100%), Urothelkarzinome (74.6-100%), Adenokarzinome des oberen und unteren Gastrointestinaltraktes (93.6-99.6%) sowie Tumoren des biliären Systems und des Pankreas (65.2-98.2%). Eine etwas schwächere AGR2-Immunfärbung fand sich in Plattenepithelkarzinomen (46.4-77.3%) und war meist abwesend in mesenchymalen und lymphoiden Tumoren. Während im normalen Schilddrüsengewebe eine AGR2-Immunfärbung meist fehlte, sind in Neoplasien der Schilddrüse moderate bis starke Färbungen registriert worden. Unsere Ergebnisse zeigten eine Immunfärbung der Adenome (46%), der follikulären Karzinome (52.8%) und der papillären Karzinome (81.8%). Eine hohe AGR2-Expression korrelierte stark mit einem ungünstigen ISUP-Grad ($p=0.0013$), einem ungünstigen Fuhrman-Grad ($p<0.0001$) und einem ungünstigen Thoenes-Grad ($p<0.0001$) sowie einem fortgeschrittenen Tumorstadium ($p=0.0035$) in klarzelligem Nierenzellkarzinomen (ccRCC). Eine niedrige AGR2-Expression war assoziiert mit einem hohen BRE-Grad in Mammakarzinomen ($p=0.0049$), dem Nodalstatus ($p=0.0275$) und RAS-Mutationen ($p=0.0136$) in kolorektalen Karzinomen, einem positiven Nodalstatus ($p=0.0482$) in endometroiden Endometriumkarzinomen, einem ungünstigen Differenzierungsgrad nicht-invasiver ($p=0.0003$) und invasiver Urothelkarzinome ($p<0.0001$). Die AGR2-Expression hatte keinen Zusammenhang mit Parametern der Tumoraggressivität in Tumoren des Pankreas, des Ovars, der Schilddrüse und papillären Nierenzellkarzinomen. Allerdings neigten Tumoren mit niedriger AGR2-Expression häufiger dazu ungünstige Tumormerkmale aufzuweisen. Zusammengefasst ist AGR2 in vielen verschiedenen Tumorentitäten exprimiert und könnte in der Immunhistochemie als diagnostischer Marker zur Identifikation von Schilddrüsenneoplasien sowie als prognostischer Marker für verschiedene Tumorentitäten Anwendung finden.

6. English Summary

Anterior gradient 2 (AGR2), is a resident endoplasmic reticulum (ER) protein with a vital role in embryonal development, mucus maturation, tissue regeneration, and wound healing. To determine the prevalence and clinical significance of AGR2 expression in cancer, a tissue microarray containing 14,966 tumors from 134 different tumor types and subtypes as well as 608 samples of 76 different normal tissue types was analyzed by immunohistochemistry (IHC). AGR2 positivity was found in 103 of 134 tumor categories, and 83 tumor categories contained at least one strongly positive case. AGR2 expression was most frequently seen in tumors of the female genital tract, particularly adenocarcinomas (up to 100%), various breast cancer subtypes (57.1-100%), urothelial carcinoma (74.6-100%), adenocarcinomas of the upper and lower gastrointestinal tract (93.6-99.6%), and pancreaticobiliary cancers (65.2%-98.2%). AGR2 positivity was slightly less common in squamous cell carcinomas (46.4-77.3%) and mainly absent in mesenchymal and lymphoid tumors. While AGR2 expression was only weak or absent in the normal thyroid, it was moderate to strong in 46% of adenomas, 52.8% of follicular carcinomas, and 81.8% of papillary carcinomas of the thyroid. High AGR2 expression was strongly linked to poor ISUP ($p < 0.0001$), Fuhrman ($p < 0.0001$), and Thoenes ($p < 0.0001$) grades as well as advanced pT stage ($p = 0.0035$) in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). Low AGR2 expression was associated with high BRE grade in breast cancer ($p = 0.0049$), nodal metastasis ($p = 0.0275$) and RAS mutation ($p = 0.0136$) in colorectal cancer, nodal metastasis ($p = 0.0482$) in endometrioid endometrial carcinoma, high grade in non-invasive urothelial carcinoma ($p = 0.0003$), and invasive tumor growth in urothelial carcinoma ($p < 0.0001$). AGR2 immunostaining was unrelated to parameters of tumor aggressiveness in pancreatic, ovarian and thyroidal cancer as well as papillary renal cell carcinoma although tumors with lower AGR2 expression often tended to exhibit more unfavorable tumor features. It is concluded that AGR2 expression occurs in a broad range of different tumor entities and that AGR2 assessment may serve as a diagnostic aid for the distinction of thyroidal neoplasms and as a prognostic marker in various cancer types.

7. Abkürzungsverzeichnis

A. dest: Aqua destillata

AS: Aminosäure

ATF6 α : Activating Transcription Factor 6

ccRCC: Klarzelliges Nierenzellkarzinom

C4.4A: LY6/PLAUR domain containing 3

DAB-Chromogen: 3,3Diaminobenzidin-Chromogen

DUSP10: Dual Specificity Protein Phosphatase 10

eAGR2: Extrazelluläres AGR2

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

ER: Endoplasmatisches Retikulum

ERAD: ER-assoziierte Proteindegradierung

ERQC: ER quality control

HE: Hämatoxylin-Eosin

HRP: Horse Radish Peroxidase

iAGR2: Intrazelluläres AGR2

IBD: Inflammatory Bowel Disease

IHC: Immunhistochemie

IRE1 α : Inositol-requiring Enzyme 1

K14: Proliferationsmarker für Keratinozyten

Mdm2: Mouse double minute 2 homolog

MTA: Medizinisch Technische Assistenz

PDI: Protein-Disulfid-Isomerase

PSA: Prostataspezifisches Antigen

p21/CDKN1A: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A

p38 MAPK: p38-mitogenaktivierte Proteinkinase

SNAIL: Snail Family Transcriptional Repressor 1

SLUG: Snail Family Transcriptional Repressor 2

TMA: Tissue-Microarray

TEC-Puffer: Tris-EDTA-Citrat-Puffer

UKE: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

VEGFA: Vascular Endothelial Growth Factor A

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1

VEGFR2: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

YAP1: Yes Associated Protein 1

8. Literaturverzeichnis

- ALVES, M. R., NC, E. M., BARROS-FILHO, M. C., DO AMARAL, N. S., SILVA, F. I. B., BAIOCCHI NETO, G., SOARES, F. A., DE BROT ANDRADE, L. & ROCHA, R. M. 2018. Downregulation of AGR2, p21, and cyclin D and alterations in p53 function were associated with tumor progression and chemotherapy resistance in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Med*, 7, 3188-3199.
- ARMES, J. E., DAVIES, C. M., WALLACE, S., TAHERI, T., PERRIN, L. C. & AUTELITANO, D. J. 2013. AGR2 expression in ovarian tumours: a potential biomarker for endometrioid and mucinous differentiation. *Pathology*, 45, 49-54.
- ARUMUGAM, T., DENG, D., BOVER, L., WANG, H., LOGSDON, C. D. & RAMACHANDRAN, V. 2015. New Blocking Antibodies against Novel AGR2-C4.4A Pathway Reduce Growth and Metastasis of Pancreatic Tumors and Increase Survival in Mice. *Mol Cancer Ther*, 14, 941-51.
- AWADELKARIM, K. D., ARIZZI, C., ELAMIN, E. O., OSMAN, I., MEKKI, S. O., BIUNNO, I., BARBERIS, M. C. & MARIANI-COSTANTINI, R. 2013. Tissue microarray (TMA) versus whole section immunohistochemistry in the assessment of ER/PR and Her-2/neu status in a breast cancer series from Sudan. *Breast J*, 19, 446-7.
- BARRACLOUGH, D. L., PLATT-HIGGINS, A., DE SILVA RUDLAND, S., BARRACLOUGH, R., WINSTANLEY, J., WEST, C. R. & RUDLAND, P. S. 2009. The metastasis-associated anterior gradient 2 protein is correlated with poor survival of breast cancer patients. *Am J Pathol*, 175, 1848-57.
- BRYCHTOVA, V., VOJTESEK, B. & HRSTKA, R. 2011. Anterior gradient 2: a novel player in tumor cell biology. *Cancer Lett*, 304, 1-7.
- BU, H., BORMANN, S., SCHAFER, G., HORNINGER, W., MASSONER, P., NEEB, A., LAKSHMANAN, V. K., MADDALO, D., NESTL, A., SULTMANN, H., CATO, A. C. & KLOCKER, H. 2011. The anterior gradient 2 (AGR2) gene is overexpressed in prostate cancer and may be useful as a urine sediment marker for prostate cancer detection. *Prostate*, 71, 575-87.
- CAMP, R. L., CHARETTE, L. A. & RIMM, D. L. 2000. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*, 80, 1943-9.
- CAP, J., RYSKA, A., REHORKOVA, P., HOVORKOVA, E., KEREKES, Z. & POHNETALOVA, D. 1999. Sensitivity and specificity of the fine needle aspiration biopsy of the thyroid: clinical point of view. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 51, 509-15.
- CHANDA, D., LEE, J. H., SAWANT, A., HENSEL, J. A., ISAYEVA, T., REILLY, S. D., SIEGAL, G. P., SMITH, C., GRIZZLE, W., SINGH, R. & PONNAZHAGAN, S. 2014. Anterior gradient protein-2 is a regulator of cellular adhesion in prostate cancer. *PLoS One*, 9, e89940.
- CHEN, X., CHO, D. B. & YANG, P. C. 2010. Double staining immunohistochemistry. *N Am J Med Sci*, 2, 241-5.
- CHEVET, E., CAMERON, P. H., PELLETIER, M. F., THOMAS, D. Y. & BERGERON, J. J. 2001. The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation. *Curr Opin Struct Biol*, 11, 120-4.
- CHI, V. & CHANDY, K. G. 2007. Immunohistochemistry: paraffin sections using the Vectastain ABC kit from vector labs. *J Vis Exp*, 308.
- CHUNG, K., NISHIYAMA, N., WANIBUCHI, H., YAMANO, S., HANADA, S., WEI, M., SUEHIRO, S. & KAKEHASHI, A. 2012. AGR2 as a potential biomarker of human lung adenocarcinoma. *Osaka City Med J*, 58, 13-24.

- CI, H. & WU, L. 2022. Expression of KAI1 and AGR2 in lung adenocarcinoma and their clinicopathological significance. *Medicine (Baltimore)*, 101, e32498.
- COPPOLA, D., NICOSIA, S. V., DOTY, A., SELLERS, T. A., LEE, J. H., FULP, J., THOMPSON, Z., GALEB, S., MCLAUGHLIN, J., NAROD, S. A., SCHILDKRAUT, J. & PAL, T. 2012. Uncertainty in the utility of immunohistochemistry in mismatch repair protein expression in epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res*, 32, 4963-9.
- DARB-ESFAHANI, S., FRITZSCHE, F., KRISTIANSEN, G., WEICHERT, W., SEHOULI, J., BRAICU, I., DIETEL, M. & DENKERT, C. 2012. Anterior gradient protein 2 (AGR2) is an independent prognostic factor in ovarian high-grade serous carcinoma. *Virchows Arch*, 461, 109-16.
- DELOM, F., MOHTAR, M. A., HUPP, T. & FESSART, D. 2020. The anterior gradient-2 interactome. *Am J Physiol Cell Physiol*, 318, C40-C47.
- DI MARO, G., SALERNO, P., UNGER, K., ORLANDELLA, F. M., MONACO, M., CHIAPPETTA, G., THOMAS, G., OCZKO-WOJCIECHOWSKA, M., MASULLO, M., JARZAB, B., SANTORO, M. & SALVATORE, G. 2014. Anterior gradient protein 2 promotes survival, migration and invasion of papillary thyroid carcinoma cells. *Mol Cancer*, 13, 160.
- DIMAIO, M. A., KWOK, S., MONTGOMERY, K. D., LOWE, A. W. & PAI, R. K. 2012. Immunohistochemical panel for distinguishing esophageal adenocarcinoma from squamous cell carcinoma: a combination of p63, cytokeratin 5/6, MUC5AC, and anterior gradient homolog 2 allows optimal subtyping. *Hum Pathol*, 43, 1799-807.
- DONG, A., WODZIAK, D. & LOWE, A. W. 2015. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling requires a specific endoplasmic reticulum thioredoxin for the post-translational control of receptor presentation to the cell surface. *J Biol Chem*, 290, 8016-27.
- DURAN, M. C., VEGA, F., MORENO-BUENO, G., ARTIGA, M. J., SANCHEZ, L., PALACIOS, J., RIDLEY, A. & TIMMS, J. F. 2008. Characterisation of tumoral markers correlated with ErbB2 (HER2/Neu) overexpression and metastasis in breast cancer. *Proteomics Clin Appl*, 2, 1313-26.
- ECKEL-PASSOW, J. E., LOHSE, C. M., SHEININ, Y., CRISPEN, P. L., KRCO, C. J. & KWON, E. D. 2010. Tissue microarrays: one size does not fit all. *Diagn Pathol*, 5, 48.
- ECONOMOU, M., SCHONI, L., HAMMER, C., GALVAN, J. A., MUELLER, D. E. & ZLOBEC, I. 2014. Proper paraffin slide storage is crucial for translational research projects involving immunohistochemistry stains. *Clin Transl Med*, 3, 4.
- ELISEI, R., BOTTICI, V., LUCHETTI, F., DI COSCIO, G., ROMEI, C., GRASSO, L., MICCOLI, P., IACCONI, P., BASOLO, F., PINCHERA, A. & PACINI, F. 2004. Impact of routine measurement of serum calcitonin on the diagnosis and outcome of medullary thyroid cancer: experience in 10,864 patients with nodular thyroid disorders. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 163-8.
- ERBERSDOBLER, A., ISBARN, H., STEINER, I., SCHLOMM, T., CHUN, F., MIRLACHER, M. & SAUTER, G. 2009. Predictive value of prostate-specific antigen expression in prostate cancer: a tissue microarray study. *Urology*, 74, 1169-73.
- FERGENBAUM, J. H., GARCIA-CLOSAS, M., HEWITT, S. M., LISSOWSKA, J., SAKODA, L. C. & SHERMAN, M. E. 2004. Loss of antigenicity in stored sections of breast cancer tissue microarrays. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13, 667-72.
- FESSART, D., DE BARBEYRAC, C., BOUTIN, I., GRENIER, T., RICHARD, E., BEGUERET, H., BERNARD, D., CHEVET, E., ROBERT, J. & DELOM, F. 2021. Extracellular AGR2 triggers lung tumour cell proliferation through repression of p21(CIP1). *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1868, 118920.

- FRITZSCHE, F. R., DAHL, E., DANKOF, A., BURKHARDT, M., PAHL, S., PETERSEN, I., DIETEL, M. & KRISTIANSEN, G. 2007. Expression of AGR2 in non small cell lung cancer. *Histol Histopathol*, 22, 703-8.
- FRITZSCHE, F. R., DAHL, E., PAHL, S., BURKHARDT, M., LUO, J., MAYORDOMO, E., GANSUKH, T., DANKOF, A., KNUECHEL, R., DENKERT, C., WINZER, K. J., DIETEL, M. & KRISTIANSEN, G. 2006. Prognostic relevance of AGR2 expression in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 12, 1728-34.
- GALLIGAN, J. J. & PETERSEN, D. R. 2012. The human protein disulfide isomerase gene family. *Hum Genomics*, 6, 6.
- GUO, J., GONG, G. & ZHANG, B. 2017. Identification and prognostic value of anterior gradient protein 2 expression in breast cancer based on tissue microarray. *Tumour Biol*, 39, 1010428317713392.
- GUPTA, A., DONG, A. & LOWE, A. W. 2012. AGR2 gene function requires a unique endoplasmic reticulum localization motif. *J Biol Chem*, 287, 4773-82.
- HAJMANOOCHERI, F. & RABIEE, E. 2015. FNAC accuracy in diagnosis of thyroid neoplasms considering all diagnostic categories of the Bethesda reporting system: A single-institute experience. *J Cytol*, 32, 238-43.
- HIGA, A., MULOT, A., DELOM, F., BOUCHECAREILH, M., NGUYEN, D. T., BOISMENU, D., WISE, M. J. & CHEVET, E. 2011. Role of pro-oncogenic protein disulfide isomerase (PDI) family member anterior gradient 2 (AGR2) in the control of endoplasmic reticulum homeostasis. *J Biol Chem*, 286, 44855-68.
- HO, M. E., QUEK, S. I., TRUE, L. D., MORRISSEY, C., COREY, E., VESSELLA, R. L., DUMPIT, R., NELSON, P. S., MARESH, E. L., MAH, V., ALAVI, M., KIM, S. R., BAGRYANOVA, L., HORVATH, S., CHIA, D., GOODGLICK, L. & LIU, A. Y. 2013. Prostate cancer cell phenotypes based on AGR2 and CD10 expression. *Mod Pathol*, 26, 849-59.
- HOOS, A., URIST, M. J., STOJADINOVIC, A., MASTORIDES, S., DUDAS, M. E., LEUNG, D. H., KUO, D., BRENNAN, M. F., LEWIS, J. J. & CORDON-CARDO, C. 2001. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol*, 158, 1245-51.
- HRSTKA, R., BOUCHALOVA, P., MICHALOVA, E., MATOULKOVA, E., MULLER, P., COATES, P. J. & VOJTESEK, B. 2016. AGR2 oncoprotein inhibits p38 MAPK and p53 activation through a DUSP10-mediated regulatory pathway. *Mol Oncol*, 10, 652-62.
- HU, C. D., CHOO, R. & HUANG, J. 2015. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: a mechanism of radioresistance and treatment failure. *Front Oncol*, 5, 90.
- HUSSAINI, H. M., SEO, B. & RICH, A. M. 2023. Immunohistochemistry and Immunofluorescence. *Methods Mol Biol*, 2588, 439-450.
- IM, K., MARENINOV, S., DIAZ, M. F. P. & YONG, W. H. 2019. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol*, 1897, 299-311.
- INNES, H. E., LIU, D., BARRACLOUGH, R., DAVIES, M. P., O'NEILL, P. A., PLATT-HIGGINS, A., DE SILVA RUDLAND, S., SIBSON, D. R. & RUDLAND, P. S. 2006. Significance of the metastasis-inducing protein AGR2 for outcome in hormonally treated breast cancer patients. *Br J Cancer*, 94, 1057-65.
- IVANOVA, A. S., TERESHINA, M. B., ERMAKOVA, G. V., BELOUSOV, V. V. & ZARAIISKY, A. G. 2013. Agr genes, missing in amniotes, are involved in the body appendages regeneration in frog tadpoles. *Sci Rep*, 3, 1279.
- JACH, D., CHENG, Y., PRICA, F., DUMARTIN, L. & CRNOGORAC-JURCEVIC, T. 2021. From development to cancer - an ever-increasing role of AGR2. *Am J Cancer Res*, 11, 5249-5262.

- JANARDHAN, K. S., JENSEN, H., CLAYTON, N. P. & HERBERT, R. A. 2018. Immunohistochemistry in Investigative and Toxicologic Pathology. *Toxicol Pathol*, 46, 488-510.
- JAWHAR, N. M. 2009. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Ann Saudi Med*, 29, 123-7.
- JIA, M., GUO, Y., ZHU, D., ZHANG, N., LI, L., JIANG, J., DONG, Y., XU, Q., ZHANG, X., WANG, M., YU, H., WANG, F., TIAN, K., ZHANG, J., YOUNG, C. Y. F., LOU, H. & YUAN, H. 2018. Pro-metastatic activity of AGR2 interrupts angiogenesis target bevacizumab efficiency via direct interaction with VEGFA and activation of NF-kappaB pathway. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1864, 1622-1633.
- KASER, A., ADOLPH, T. E. & BLUMBERG, R. S. 2013. The unfolded protein response and gastrointestinal disease. *Semin Immunopathol*, 35, 307-19.
- KIM, H. S., KIM, M. A., HODGSON, D., HARBRON, C., WELLINGS, R., O'CONNOR, M. J., WOMACK, C., YIN, X., BANG, Y. J., IM, S. A., LEE, B. L. & KIM, W. H. 2013. Concordance of ATM (ataxia telangiectasia mutated) immunohistochemistry between biopsy or metastatic tumor samples and primary tumors in gastric cancer patients. *Pathobiology*, 80, 127-37.
- KIM, S. W., ROH, J. & PARK, C. S. 2016. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *J Pathol Transl Med*, 50, 411-418.
- KONONEN, J., BUBENDORF, L., KALLIONIEMI, A., BARLUND, M., SCHRAML, P., LEIGHTON, S., TORHORST, J., MIHATSCH, M. J., SAUTER, G. & KALLIONIEMI, O. P. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4, 844-7.
- KOSYKH, A. V., TERESHINA, M. B. & GURSKAYA, N. G. 2023. Potential Role of AGR2 for Mammalian Skin Wound Healing. *Int J Mol Sci*, 24.
- KRISTIANSEN, G., PILARSKY, C., WISSMANN, C., KAISER, S., BRUEMMENDORF, T., ROEPCKE, S., DAHL, E., HINZMANN, B., SPECHT, T., PERVAN, J., STEPHAN, C., LOENING, S., DIETEL, M. & ROSENTHAL, A. 2005. Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *J Pathol*, 205, 359-76.
- LEPREUX, S., BIOULAC-SAGE, P. & CHEVET, E. 2011. Differential expression of the anterior gradient protein-2 is a conserved feature during morphogenesis and carcinogenesis of the biliary tree. *Liver Int*, 31, 322-8.
- LILYQUIST, J., WHITE, K. A. M., LEE, R. J., PHILIPS, G. K., HUGHES, C. R. & TORRES, S. M. 2017. Quantitative Analysis of Immunohistochemistry in Melanoma Tumors. *Medicine (Baltimore)*, 96, e6432.
- LIU, Q. G., LI, Y. J. & YAO, L. 2018. Knockdown of AGR2 induces cell apoptosis and reduces chemotherapy resistance of pancreatic cancer cells with the involvement of ERK/AKT axis. *Pancreatology*, 18, 678-688.
- LUU, T. T., BACH, D. H., KIM, D., HU, R., PARK, H. J. & LEE, S. K. 2020. Overexpression of AGR2 Is Associated With Drug Resistance in Mutant Non-small Cell Lung Cancers. *Anticancer Res*, 40, 1855-1866.
- MAGAKI, S., HOJAT, S. A., WEI, B., SO, A. & YONG, W. H. 2019. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*, 1897, 289-298.
- MANOUSAKIS, E., MIRALLES, C. M., ESQUERDA, M. G. & WRIGHT, R. H. G. 2023. CDKN1A/p21 in Breast Cancer: Part of the Problem, or Part of the Solution? *Int J Mol Sci*, 24.

- MAUREL, M., OBACZ, J., AVRIL, T., DING, Y. P., PAPADODIMA, O., TRETON, X., DANIEL, F., PILALIS, E., HORBERG, J., HOU, W., BEAUCHAMP, M. C., TOURNEUR-MARSILLE, J., CAZALS-HATEM, D., SOMMEROVA, L., SAMALI, A., TAVERNIER, J., HRSTKA, R., DUPONT, A., FESSART, D., DELOM, F., FERNANDEZ-ZAPICO, M. E., JANSEN, G., ERIKSSON, L. A., THOMAS, D. Y., JEROME-MAJEWSKA, L., HUPP, T., CHATZIOANNOU, A., CHEVET, E. & OGIER-DENIS, E. 2019. Control of anterior GRadiant 2 (AGR2) dimerization links endoplasmic reticulum proteostasis to inflammation. *EMBO Mol Med*, 11.
- MIRLACHER, M., KASPER, M., STORZ, M., KNECHT, Y., DURMULLER, U., SIMON, R., MIHATSCH, M. J. & SAUTER, G. 2004. Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. *Mod Pathol*, 17, 1414-20.
- MIZUUCHI, Y., AISHIMA, S., OHUCHIDA, K., SHINDO, K., FUJINO, M., HATTORI, M., MIYAZAKI, T., MIZUMOTO, K., TANAKA, M. & ODA, Y. 2015. Anterior gradient 2 downregulation in a subset of pancreatic ductal adenocarcinoma is a prognostic factor indicative of epithelial-mesenchymal transition. *Lab Invest*, 95, 193-206.
- MOIDU, N. A., NS, A. R., SYAFRUDDIN, S. E., LOW, T. Y. & MOHTAR, M. A. 2020. Secretion of pro-oncogenic AGR2 protein in cancer. *Heliyon*, 6, e05000.
- MUSANI, M. A., KHAN, F. A., MALIK, S. & KHAMBATY, Y. 2011. Fine needle aspiration cytology: sensitivity and specificity in thyroid lesions. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 23, 34-6.
- NISHIMON, R., YOSHIDA, K., SANUKI, F., NAKASHIMA, Y., MIYAKE, T., SATO, T., TOMIYAMA, Y., NISHINA, S., MORIYA, T., SHIOTANI, A. & HINO, K. 2023. Pancreatic ductal adenocarcinoma with acinar-to-ductal metaplasia-like cancer cells shows increased cellular proliferation. *Pancreatology*, 23, 811-817.
- OBI, E. N., TELLOCK, D. A., THOMAS, G. J. & VEENSTRA, T. D. 2023. Biomarker Analysis of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Clinical Tissues Using Proteomics. *Biomolecules*, 13.
- PARK, K., CHUNG, Y. J., SO, H., KIM, K., PARK, J., OH, M., JO, M., CHOI, K., LEE, E. J., CHOI, Y. L., SONG, S. Y., BAE, D. S., KIM, B. G. & LEE, J. H. 2011. AGR2, a mucinous ovarian cancer marker, promotes cell proliferation and migration. *Exp Mol Med*, 43, 91-100.
- PARK, S. W., ZHEN, G., VERHAEGHE, C., NAKAGAMI, Y., NGUYENVU, L. T., BARCZAK, A. J., KILLEEN, N. & ERLE, D. J. 2009. The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 6950-5.
- PATEL, P., CLARKE, C., BARRACLOUGH, D. L., JOWITT, T. A., RUDLAND, P. S., BARRACLOUGH, R. & LIAN, L. Y. 2013. Metastasis-promoting anterior gradient 2 protein has a dimeric thioredoxin fold structure and a role in cell adhesion. *J Mol Biol*, 425, 929-43.
- PELOSO, L. C. & GERBER, D. E. 2010. Paraneoplastic syndromes: an approach to diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*, 85, 838-54.
- PIZZI, M., FASSAN, M., BALISTRERI, M., GALLIGIONI, A., REA, F. & RUGGE, M. 2012a. Anterior gradient 2 overexpression in lung adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 20, 31-6.
- PIZZI, M., FASSAN, M., REALDON, S., BALISTRERI, M., BATTAGLIA, G., GIACOMETTI, C., ZANINOTTO, G., ZAGONEL, V., DE BONI, M. & RUGGE, M. 2012b. Anterior gradient 2 profiling in Barrett columnar epithelia and adenocarcinoma. *Hum Pathol*, 43, 1839-44.

Protein Data Bank, November 2024

<https://www.rcsb.org/structure/2Ins>

- RAMACHANDRAN, V., ARUMUGAM, T., WANG, H. & LOGSDON, C. D. 2008. Anterior gradient 2 is expressed and secreted during the development of pancreatic cancer and promotes cancer cell survival. *Cancer Res*, 68, 7811-8.
- RAMOS-VARA, J. A. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 42, 405-26.
- RIENER, M. O., PILARSKY, C., GERHARDT, J., GRUTZMANN, R., FRITZSCHE, F. R., BAHRA, M., WEICHERT, W. & KRISTIANSEN, G. 2009. Prognostic significance of AGR2 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Histol Histopathol*, 24, 1121-8.
- RIENER, M. O., THIESLER, T., HELLERBRAND, C., AMANN, T., CATHOMAS, G., FRITZSCHE, F. R., DAHL, E., BAHRA, M., WEICHERT, W., TERRACCIANO, L. & KRISTIANSEN, G. 2014. Loss of anterior gradient-2 expression is an independent prognostic factor in colorectal carcinomas. *Eur J Cancer*, 50, 1722-1730.
- RODRIGUEZ-BLANCO, G., ZENEYEDPOUR, L., DUIJVESZ, D., HOOGLAND, A. M., VERHOEF, E. I., KWELDAM, C. F., BURGERS, P. C., SMITT, P. S., BANGMA, C. H., JENSTER, G., VAN LEENDERS, G., DEKKER, L. J. M. & LUIDER, T. M. 2018. Tissue proteomics outlines AGR2 AND LOX5 as markers for biochemical recurrence of prostate cancer. *Oncotarget*, 9, 36444-36456.
- SALMANS, M. L., ZHAO, F. & ANDERSEN, B. 2013. The estrogen-regulated anterior gradient 2 (AGR2) protein in breast cancer: a potential drug target and biomarker. *Breast Cancer Res*, 15, 204.
- SCHACHT, V. & KERN, J. S. 2015. Basics of immunohistochemistry. *J Invest Dermatol*, 135, 1-4.
- SERNA DE LA SARAVIA, C., CUELLAR, F., SARAVIO DAY, E. & HARACH, H. R. 2006. Accuracy of aspiration cytology in thyroid cancer: a study in 1 institution. *Acta Cytol*, 50, 384-7.
- SINNA, E. A. & EZZAT, N. 2012. Diagnostic accuracy of fine needle aspiration cytology in thyroid lesions. *J Egypt Natl Canc Inst*, 24, 63-70.
- SUKSWAI, N. & KHOURY, J. D. 2019. Immunohistochemistry Innovations for Diagnosis and Tissue-Based Biomarker Detection. *Curr Hematol Malig Rep*, 14, 368-375.
- SUN, B., CHENG, Z. & SUN, J. 2018. Associations of MACC1, AGR2, and KAI1 expression with the metastasis and prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 11, 822-830.
- TAKABATAKE, K., KONISHI, H., ARITA, T., KATAOKA, S., SHIBAMOTO, J., FURUKE, H., TAKAKI, W., SHODA, K., SHIMIZU, H., YAMAMOTO, Y., KOMATSU, S., SHIOZAKI, A., FUJIWARA, H., OKAMOTO, K. & OTSUJI, E. 2021. Anterior gradient 2 regulates cancer progression in TP53-wild-type esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 46.
- The Human Protein Atlas; RNA Expression Overview; November 2024
https://www.proteinatlas.org/ENSG00000106541-AGR2/tissue#rna_expression
- THOMPSON, D. A. & WEIGEL, R. J. 1998. hAG-2, the human homologue of the *Xenopus laevis* cement gland gene XAG-2, is coexpressed with estrogen receptor in breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 251, 111-6.
- TORHORST, J., BUCHER, C., KONONEN, J., HAAS, P., ZUBER, M., KOCHLI, O. R., MROSS, F., DIETERICH, H., MOCH, H., MIHATSCH, M., KALLIONIEMI, O. P. & SAUTER, G. 2001. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*, 159, 2249-56.

- TRIMBOLI, P., TREGLIA, G., GUIDOBALDI, L., ROMANELLI, F., NIGRI, G., VALABREGA, S., SADEGHI, R., CRESCENZI, A., FAQUIN, W. C., BONGIOVANNI, M. & GIOVANELLA, L. 2015. Detection rate of FNA cytology in medullary thyroid carcinoma: a meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 82, 280-5.
- VINCENZ-DONNELLY, L. & HIPPEL, M. S. 2017. The endoplasmic reticulum: A hub of protein quality control in health and disease. *Free Radic Biol Med*, 108, 383-393.
- WAMBACH, M., MONTANI, M., RUNZ, J., STEPHAN, C., JUNG, K., MOCH, H., EBERLI, D., BERNHARDT, M., HOMMERDING, O., KREFT, T., CRONAUER, M. V., KREMER, A., MAYR, T., HAUSER, S. & KRISTIANSEN, G. 2024. Clinical implications of AGR2 in primary prostate cancer: Results from a large-scale study. *APMIS*, 132, 256-266.
- WODZIAK, D., DONG, A., BASIN, M. F. & LOWE, A. W. 2016. Anterior Gradient 2 (AGR2) Induced Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling Is Essential for Murine Pancreatitis-Associated Tissue Regeneration. *PLoS One*, 11, e0164968.
- ZHANG, H., CHI, J., HU, J., JI, T., LUO, Z., ZHOU, C., HUANG, L., DAI, Z., LI, J., WANG, G., WANG, L. & WANG, Z. 2021. Intracellular AGR2 transduces PGE2 stimuli to promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis of colorectal cancer. *Cancer Lett*, 518, 180-195.
- ZHANG, J., JIN, Y., XU, S., ZHENG, J., ZHANG, Q. I., WANG, Y., CHEN, J., HUANG, Y., HE, X. & ZHAO, Z. 2016. AGR2 is associated with gastric cancer progression and poor survival. *Oncol Lett*, 11, 2075-2083.
- ZHANG, K., LI, Y., KONG, X., LEI, C., YANG, H., WANG, N., WANG, Z., CHANG, H. & XUAN, L. 2023. AGR2: a secreted protein worthy of attention in diagnosis and treatment of breast cancer. *Front Oncol*, 13, 1195885.
- ZHANG, Y., FOROOTAN, S. S., LIU, D., BARRACLOUGH, R., FOSTER, C. S., RUDLAND, P. S. & KE, Y. 2007. Increased expression of anterior gradient-2 is significantly associated with poor survival of prostate cancer patients. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 10, 293-300.
- ZHANG, Y. Z. & LI, Y. Y. 2014. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 20, 91-9.
- ZHAO, F., EDWARDS, R., DIZON, D., AFRASIABI, K., MASTROIANNI, J. R., GEYFMAN, M., OUELLETTE, A. J., ANDERSEN, B. & LIPKIN, S. M. 2010. Disruption of Paneth and goblet cell homeostasis and increased endoplasmic reticulum stress in *Agr2*^{-/-} mice. *Dev Biol*, 338, 270-9.
- ZHU, Q., MANGUKIYA, H. B., MASHAUSI, D. S., GUO, H., NEGI, H., MERUGU, S. B., WU, Z. & LI, D. 2017. Anterior gradient 2 is induced in cutaneous wound and promotes wound healing through its adhesion domain. *FEBS J*, 284, 2856-2869.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Guido Sauter, der mir mit seiner fachlichen Expertise und seiner Unterstützung den Weg zu dieser Arbeit geebnet hat. Seine Anregungen und sein wertvolles Feedback haben maßgeblich zu dieser Dissertation beigetragen.

Ebenfalls danke ich den MTAs Laura Behm, Melanie Steurer, Inge Brandt und Sünje Seekamp, deren Engagement im Labor unersetzlich waren. Ihre Kompetenz und die freundliche Zusammenarbeit haben wesentlich zum Erfolg meiner Experimente beigetragen.

Ein herzlicher Dank geht an meine Mit-Doktoranden, mit denen ich viele Herausforderungen und ebenso viele schöne Momente erleben durfte. Die alltäglichen Gespräche, der Humor und der Zusammenhalt haben die anstrengende Arbeit erheblich erleichtert und die Zeit als Doktorand zu einer wertvollen Erfahrung gemacht.

Zuletzt möchte ich besonders meinen Eltern und meiner Freundin Julia danken, ohne deren Unterstützung dieser Weg nicht möglich gewesen wäre. Ihr Zuspruch und Glaube an mich gaben mir das Durchhaltevermögen, um diese Dissertation zu schreiben.

Danke!

10. Erklärung des Eigenanteils

Zu Beginn meiner Zeit als Promotionsstudent am Institut für Pathologie des UKEs wurde ich zunächst in den Techniken der TMA-Herstellung und der Immunhistochemie unterwiesen, welche praktisch beim Erstellen der TMAs sowie zur Optimierung des Immunhistochemie-Protokolls für die Antikörperfärbung angewendet wurden. Die Wahl des Studienantikörpers sowie der verwendeten Verdünnung wurde gemeinsam mit meinem Betreuer getroffen. Die Auswertung der Färbungen der verschiedenen Zelltypen beziehungsweise TMA-Spots des Normal- und Tumorgewebes erfolgte durch einen Pathologen. Die Auswertung der jeweiligen Färbungen wurde von mir protokolliert, in eine Datenbank übertragen und in einen semiquantitativen Score (negativ, schwach, moderat, stark) übersetzt. Von ausgewählten Tumor-Spots wurde von mir ein Bildarchiv angelegt. Die Häufigkeit der AGR2-Expression je Tumortyp (in % negativ, % schwach, % moderat, % stark) wurde bestimmt und in einer Rangliste nach Häufigkeit der AGR2-Positivität veranschaulicht. Zur Einschätzung der klinischen Relevanz habe ich die AGR2-Expressionsdaten mit vorhandenen klinisch-pathologischen Daten (histologischer Subtyp, pT, pN, Grad, Überlebensdauer) der wichtigsten Tumortypen verglichen und zusammen mit meinem Betreuer statistisch analysiert. Ich habe eine umfangreiche Literaturrecherche durchgeführt, um die AGR2-Expression in Tumoren sowie die Zusammenhänge zwischen AGR2-Expression und klinisch-pathologischen Parametern aus allen bislang publizierten Studien zu erfassen. Des Weiteren habe ich ein Diagramm erstellt, das die prozentuelle AGR2-Expression aus eigenen Daten mit denen der Weltliteratur vergleicht. Die von mir erstellten Tabellen, Abbildungen und Literaturdaten wurden zur Herstellung der Dissertation und gegebenenfalls der Publikation verwendet. Wöchentlich erfolgte die Teilnahme an Seminaren des Instituts, um theoretisches Wissen weiter zu vertiefen.

11. Eidesstattliche Versicherung

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

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

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

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

Datum

21.01.2025

Unterschrift