

**PAX6 is a highly specific marker for neuroendocrine neoplasms
of the pancreas.**

Dissertation

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

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sophie-Marie Hornburg

aus

Zürich

2024

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

Gutachter:in der Dissertation: PD Dr. Andreas Block

Vorsitz der Prüfungskommission: PD Dr. Andreas Block

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Thilo Hackert

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Elke Oetjen

Datum der mündlichen Prüfung: 30.01.2026

Inhalt

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	5
2	Einleitung.....	6
2.1	Neuroendokrine Neoplasmen des Pankreas	6
2.2	Paired Box Proteine	11
2.3	Pax-6.....	12
2.3.1	Struktur und Definition	12
2.3.2	Expression in Normalgeweben	15
2.3.3	Funktion in Normalgeweben	16
2.3.4	Bedeutung bei Krankheitsbildern	19
2.3.5	Expression und Bedeutung in Tumorgeweben	21
2.4	Klinische Bedeutung in der pathologischen Diagnostik	24
2.5	Andere potenzielle Marker für pankreatische NEN.....	27
2.5.1	Islet-1 (Isl-1).....	27
2.5.2	Progesteron-Rezeptor.....	30
2.5.3	GAD2	31
2.6	Ziel der Studie.....	32
3	Material und Methoden.....	33
3.1	Die Tissue-Microarray-Technik	33
3.1.1	Auswahl potenziell geeigneter Fälle für den TMA.....	33
3.1.2	Histologische Beurteilung durch einen Pathologen	33
3.1.3	TMA-Organisation	34
3.1.4	Herstellung des TMAs.....	35
3.1.5	Erstellung des TMA-Datenfiles	37
3.2	Verwendete TMA-Blöcke für die Pax-6-Studie	37
3.3	Immunhistochemie	44
3.3.1	Herstellung von Antikörpern.....	44
3.3.2	Direkte Immunhistochemie	45

3.3.3	Indirekte Immunhistochemie	46
3.3.4	EPOS-, PAP- und APAAP-Methodik.....	46
3.3.5	ABC- und LSAB-Methode	47
3.3.6	Herausforderungen der immunhistochemischen Färbung	48
3.4	Immunhistochemisches Färbeprotokoll	49
3.5	Immunhistochemische Auswertung	51
3.6	Statistik	52
4	Ergebnisse	53
4.1	Technische Aspekte.....	53
4.2	Pax-6 in Normalgeweben.....	53
4.3	Pax-6 in Tumoren	66
4.4	Pax-6-, Progesteron-Rezeptor- und GAD2-Färbung bei NEN	80
5	Diskussion	83
6	Zusammenfassung	90
7	English summary	91
8	Literaturverzeichnis	92
9	Abkürzungsverzeichnis	111
10	Abbildungsverzeichnis	114
11	Tabellenverzeichnis	117
12	Erklärung des Eigenanteils	118
13	Eidesstattliche Versicherung.....	119
14	Danksagung	120

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Neuroendokrine Neoplasmen (NEN) treten im gesamten Gastrointestinaltrakt auf und sind rein anhand histologischer Kriterien schwer zu unterscheiden. Um die Herkunft neuroendokriner Neoplasmen zu therapeutischen und prognostischen Zwecken genauer zu bestimmen, ist die Definition immunhistochemischer Marker von hoher Relevanz. Pax-6 ist ein Transkriptionsfaktor, der nach aktueller Studienlage in verschiedenen gastrointestinalen NEN unterschiedlich stark exprimiert wird und sich daher für eine Differenzierung dieser Entitäten eignen könnte. Die bisherige Studienlage ist jedoch stark diskrepant und damit nur bedingt aussagekräftig.

Ziel dieser Dissertation ist es, die Spezifität und klinische Relevanz der Pax-6-Expression in den wichtigsten humanen Tumorentitäten – mit besonderem Augenmerk auf Expression in pankreatischen NEN – im Rahmen einer hochstandardisierten Studie an einem Gewebemikroarray (TMA)-Kollektiv mittels immunhistochemischer Färbung zu untersuchen und mit weiteren Markern zu vergleichen.

2 Einleitung

2.1 Neuroendokrine Neoplasmen des Pankreas

Neuroendokrine Neoplasmen (NEN) stellen eine heterogene Gruppe benigner und maligner Neubildungen dar, die sowohl in rein endokrinen Organen als auch – entstanden aus dem diffusen endokrinen System – in sämtlichen anderen Organen auftreten können (Rindi et Wiedenmann, 2011; Asa et al., 2021; Rindi et al., 2022). Sie können entweder funktional oder nicht-funktional sein, je nachdem, ob sie hormonell aktiv oder inaktiv sind (Klimstra, 2016; Klöppel, 2017). Funktionale NEN zeichnen sich organübergreifend durch eine übermäßige Sekretion jeweils verschiedener Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine aus, was unterschiedlichste Symptomatiken wie das Cushing- oder Zollinger-Ellison-Syndrom; Hyperkalziämie im Rahmen eines Hyperparathyreodismus oder Hyponatriämie durch ektope ADH-Produktion zur Folge haben kann (Kamp et al., 2014; Alshaikh et al., 2018; Rindi et al., 2022).

Historisch wurden 4 Typen neuroendokriner Tumoren des Gastrointestinaltraktes aufgrund ihres histologischen Aufbaus unterschieden, aus dem wiederum auf die Herkunft geschlossen wurde; ersichtlich aus Abbildung 1. Typ A umfasst demnach insuläre, noduläre NET und wurde vor allem dem Ileum zugeordnet, Typ B zeigt trabekuläres beziehungsweise fadenförmiges und anastomosierendes Wachstum und wurde als typisch für den Bereich des Rektums bezeichnet, Typ C weist pseudoglanduläre und tubulo-azinäre Strukturen auf und wurde dem Bereich des Duodenums zugeordnet, Typ D zeigt diffuses, undifferenziertes Wachstum; Mischformen existieren ebenfalls (Soga et Tazawa, 1971).

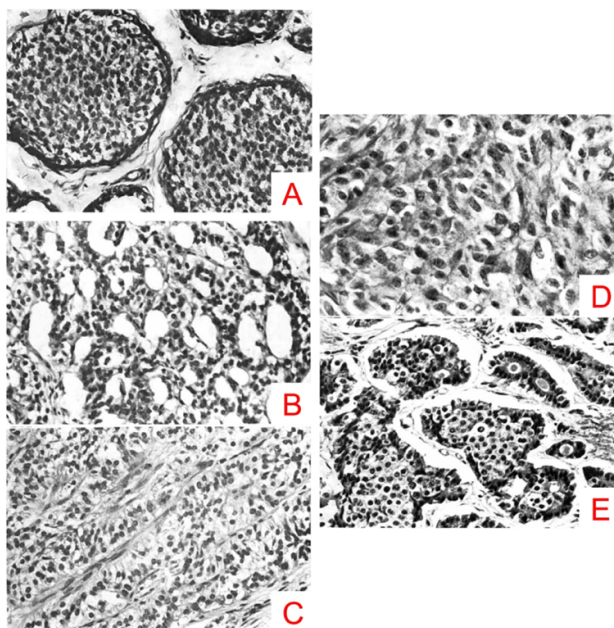


Abbildung 1: Historische Klassifikation von NEN nach histologischem Aufbau. Abb. modifiziert nach Soga et Tazawa, 1971. A = Typ A. B = Typ B, anastomosierend. C = Typ B, trabekulär. D = Typ D. E = Mischform A+C

Diese Einteilung wird dem Wissenstand zu neuroendokrinen Neoplasmen heute allerdings nicht mehr gerecht. Der lichtmikroskopisch sichtbare Aufbau der Neoplasien ist organübergreifend oftmals sehr ähnlich und es gibt zahlreiche Abweichungen und Überschneidungen in der klassischen Einteilung, was eine Unterscheidung des Tumorursprungs aufgrund rein histologischer Kriterien unmöglich macht (Bellizzi, 2013, Salaria et Shi, 2016).

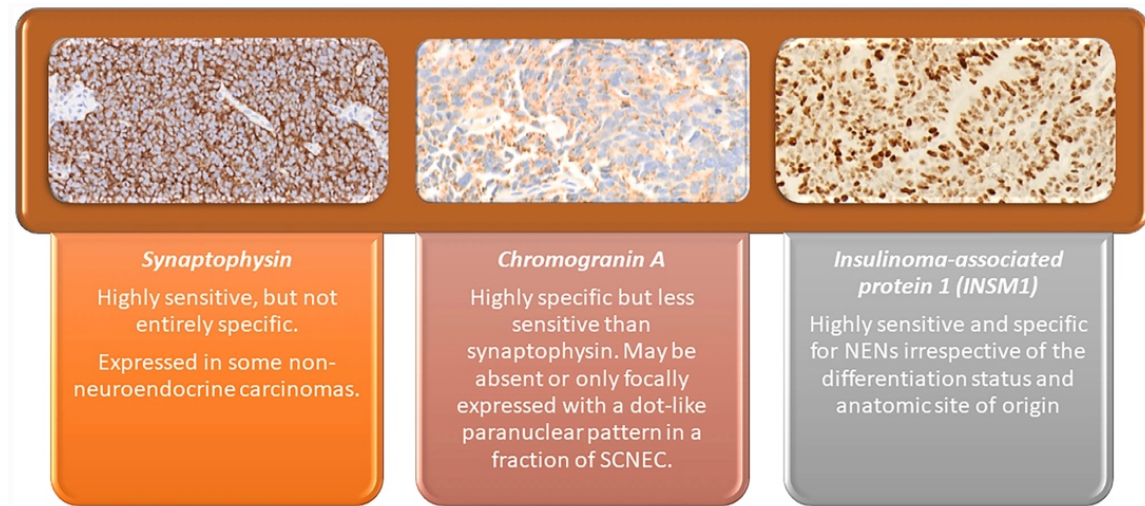


Abbildung 2: Färbung von NEN gegen verschiedene neuroendokrine Marker. Abbildung aus Rindi et al., 2022.

Definitionsgemäß weisen neuroendokrine Neoplasmen Biomarker der Sekretionspathways gesunder neuroendokriner Zellen auf, anhand derer sie immunhistochemisch diagnostiziert werden können: Zum einen Granine, VMATs und SV2 aus dem Large dense-core vesicles-Pathway, zum anderen Synaptophysin, Synaptobrevin und SV2 aus dem Small synaptic-like vesicles-Pathway (Rindi et Wiedenmann, 2011). Die sensitivsten Marker sollen dabei INSM1 und Synaptophysin sein; spezifisch, aber weniger sensitiv für NEN sei Chromogranin A (Rindi et al., 2022). Abbildung 2 zeigt beispielhaft das Färbeverhalten neuroendokriner Neoplasmen zu Synaptophysin, Chromogranin A und INSM1. Zur weiteren Differenzierung innerhalb der neuroendokrinen Neoplasmen existieren unterschiedliche Marker, gegen die immunhistochemisch gefärbt werden kann, um den Tumorursprung identifizieren zu können; so beispielsweise GATA3 für Paragangliome und NEN für Nebenschilddrüse, Hypophyse und Brust (Mete et al., 2019).

Tabelle 1: WHO-Klassifikation neuroendokriner Neoplasien von 2022. Tabelle übersetzt aus Rindi et al., 2022

Tumor-Kategorie Definition	Neuroendokrine Neoplasmen (NEN)	
Tumor-Familie/Klasse Definition	Gut differenzierte NEN	Schlecht differenzierte NEN
Tumor-Typ Definition	NET	NEC
Tumor-Subtyp Definition	Variabel, abhängig von der Lage	Großzelliges NEC oder Kleinzelliges NEC
Tumor-Grading Definition	G1, G2, G3	Per Definition hochgradig

Nach der aktuellen WHO-Klassifikation für endokrine und neuroendokrine Tumoren von 2022 werden neuroendokrine Neoplasmen nach ihrem Differenzierungsgrad unterschieden in neuroendokrine Tumoren (NET) und neuroendokrine Karzinome (NEC), erkennbar in Tabelle 1.

Neuroendokrine Karzinome sind schlecht differenziert, zeigen eine entsprechende Morphologie, werden per definitionem als high-grade G3-Tumoren bezeichnet und in groß- und kleinzellige neuroendokrine Karzinome unterteilt; sie weisen mehr als 10 Mitosen pro 2mm² sowie eine hohe Ki67-Expression von mindestens 20% auf (Salaria et Shi, 2016, Mete et Wenig, 2022).

Neuroendokrine Tumoren wiederum weisen einen höheren Differenzierungsgrad (mit entsprechender Morphologie) auf und werden nach ihrem Proliferationsgrad, gemessen an der Ki67-Expression, sowie anhand der Menge an Mitosen auf 2mm² in die Grade G1 bis G3 eingeteilt (Rindi et al., 2022, Mete et Wenig, 2022). Einen Überblick über das Grading in G1-3 sowie NEC gibt Tabelle 2, beispielhaft gezeigt für pankreatische NEN.

Tabelle 2: Kriterien zum Grading von pankreatischen NET und NEC. Tabelle aus Konukiewicz et al., 2022

	Morphologie	Grad	Ki67-Index	Mitosen (pro 2mm ²)
NET	Gut differenziert	G1	<3%	<2
		G2	3-20%	2-20
		G3	>20%	>20
NEC	Schlecht differenziert	-	>20%	>20

Die Neuerung, nach der neuroendokrine Tumoren gemäß ihrem Proliferationsgrad trotz hoher Differenzierung auch als G3-Tumoren eingestuft werden können, hat die Notwendigkeit diagnostischer Differenzierungsmöglichkeiten zwischen G3-NEC und G3-NET aufgeworfen; dabei weisen ATRX-, DAXX-, Menin- und p27-Verlust sowie Färbung

gegen SSTR2/5 eher auf einen G3-NET hin, während Rb- und SSTR2/5-Verlust sowie partieller oder ganzer Verlust von p53 eher für das Vorliegen eines G3-NEC sprechen (Uccella et al., 2021; Rindi et al., 2022). In Abbildung 3 wird beispielhaft das Färbeverhalten eines G3 pankreatischen NET gegen verschiedene Marker gezeigt, die ein NEC trotz ähnlichen Proliferationsverhaltens nicht aufweisen sollte.

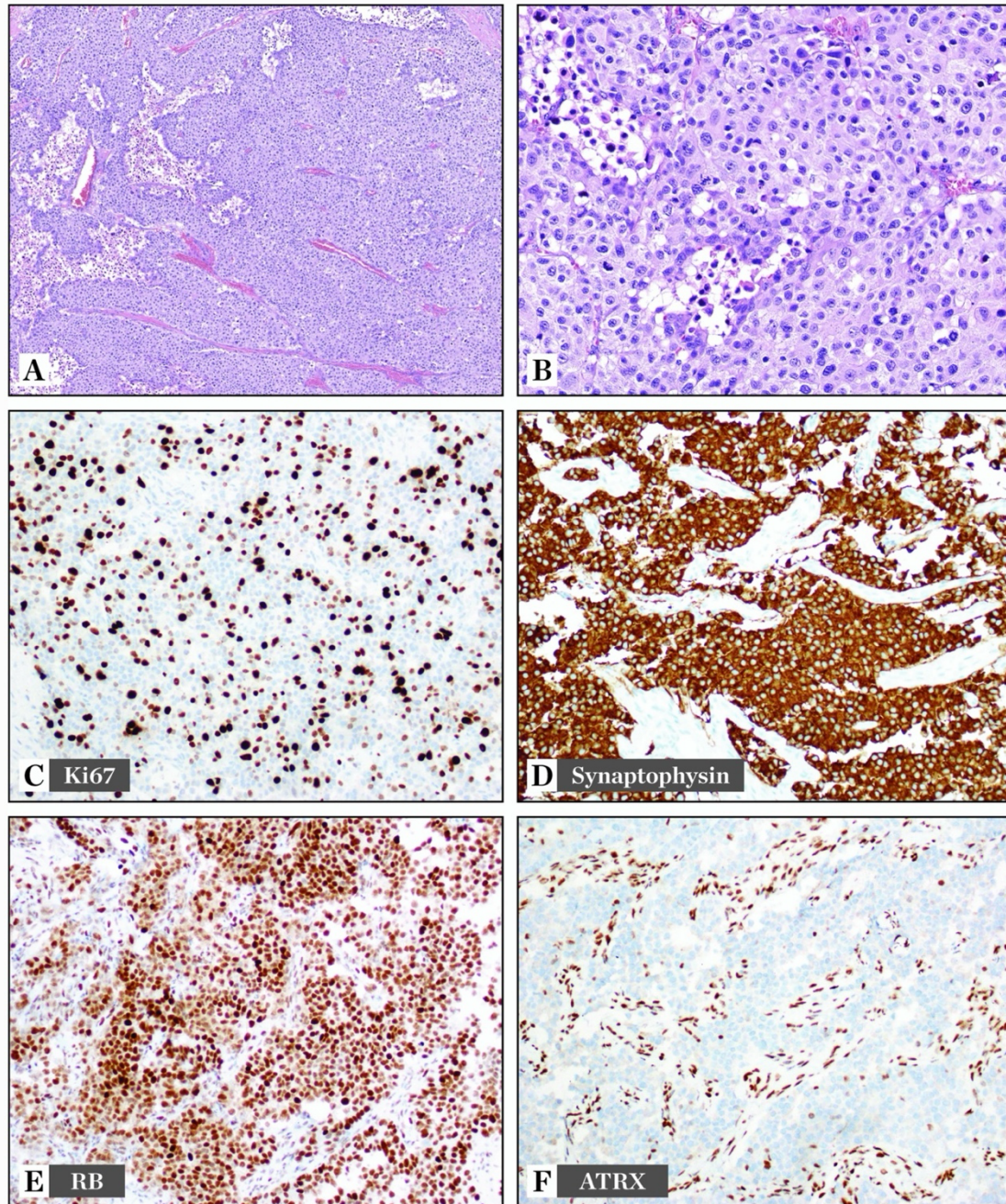


Abbildung 3: Immunhistochemisches Färbeverhalten eines pankreatischen NET mit dem Grading G3.
Abbildung aus Rindi et al., 2022

Pankreatische NET sind die zweithäufigsten primär malignen Tumoren des Pankreas und machen etwa 2-3% aller pankreatischen Neoplasmen aus (Tsutsumi et al., 2012, Salaria et Shi, 2016). Sie können sowohl sporadisch als auch im Rahmen genetisch vererbter Syndrome wie der Multiplen Endokrinen Neoplasie, Typ 1 (MEN-1) oder dem von-Hippel-Lindau-Syndrom vorkommen und werden analog der allgemeinen Einteilung neuroendokriner Neoplasmen in funktionelle, hormonsekretierende und nicht-funktionelle Tumoren eingeteilt, wobei das Insulinom der häufigste funktionelle pankreatische NET ist (Salaria et Shi, 2016, Falconi et al., 2016). Funktionelle pankreatische NET werden oft in früheren Stadien aufgrund von Symptomatik der hormonellen Sekretion gefunden, die unter anderem Hypoglykämie beim Insulinom, peptische Ulzerationen beim Gastrinom, Durchfall und Hypokaliämie beim VIPom, Diabetes beim Glukagonom sowie Hyperglykämie und Steatorrhö beim Somatostatinom umfassen kann (Ro et al., 2013; Cloyd et Poultides, 2015).

Nicht-funktionelle pankreatische NET machen mit 60-90% den weitaus größeren Anteil aus und werden aufgrund der fehlenden oder weniger spezifischen Symptomatik wie Ikterus, Schmerzen oder B-Symptomatik oftmals erst im fortgeschrittenen, vorrangig in Leber, Milz, Knochen, Peritoneum oder Nebenniere metastasierten Stadium klinisch auffällig (Zerbi et al., 2010; Cloyd et Poultides; 2015). Eine Transition nicht-funktioneller zu funktionellen pankreatischen NET ist ebenso möglich wie ein Wechsel in den sekretierten Hormonen (Zhu et al., 1996; Ro et al., 2013).

Die Prognose pankreatischer NET kann je nach Grading, Metastasenstatus, Größe und Subtyp extrem unterschiedlich ausfallen, so weist beispielsweise das Insulinom eine deutlich bessere Überlebensrate auf als nicht hormonproduzierende Tumoren (Zhang et al., 2015). Pankreatische NEC sind hoch aggressiv und tödlich (Salaria et Shi, 2016). Eine Größe nicht-funktionaler pankreatischer NET über 2cm geht im Vergleich zu kleineren Tumoren mit einer stark erhöhten Metastasierungsrate einher und muss deutlich aggressiver behandelt werden (Falconi et al., 2016). Beim Vorliegen extrapancreatischer Metastasen sinkt das prognostizierte 5-Jahres-Überleben von 93% im nicht-metastasierten Zustand auf nur noch 27% (Hackeng et al., 2021). Obwohl Bemühungen zur Identifizierung von Markern zur Abschätzung des Outcomes pankreatischer NET unter definierten Behandlungsformen gemacht wurden, im Rahmen derer beispielsweise Somatostatin-Rezeptor 2, Chromogranin A, neuronenspezifische Enolase, Aristaless-related homeobox gene (ARX) und Pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1) untersucht wurden, existieren in all diesen Bereichen bisher keine ausreichend belastbaren Daten (Rindi et Wiedenmann, 2011; Hackeng et al., 2021). Generell ist Ki67 bisher der einzige anerkannte prognostische Marker, der allerdings nicht spezifisch für pankreatische NET ist und auch keine komplett verlässlichen Aussagen über das zukünftige Verhalten der Neoplasien

zulässt (Falconi et al., 2016, Salaria et Shi, 2016; Hackeng et al., 2021). Die Unterscheidung von G3-NET und G3-NEC des Pankreas kann analog zu anderen NEN auch durch den Nachweis von p53- und RB1-Alterationen (Argumente für NEC) erleichtert werden (Konukiewicz et al., 2022).

2.2 Paired Box Proteine

Die Paired Box Proteine bilden eine evolutionär hoch konservierte Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die aus neun homologen Mitgliedern besteht (Stapleton et al., 1993, Stuart et al., 1993, Dahl et al., 1997). Diese steuern hauptsächlich die Gewebsentwicklung und -differenzierung im unreifen Organismus (Walther et Gruss, 1991, Dahl et al., 1997, Barr, 1997), übernehmen jedoch teilweise auch noch im adulten Organismus Funktionen wie Geweberegeneration oder Hormonproduktion über die Aktivierung ihrer Zielgene (Mishra et al., 2015, Gosmain et al., 2007). Die Mitglieder der PAX-Familie werden in vier Subgruppen unterteilt, die untereinander ähnliche Intron-Exon-Strukturen teilen: Subgruppe I enthält eine Oktapeptidregion, aber keine Homöodomäne (Pax-1, Pax-9), Subgruppe II enthält ebenfalls eine Oktapeptidregion und eine verkürzte Homöodomäne (Pax-2, Pax-8, Pax-5), Subgruppe III beinhaltet eine komplette Oktapeptidregion und Homöodomäne (Pax-3, Pax-7) und Subgruppe IV fehlt die Oktapeptidregion, aber dafür liegt ebenfalls eine komplette Homöodomäne vor (Pax-4, Pax-6) (Walther et al., 1991, Dahl et al., 1997, Barr, 1997).

2.3 Pax-6

2.3.1 Struktur und Definition

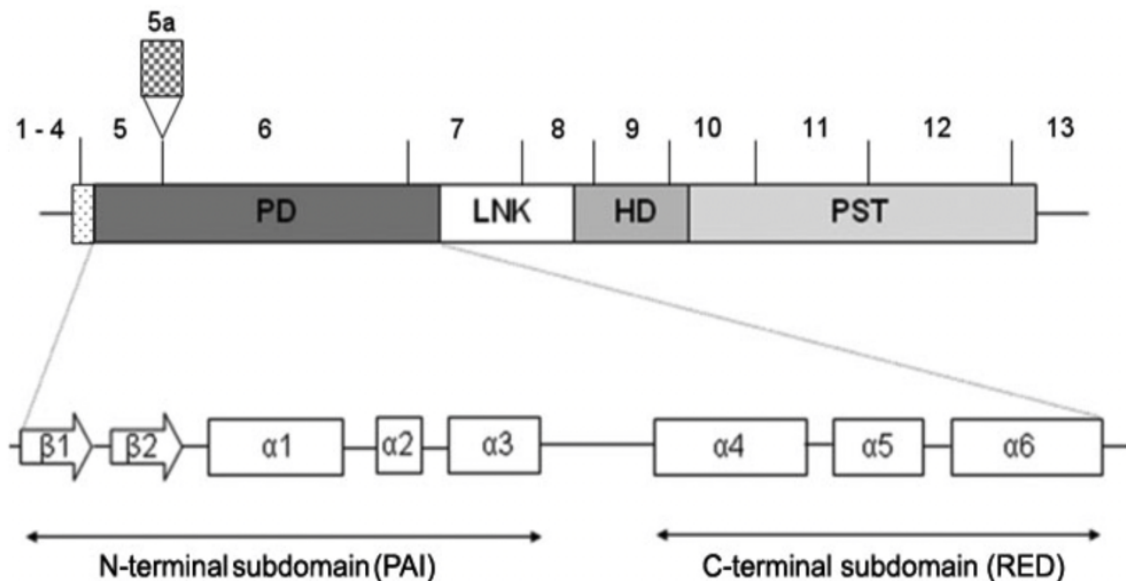


Abbildung 4: Struktur von Pax-6. Abbildung aus Dansault et al., 2007

Paired Box 6 oder kurz Pax-6 ist ein Paired Box Protein der Subgruppe IV (Walther et al., 1991, Dahl et al., 1997). Sein Aufbau ist in Abbildung 4 dargestellt. Das kodierende Gen PAX6 ist im menschlichen Genom auf Chromosom 11p13 lokalisiert, umfasst etwa 22 Kilobasen und 14 Exone (Glaser et al., 1992, Epstein et al., 1994). Das Protein Pax-6 besteht aus 422 Aminosäuren und ist aus einer N-terminalen, zweiteiligen Paired-Box-Domäne aus 128 Aminosäuren und einer paired-Typ Homöodomäne aufgebaut (Epstein et al., 1994, Walther et Gruss, 1991). Homöodomänen binden an DNA-Motive und verursachen die Transkription bestimmter Gene, die für die Morphogenese, insbesondere für die Ausbildung spezifischer Körpersegmente oder Organstrukturen verantwortlich sind (Mark et al., 1997). Die Pax-6-Homöodomäne bindet an TAAT-Motive und kann dabei mit der Paired-Domäne interagieren (Czerny et Busslinger, 1995, Jun et Desplan, 1996). Homöodomäne und Paired-Box-Domäne sind verbunden durch eine glutaminreiche Linker-Region, die die kleine DNA-Furche kontaktiert (Xu et al., 1995, Glaser et al., 1994). C-terminal befindet sich eine Transaktivierungsdomäne, die reich an Prolin, Serin und Threonin ist (Czerny et Busslinger, 1995, Barr, 1997).

Die Paired-Box-Domäne von Pax-6 ist aus zwei Subdomänen aufgebaut (Xu et al., 1995). Abbildung 5 zeigt die Interaktion von Paired-Domäne und DNA. Die N-terminale Subdomäne (PAI) besteht in der Tertiärstruktur aus zwei β -Turns, die bei der Transkription mit der kleinen DNA-Furche interagieren, und drei α -Helices, welche an die große DNA-Furche binden (Xu et al., 1995, Czerny et Busslinger, 1995). Die Bindungen werden über Kontakte zum Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat und zu Basen vermittelt (Xu et al., 1995).

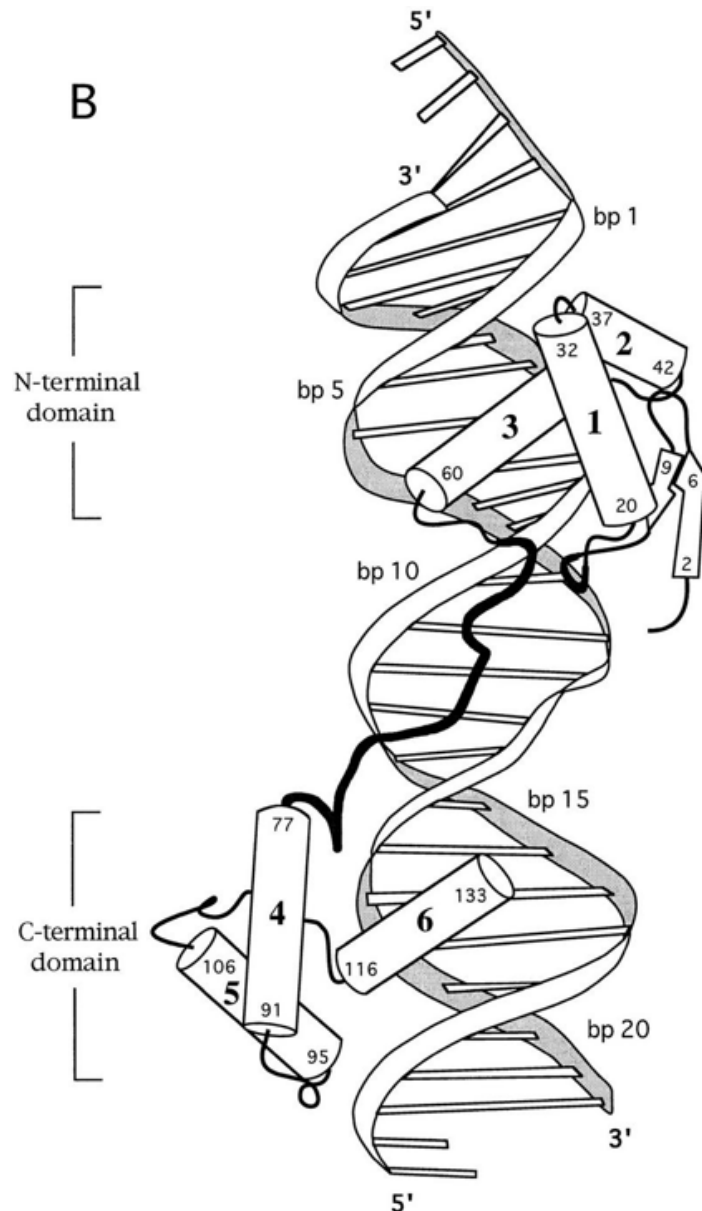


Abbildung 5: Interaktion der Paired Box- Domäne von Pax-6 mit DNA; Abbildung aus Xu et al., 1995.

Helix 3 passt dabei als sogenannte „Erkennungshelix“ direkt in die große DNA-Furche (Xu et al., 1995).

Die C-terminale Subdomäne (RED) besteht aus weiteren drei α -Helices, deren Erkennungshelix, Helix Nummer sechs, an die große DNA-Durche bindet, während die anderen beiden Helices nicht mit der DNA interagieren (Xu et al., 1995). Die Paired-

Domäne mit ihren zwei Subdomänen verleiht Pax-6 die Fähigkeit, auf verschiedene Arten mit DNA zu interagieren und Transkription der Zielgene unterschiedlich zu beeinflussen (Jun et Desplan, 1996).

Die Transkription von Pax-6 wird reguliert über die Promotoren P0 und P1, P α und P4, wobei die verschiedenen Promotoren die Transkription unterschiedlicher Isoformen bewirken: So entstehen durch Bindung an den Promotoren P0 und P1 kanonisches Pax-6 und Pax-6(5a), während durch den P α -Promotor induziert Pax6(Δ PD) entsteht (Plaza et al., 1995, Kammandel et al., 1999, Shukla et al., 2022, Kleinjan et al., 2004).

Pax-6(5a) entsteht durch zusätzliche Transkription des Exons 5a. Das Genprodukt verlängert sich um 14 Aminosäuren und die Faltung der PAI-Subdomäne wird erschwert und verändert (Glaser et al., 1992, Epstein et al., 1994). Dadurch wird das Bindungsverhalten der Paired-Domäne an die DNA erschwert und Pax-6(5a) bindet bevorzugt über die c-terminale RED-Subdomäne (Singh et al., 2002, Epstein et al., 1994).

Bei der Isoform Pax6(Δ PD) fehlt die Paired-Domäne komplett, sie spielt vermutlich eine Rolle bei der Linsenentwicklung und wirkt dabei antagonistisch zum kanonischen Pax-6 (Cinar et al., 2004, Kim et Lauderdale, 2006).

Weiterhin existieren multiple cis-regulatorische Elemente für Pax-6, unter anderem das downstream befindliche SMO-Element in einem Intron des Gens ELP4, das eine Rolle bei der Entwicklung von Aniridia II spielt (Kleinjan et al., 2001, Bhatia et al., 2013) und der Ectoderm Enhancer, der eine zentrale Rolle bei der Regulation der Pax-6-Expression in der Linsenplakode übernimmt (Kammandel et al., 1999, Dimanlig et al., 2001).

Sonic Hedgehog inhibiert die Pax-6-Expression im Neuroektoderm und in ventralen Progenitorzellen von Motor- und Interneuronen (Mizuno et al., 1997, Ericson et al., 1997). Der Transkriptionsfaktor Pitx3 steuert über Regulation von Pax-6 die Linsenentwicklung (Khosrowshahian et al., 2005, Hooker et al., 2012). Auch alternative Spleißvarianten von Pax-6, beispielsweise Pax-6(5a) und Pax-6(Δ PD) regulieren die Expression von Pax-6 selbst, beispielsweise über Interaktion mit dem Ektoderm Enhancer im Oberflächenektoderm des sich entwickelnden Auges (Grindley et al., 1995, Aota et al., 2003).

2.3.2 Expression in Normalgeweben

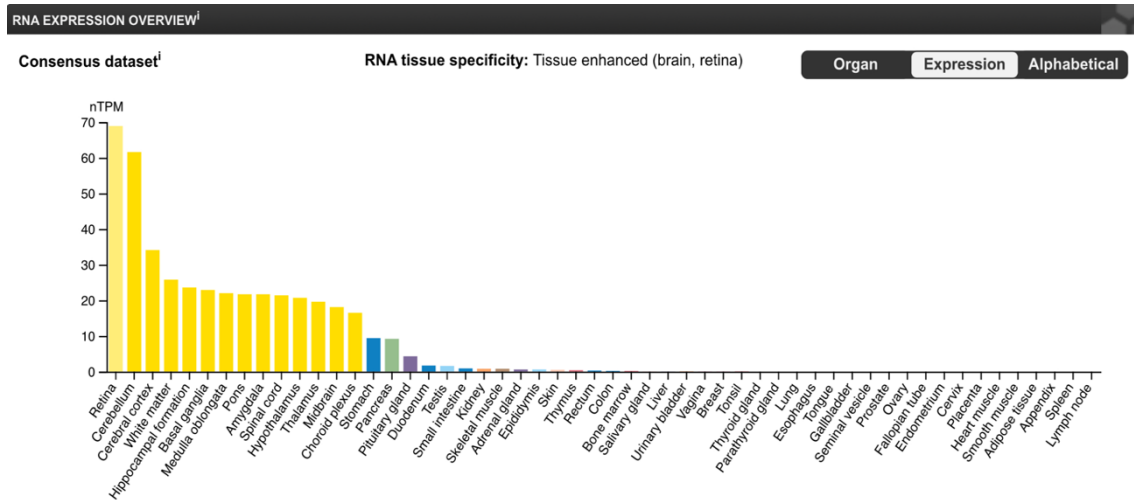


Abbildung 6: RNA-Expression von Pax-6 in verschiedenen Gewebstypen; entnommen aus <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007372-PAX6/tissue>

Im adulten Organismus soll Pax-6 hauptsächlich in den Müller-Gliazellen, Horizontalzellen, Photorezeptoren und zum Teil Bipolarzellen der Retina, den Körnerzellen des Cerebellums sowie Astrozyten und in geringerem Maße auch Neuronen des restlichen ZNS exprimiert werden (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007372-PAX6/single+cell+type>). Im sich entwickelnden Organismus wurde eine Pax-6-Expression zunächst im ventralen Bereich des Neuralrohres, später unter anderem in Bereichen der Retina, dem Bulbus olfactorius, dem Epithel der Nase, dem ventralen Thalamus, der Hypophyse und neocorticalen Bereichen beschrieben (Walther et Gruss, 1991, Glaser et al., 1994).

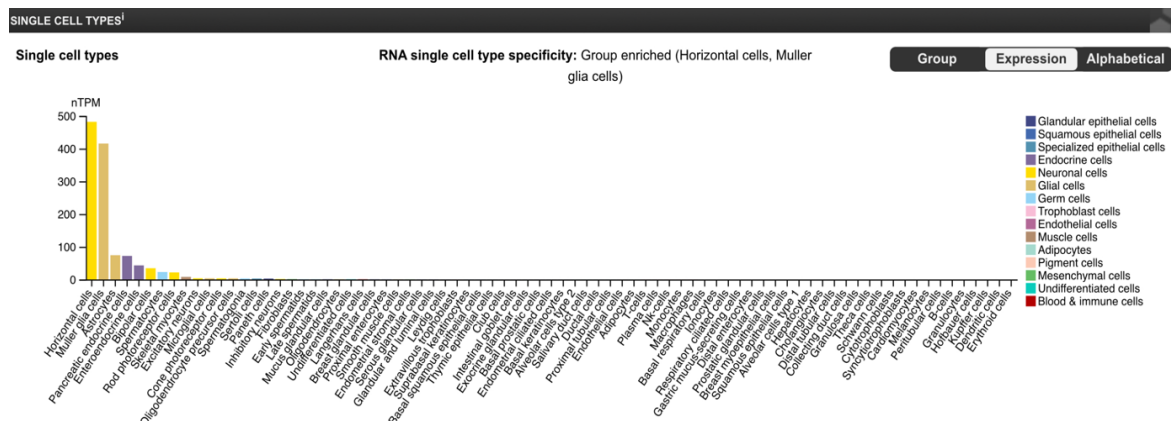


Abbildung 7: RNA-Expression von Pax-6 auf Zellebene, entnommen aus <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007372-PAX6/single+cell+type>

Weiterhin fand sich eine Expression von Pax-6 in Bereichen der Hormonproduktion wie dem Hypophysenvorderlappen sowie glandulären Zellen der Brust, Speicheldrüsen und des Verdauungstraktes (Paneth-Körnerzellen), neuroendokrinen Zellen des Verdauungstraktes (Magen, Pankreas, Duodenum, Jejunum und Ileum, Colon und Rectum)

(<https://www.proteinatlas.org/ENSG000000007372-PAX6/single+cell+type>). Eine geringe Expression wurde auch für plazentäre Fibroblasten, skelettale Myozyten und Myozyten der glatten Muskulatur, Spermatozyten und Spermatogonien beschrieben (<https://www.proteinatlas.org/ENSG000000007372-PAX6/single+cell+type>).

Eine Übersicht der RNA-Expression in Geweben und Zelltypen zeigen Abbildung 6 und Abbildung 7. Diese Daten wurden einerseits im Falle der Single Cell Type-Cluster durch Metaanalyse von Datensets zur RNA-Expression in einzelnen Zellen gewonnen, im Rahmen derer ein Clustering und eine Zuordnung der Zelltypen zu bekannten Markern stattfand; andererseits für die HPA und GTEx Datensets durch Abgleich mit Daten aus RNA-Sequenzierung an 1206 Zelllinien aus gefrorenen Gewebsschnitten, 40 menschlichen Geweben aus der Uppsala-Biobank und 18 Blutzelllinien sowie an post-mortem-Geweben (https://www.proteinatlas.org/about/assays+annotation#normalization_rna).

2.3.3 Funktion in Normalgeweben

Die hauptsächlichen Funktionen von Pax-6 spielen gesichert eine Rolle bei der Gewebsentwicklung im unreifen Organismus, der Gewebsregeneration, der synaptischen Plastizität und der Hormonproduktion im adulten Körper. Viele dieser Prozesse und die genaue Rolle von Pax-6 sind dabei noch nicht in Gänze untersucht worden. Hier sollen einige bisher beschriebene Funktionen von Pax-6 aufgeführt werden.

2.3.3.1 Gehirn

Im ZNS sorgt Pax-6 während der embryonalen Entwicklung für die richtige Anordnung und Lokalisation der Neurone (Caric et al., 1997, Mitchell et al., 2003). Während der cerebellären Entwicklung wird Pax-6 in den Körnerzellen des Stratum granulosum exprimiert (Walther et Gruss, 1991, Stuart et al., 1993). Eines seiner Target-Proteine ist Reelin, ein durch Cajal-Retzius-Zellen synthetisiertes Glykoprotein der extrazellulären Matrix. Reelin ist an der frühen ZNS-Morphogenese und später synaptischer Plastizität beteiligt, indem es das Aktin-Zytoskelett von Neuronen stabilisiert und Dendritenwachstum und -auszweigung reguliert (D'Arcangelo et al., 1995, Hirota et Nakajima, 2017). Im Cerebellum spielt es eine große Rolle bei der Purkinjezellmigration und Differenzierung von Körnerzellen (D'Arcangelo et al., 1995, Swanson et al., 2005).

Ebenfalls im Cerebellum reguliert Pax-6 die Expression des Netrin-Rezeptors Unc5h3 (Engelkamp et al., 1999). Netrin 1 bildet einen Gradienten für die Wanderung von Neuronen und ist damit verantwortlich für die korrekte Bildung der Zellschichten (Ackerman et al., 1997, Goldowitz, 2000).

Im adulten Gehirn übernimmt Pax-6 durch Expression in neuronalen Stammzellen Funktionen in der Gewebsregeneration nach Verletzungen und Gliosen und sorgt für die Erhaltung synaptischer Plastizität (Sakayori et al., 2012, Mishra et al., 2015, Yogarajah et al., 2016).

2.3.3.2 Auge

In der Augenentwicklung ist Pax-6 unabkömmlich. Es wird zunächst im gesamten Augenfeld und später im Bereich der Retina, des Pigmentepithels und der Linse exprimiert (Glaser et al., 1992, Dansault et al., 2007). Gemeinsam mit Pax-2 sorgt es für die korrekte Abgrenzung zwischen Augenbecherstiel und Augenbecher und damit für die Trennung von Gliazellen und Retinazellen am Austrittspunkt des Nervus opticus (Torres et al., 1996, Schwarz et al., 2000). Ohne Pax-6 können die Iris, insbesondere der Musculus sphincter pupillae, und der Ciliarkörper nicht richtig aus dem Neuroektoderm gebildet werden (Davis-Silberman et al., 2005, Davis et al., 2009).

Die Entwicklung des Kornea-Epithels wird von Pax-6 über die Induktion Keratine KRT 12 und 3 reguliert, wobei die Pax-6(5a)-Spleißvariante bevorzugt KRT12 induziert, kanonisches Pax-6 eher KRT3 (Sasamoto et al., 2016). Auch die Linsenentwicklung aus dem Oberflächenektoderm ist stark von Pax-6 abhängig. Die Ablösung des Linsenbläschens wird durch die Kontrolle von Proteinen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin 1 und Kollagene reguliert (Huang et al., 2011, Lalitha et al., 2020). Nur durch die Unterdrückung des Wnt/ β -Catenin-Pathways durch verstärkte Expression von Inhibitoren wie Sfrp1 oder Dkk1 kann die Linsenentwicklung überhaupt stattfinden (Shaham et al., 2009, Machon et al., 2010). Für die Spaltbildung im Augenbecher, Entwicklung der Linse und Begrenzung der Retinadicke ist Retinoidsäure zwingend notwendig, deren Signalling ebenfalls durch Pax-6 kontrolliert wird (Enwright et Grainger, 2000, Maden et al., 2007). Weiterhin kontrolliert Pax-6 die Kristalline, die Strukturproteine der Linse. Beispiele hierfür sind die Bindung am linsenspezifischen Enhancer-Element DC5 des δ -Kristallins und an Enhancer N3 gemeinsam mit dem Transkriptionsfaktor Sox2 (Inoue et al., 2007) sowie die Regulation des ζ -Kristallins (Richardson et al., 1995, Azuma et al., 2005).

Im adulten Auge liegt Pax-6 unter anderem noch in der Retina, dem Linsenepithel, und in den limbalen Stammzellen in den Vogt-Palisaden am Rand der Kornea vor und unterstützt die Kornea-Regeneration nach Defekten (Dansault et al., 2007, Lima Cunha et al., 2019).

Das alternative Spleißprodukt Pax-6(5a) wird vor allem in Linse, Iris und fovealen Bereichen der Retina exprimiert (Jaworski et al., 1997, Azuma et al., 2005). Eine Deletion von Exon 5a kann Defekte wie Peters Anomalie, Irishypoplasie, Katarakte und foveale Hypoplasie zur Folge haben (Duncan et al, 2000, Singh et al., 2002) und hat in Tierexperimenten zur Bildung ektopter Retinae geführt (Halder et al., 1995, Azuma et al., 2005), was den Verdacht

nahelegt, dass dieses Genprodukt vor allem an der retinalen Entwicklung stark beteiligt ist. Außerdem verändert sich das Verhältnis in der Expression von Pax-6 und Pax-6(5a) im Laufe der embryonalen Entwicklung von zunächst einem deutlich höheren Anteil von Pax-6 (8:1) zu einem späteren ausgeglichenen Verhältnis der beiden Varianten in adulten Geweben, was dafür spricht, dass Pax-6 eine größere Rolle in der Differenzierung der Progenitorzellen spielen könnte, während Pax-6(5a) eher spätere Entwicklungsschritte und Zellproliferation im Auge beeinflusst (Kozmik et al., 1997, Zhang et al., 2001, Dominguez et al., 2004).

2.3.3.3 Pankreas

Im Pankreas spielt Pax-6 sowohl eine Rolle bei der Organentwicklung als auch bei der Hormonproduktion. Es wird bereits in den Pankreasknospen exprimiert und findet sich später in allen endokrinen Zellen (Turque et al., 1994, St-Onge et al., 1997, Gosmain et al., 2007).

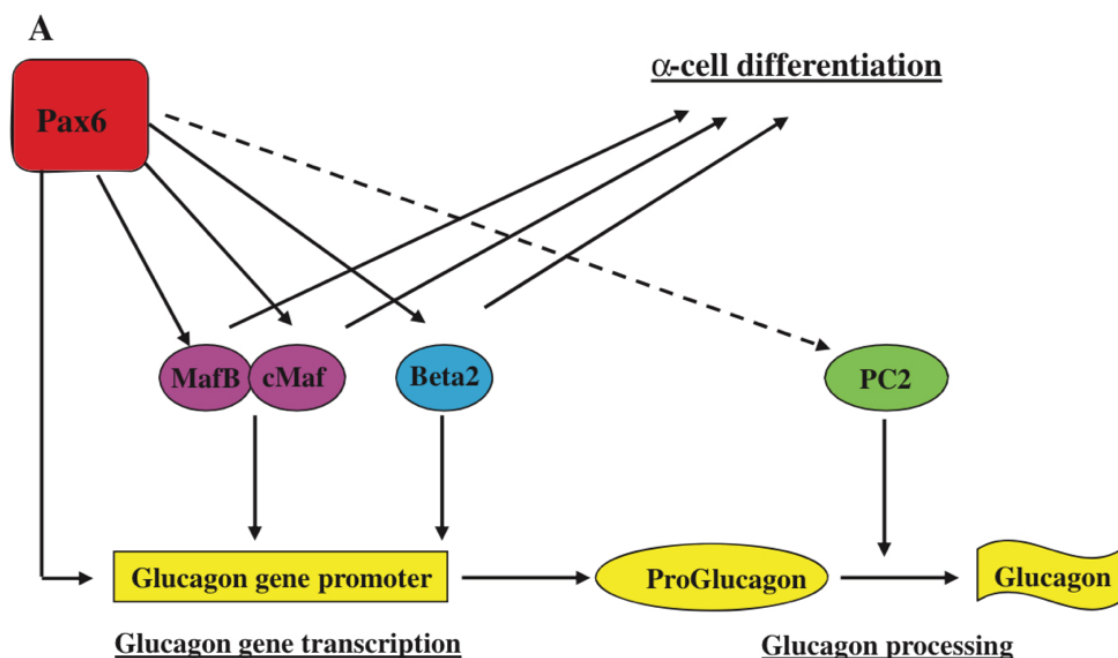


Abbildung 8: Verschiedene Wirkungen von Pax-6 auf α-Zelldifferenzierung und Glukagonexpression; modifiziert nach Gosmain et al., 2011.

Die korrekte Ausbildung des endokrinen Pankreas ist maßgeblich von der Expression von Pax-6 abhängig. Insbesondere ein Fehlen der Paired-Domäne führt zu einem kompletten Fehlen der Glukagon-produzierenden α-Zellen und einer verformten und desorganisierten Inselzellbildung, aber nicht zu einem vollständigen Wegfall der β- und δ-Zellen (St-Onge et al., 1997, Gosmain et al., 2011). Bei einer kompletten Deletion von Pax-6 liegen keine Insulin-, Glukagon- und Somatostatin-produzierenden Zellen mehr vor, stattdessen finden

sich Ghrelin-produzierende Zellen (Heller et al., 2005, Swisa et al., 2017). Diese exprimieren grundsätzlich kein Pax-6, weswegen die Möglichkeit besteht, dass die endokrinen Zellen des Pankreas ohne das Vorliegen von Pax-6 in einen Ausgangszustand der Ghrelin-Produktion übergehen. Pax-6 ist generell wichtig für die Glukagon- und auch Insulinproduktion (Yasuda et al., 2002, Nishi et al., 2005). Es wird dabei von Pax-4 kompetitiv inhibiert, indem dieses unter anderem mit höherer Affinität an Zielgenabschnitte von Pax-6 bindet (Smith et al., 1999, Gosmain et al., 2007). Pax-6 aktiviert gemeinsam mit dem Transkriptionsfaktor c-Maf oder Cdx-2/3 das Glukagon-Gen über die Bindung an AT-reiche Gebiete des G1-Kontrollelementes (Ritz-Laser et al., 1999, Gosmain et al., 2007). Auch andere Transkriptionsfaktoren wie Brain-4 können dort binden, im Vergleich zu Pax-6, gerade in Kombination mit c-Maf, sind diese jedoch für die Glukagonexpression sehr viel weniger relevant (Gosmain et al., 2007).

Die Insulinproduktion wird über die von Pax-6 regulierte Serin-Endoprotease PC1/3 gesteuert. PC1/3 spaltet (und aktiviert) Proinsulin zu Insulin (Laakso, 2009, Wen et al., 2009). Über die PC2 wird Proglukagon zu Glukagon gespalten. Pax-6 aktiviert die PC2 und zusätzlich auch ihren Chaperon 7B2 über die Hochregulation der Gene von cMaf und $\beta 2$ /NeuroD1 und sorgt so für eine gesteigerte Glukagonproduktion (Katz et al., 2009, Gosmain et al., 2011).

Abbildung 8 verschafft einen Überblick über die Wirkung von Pax-6 auf α -Zellen beziehungsweise Glukagonexpression und -prozessierung.

2.3.4 Bedeutung bei Krankheitsbildern

Die große Rolle von Pax-6 in der Gewebsentwicklung insbesondere des Auges bedingt eine Vielzahl pathologischer Symptome, wenn Pax-6 heterozygot mutiert oder deletiert ist. Hier soll vorwiegend auf die Aniridie eingegangen werden, da deren variablen Symptome einen sehr breit gestreuten Überblick über mögliche Ausfallserscheinungen bei Pax-6-Mutationen und -Deletionen liefern.

Die Aniridie zeichnet sich durch eine hohe Penetranz und ein sehr variables Erscheinungsbild aus und wird zumeist autosomal-dominant vererbt, tritt aber selten auch sporadisch auf (Glaser et al., 1992, Laakso, 2009). Mit einer geschätzten globalen Inzidenz von zwischen 1:40.000 und 1:96.000 (Lim et al., 2017) handelt es sich um eine seltene, jedoch aufgrund ihrer Auswirkungen auf die Patienten nicht zu vernachlässigende Erkrankung. Es gibt zwei verschiedene Unterformen, die durch Funktionsverluste von Pax-6 ausgelöst werden: Aniridia 1 entsteht durch Mutationen im PAX6-Gen selbst, während Aniridia 2 durch eine Mutation des cis-regulatorischen Enhancer-Elementes SIMO im Intron des ELP4-Gens auf dem gleichen Chromosom ausgelöst wird (Grønskov et al., 1999, Bhatia et al., 2013).

Kernsymptom ist die namensgebenden Irishypoplasie oder -aplasie, die verschieden stark ausgeprägt sein kann, jedoch bei den Betroffenen fast immer zu beobachten ist (Glaser et al., 1992, Abouzeid et al., 2009). Interessanterweise sind die Augen der Patienten normal groß, was einen großen Unterschied zum Mausmodell mit Pax-6-Mutation oder -Deletion, welches den Phänotyp small eye (Sey) aufweist, darstellt (Hill et al., 1991, Hanson et al., 1993). Weitere Symptome sind die foveale Hypoplasie, die einen schlechten Visus des Patienten bewirkt, oft auch eine Hypoplasie des Nervus opticus, pathologische Veränderungen der Kornea inklusive der Aniridia-assoziierten Keratopathie, Nystagmus und die Peter's Anomalie (Glaser et al., 1992, Hanson et al., 1994, Dansault et al., 2007). Die Aniridia-assoziierte Keratopathie ist vermutlich durch den Funktionsverlust der limbalen Stammzellen in den Vogt-Palisaden bedingt, die Defekte der Kornea normalerweise beheben würden. Ohne Pax-6 kommt es stattdessen zunehmend zur Inflammation, Vaskularisierung und Opafizierung der Hornhaut, wodurch die Sicht der Patienten progressiv eingeschränkt wird (Glaser et al., 1994, Lagali et al., 2020). Die Peter's Anomalie entsteht durch eine Störung in der Wanderung mesenchymaler Zellen zwischen Kornea und Linse und führt zu einer Verwachsung der beiden Strukturen, eine Verengung der vorderen Augenkammer mit resultierendem Glaukom und eine zentrale Hornhauttrübung (Tang et al., 1997, Dansault et al., 2007).

Neben diesen aufs Auge begrenzten Symptomen kann die Aniridie noch in Kombination mit zahlreichen extraokulären Pathologien vorliegen, die zu einem großen Teil ebenfalls aus dem Funktionsverlust von Pax-6 resultieren.

Vom WAGR-Syndrom spricht man, wenn zusätzlich zur Aniridie auch ein Wilms-Tumor, der häufigste Nierentumor beim Kind, geniturologische Anomalien und mentale Retardierung vorliegen (Davis et Cowell, 1993, Stuart et al., 1993). Es entsteht, wenn nicht nur Pax-6, sondern auch WT-1 und weitere benachbarte Gene großflächig deletiert wurden (Fischbach et al., 2005, Abouzeid et al., 2009). Liegt auch noch eine Deletion des BDNF-Gens für den Brain-derived neurotrophic factor vor, ist zusätzlich zu den vorher genannten Symptomen noch Übergewicht in den Patienten zu beobachten, weshalb dann vom WAGRO-Syndrom gesprochen wird (Abouzeid et al., 2001, Han et al., 2008).

Im ZNS hat die heterozygote Mutation von Pax-6 vor allem Hypoplasie oder Aplasie der anterioren Kommissur, des Cerebellums, des Temporal- und Occipitallappens, des Corpus callosum, der Glandula pinealis und des Bulbus olfactorius zur Folge (Glaser et al., 1994, Sisodiya et al., 2001, Mitchell et al., 2003). Dadurch lassen sich einige weitere zum Teil bei Aniridie-Patienten beobachteten Symptome erklären: Probleme bei der auditiven Prozessierung sind bedingt durch eine Hypo- oder Aplasie des Corpus callosum, Schlafprobleme lassen sich auf einen Melatoninmangel durch Fehlbildung oder Fehlen der

Glandula pinealis zurückführen und Hyp- oder Anosmie entsteht unter anderem durch Fehlbildungen des Bulbus olfactorius.

Darüber hinaus lassen sich mitunter auch pathologische Veränderungen in frontoparietalen corticalen Regionen beobachten, sowohl angeboren als auch mit dem Alter zunehmend, die zu Einschränkungen in exekutiven und verhaltenssteuernden Funktionen und Gedächtnisproblemen führen können (Ellison-Wright et al., 2004, Yogarajah et al., 2016).

Im endokrinen Bereich haben Mutationen oder Deletionen von Pax-6 mitunter große Auswirkungen auf den Glukosestoffwechsel, da insbesondere die Glukagon-, aber auch die Insulinproduktion stark eingeschränkt sein können. Eine fehlende Insulinproduktion kann dabei zu Glukoseintoleranz und early-onset Diabetes führen (Yasuda et al., 2002, Nishi et al., 2005). Homozygote Pax-6-Mutationen sind nicht mit dem Leben vereinbar und äußern sich phänotypisch unter anderem in Anophthalmie und großflächigen Hirnschäden (Glaser et al., 1994).

2.3.5 Expression und Bedeutung in Tumorgeweben

Zur Rolle von Pax-6 in der Tumorentstehung existiert keine eindeutige Studienlage. Einen Überblick über das Cancer Genome Atlas (TCGA)-Dataset des National Cancer Institute und des National Human Genome Research Institute zur RNA-Expression in Tumoren gibt Abbildung 9. Im Rahmen dieses Programms wurden molekulare Marker von mehr als 20.000 Tumorgewebsproben mit Normalgewebsproben verglichen, um 33 Tumortypen zu charakterisieren (<https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>).

Bei einigen Tumorentitäten wurde eine tumorsuppressive Wirkung von Pax-6 postuliert. Dazu gehören zum einen die Glioblastome, bei denen Pax-6 möglicherweise über Inhibition der Expression des Vascular Growth Factors die Angiogenese des Tumors unterdrücken könnte (Zhou et al., 2003, Zhou et al., 2010). Weiterhin wurde eine Pax-6-induzierter Zellzyklusarrest in der G1-Phase von Tumorzellen beschrieben (Zhou et al., 2005, Hegge et al., 2018). Über eine Repression des Gens für die Matrix-Metalloproteinase-2 soll Pax-6 die Invasivität von Tumoren unterdrücken können (Mayes et al., 2006).

Im Prostatakarzinom wurde ein tumorsuppressiver Effekt von Pax-6 angenommen, da Pax-6 die Transkription des Androgenrezeptors unterdrücken kann (Shyr et al., 2010, Elvenes et al., 2011). Außerdem hemmt Pax-6 die Expression des Prostata-spezifischen Antigens und könnte auch so der Tumورprogression entgegenwirken (Shyr et al., 2010, Elvenes et al., 2011).

Ebenfalls für eine tumorsuppressive Wirkung von Pax-6 spricht die Tatsache, dass mehrere Studien ein schlechteres Outcome bei (inaktivierender) Hypermethylierung des Pax-6 Promotors festgestellt haben, unter anderem bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen und Duodenalkarzinomen bei familiärer adenomatöser Polyposis (Berkhout et al., 2007, Zhang et al., 2015). Die DNA-Methylierung erfolgt als epigenetische Modifizierung durch DNA-Methyltransferasen an den CpG-Dinukleotiden der DNA und inaktiviert bei Methylierung

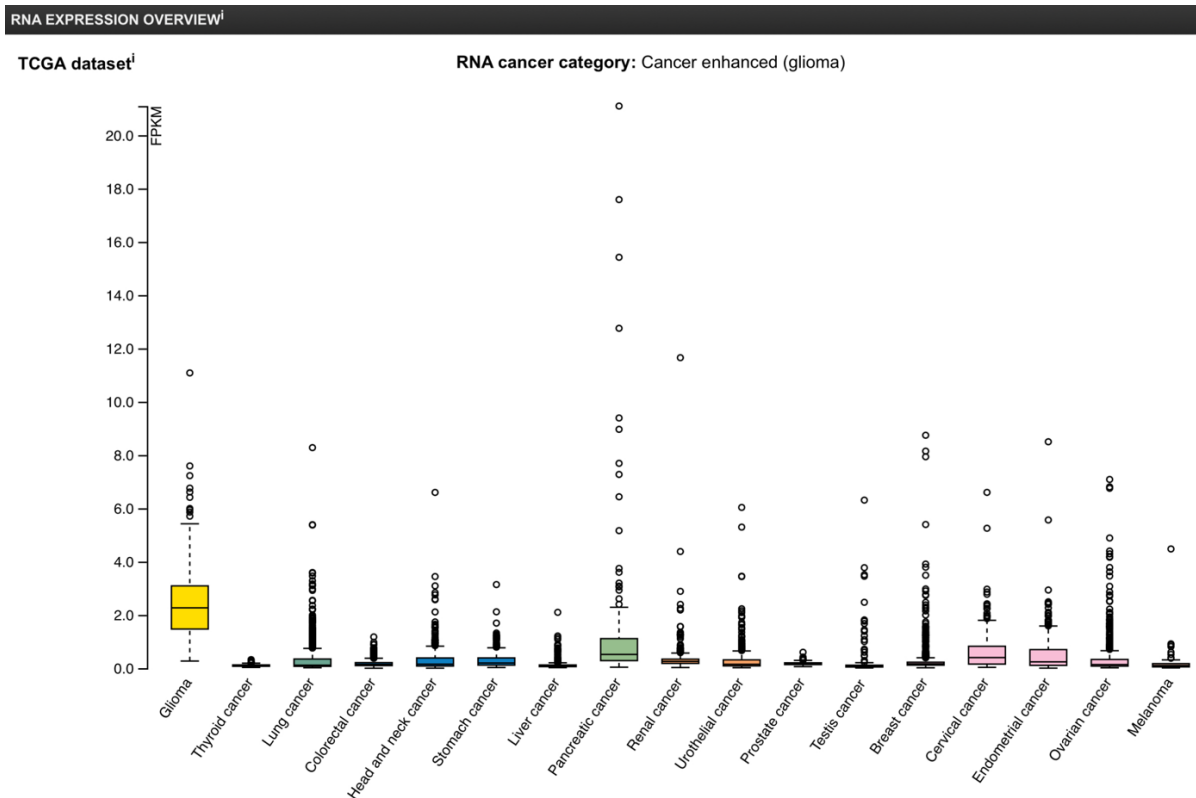


Abbildung 9: Überblick über die RNA-Expression in Tumoren nach dem TCGA-Dataset; entnommen aus <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007372-PAX6/pathology>

eines Promotors generell das betroffene Gen (Kulis et Esteller, 2010, Moore et al., 2013).

Außerdem gibt es auch Argumente für eine onkogene Rolle von Pax-6. So wurde eine Pax-6-induzierte Aktivierung des Enhancers für MET, ein für den Tyrosinkinase-Rezeptor kodierendes Gen, bei Tumoren des Pankreas beschrieben (Mascarenhas et al., 2009). Dieser Tyrosinkinase-Rezeptor ist durch Induktion von Apoptose-Resistenz, Steigerung der Invasivität und des Metastasierungsgrades an der Tumorprogression beteiligt (Du et Lovly, 2018, Saraon et al., 2021). Passend zu einer onkogenen Rolle wurde eine im Vergleich zu Normalgeweben erhöhte Pax-6-Expression in Tumorzellen in uvealen Melanomen des Auges und bei invasivem Brustkrebs (NST) beschrieben (Thill et al., 2011, Xia et al., 2015).

Besonders hervorzuheben ist die Rolle von Pax-6 in neuroendokrinen Tumoren des gastrointestinalen Systems und der Lunge. Einen Überblick über die aktuelle Studienlage dazu gibt Tabelle 3. Wie aus der Darstellung ersichtlich wird, kann Pax-6 in

neuroendokrinen Tumoren des Pankreas, Duodenum, Colon, Rectum, der Lunge und Appendix exprimiert werden, während bisher keine Expression in neuroendokrinen Tumoren des Magens und des Ileums beschrieben wurde (Zhang et al., 2009, Toriyama et al., 2014, Lai et al., 2015, Mohanty et al., 2021). Am häufigsten und am stärksten positiv gefärbt waren dabei kolorektale, duodenale und pankreatische NET. Bei Lebermetastasen neuroendokriner Tumoren wurde lediglich eine Expression von Pax-6 in Metastasen pankreatischen Ursprungs gefunden, nicht aber bei Metastasen mit Ursprung in NET des Duodenums, Ileums, Rectums und der Lunge (Lai et al., 2015). Die Fallzahlen dieser Studien waren insgesamt aber klein.

Tabelle 3: Überblick über die aktuelle Studienlage zur Pax-6-Expression in verschiedenen neuroendokrinen Tumoren.

Publikation	Tumorentität	Anzahl Tumoren	Positiv (%)
Mohanty et al., 2021	Appendix, NET	5	20,00
Mohanty et al., 2021	Colorektaler NET	6	67,00
Lai et al., 2015	Colorektaler NET	10	90,00
Lai et al., 2015	Duodener NET	12	92,00
Mohanty et al., 2021	Duodener NET	4	75,00
Mohanty et al., 2021	Magen, NET	5	0,00
Lai et al., 2015	Magen, NET	10	0,00
Lai et al., 2015	Ileum, NET	22	0,00
Mohanty et al., 2021	Ileum, NET	22	0,00
Lai et al., 2015	Lunge, NET	30	0,00
Toriyama et al., 2014	Lunge, NET (Karzinoid)	51	13,73
Toriyama et al., 2014	Lunge, NET (Großzellig)	106	18,87
Mohanty et al., 2021	Lunge, NET	26	0,00
Lai et al., 2015	Pankreas, NET	26	65,00
Mohanty et al., 2021	Pankreas, NET	50	70,00
Zhang et al., 2009	Pankreas, NET	96	72,92
Lai et al., 2015	Lebermetastase NET (Pankreas)	24	41,67
Lai et al., 2015	Lebermetastase NET (Duodenum)	1	0,00
Lai et al., 2015	Lebermetastase NET (Ileum)	37	0,00
Lai et al., 2015	Lebermetastase NET (Rektum)	1	0,00
Lai et al., 2015	Lebermetastase NET (Lunge)	5	0,00

2.4 Klinische Bedeutung in der pathologischen Diagnostik

In der pathologischen Tumordiagnostik kann bei Tumormetastasen nur selten direkt von der Histologie des Tumorgewebes auf den Tumorursprung geschlossen werden; ein immunhistochemischer Nachweis von nur in spezifischen Geweben vorkommenden Proteinen bietet sich daher an, um den Ursprung eines Tumors einzugrenzen. Die Expression vieler Proteine ist auch für die Bestimmung der Prognose und Festlegung der Therapie wichtig (Lin et Liu, 2014, Dias et al., 2017). Bei neuroendokrinen Tumoren ist die Unterscheidung nach Ursprungsort des Tumors rein morphologisch nicht möglich, hier ist die immunhistochemische Untersuchung der Goldstandard (Bellizzi, 2013, Perren et al., 2017, Bellizzi, 2020).

Eine Übersicht über die bisherigen immunhistochemischen Studien zur Pax-6-Expression in Tumoren zeigt Abbildung 10. Die Studien wurden auf Basis einer Literaturrecherche in der Datenbank PubMed nach den folgenden Kriterien ausgewählt und analysiert: Die ausgewählten Studien mussten mittels immunhistochemischer Färbung gegen Pax-6 durchgeführt worden sein, wobei unberücksichtigt blieb, um welche Klonalität oder ID des Antikörpers es sich dabei handelte. Eine festgelegte Vorgehensweise zur Auswertung der Ergebnisse – beispielsweise nach Intensität der Färbung und Prozentsatz gefärbter Tumorzellen – musste befolgt werden. Die Studien wiesen eine klare Differenzierung zwischen Tumorentitäten auf, die auch in der Auswertung beibehalten wurde. Bei gleichzeitiger Färbung gegen mehrere molekulare Marker wurde in den daraus folgenden Ergebnissen in der Auswertung eindeutig zwischen Markern differenziert. Es wurden Studien mit jeglichen Stichprobengrößen eingeschlossen; in der graphischen Auswertung wurde differenziert, ob $n \leq 10$ (rote Markierung), $11 \leq n \leq 25$ (gelbe Markierung) oder $n > 25$ (grüne Markierung) war. Weiterhin wurde betrachtet, ob es sich um eine Studie am Großschnitt oder am TMA handelte, wobei beide Gewebetypen in die Auswertung eingeschlossen und graphisch nicht unterschieden wurden. Die in den jeweiligen Studien beschriebenen Auswertungskriterien wurden detailliert analysiert. Insbesondere wurden die verfügbaren Parameter für Färbung und Auswertung ermittelt. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die eingeschlossenen Studien, die verschiedene NET untersucht haben und schlüsselt sie auf nach Entität des NET, verwendetem Antikörper, TMA vs. Großschnitt, Anzahl untersuchter Tumoren sowie dem Prozentsatz positiv gefärbter Tumorzellen laut Ergebnissen der Studie.

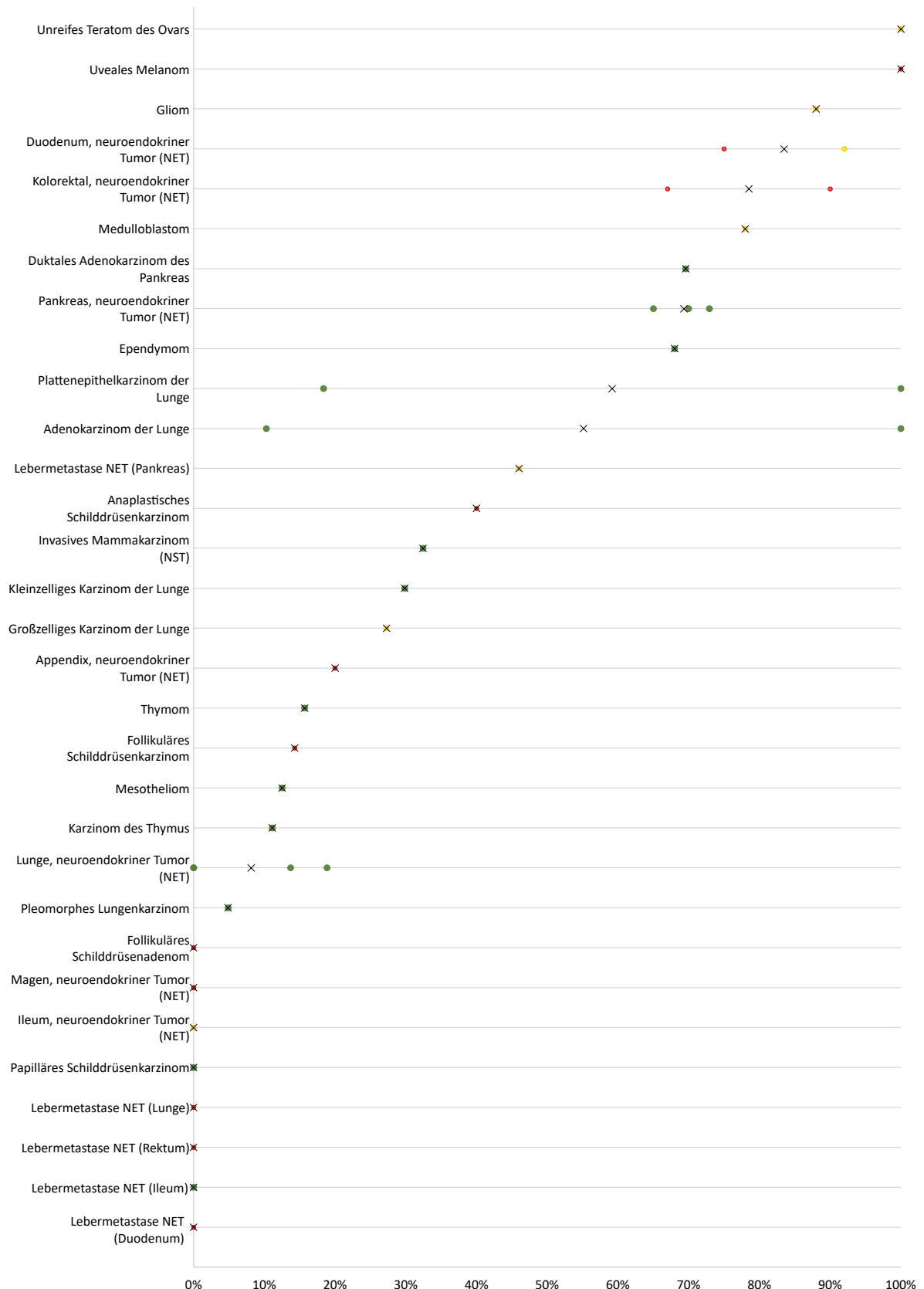


Abbildung 10: Überblick über die aktuelle Studienlage zur Expression von Pax-6 in verschiedenen Tumorentitäten. Legende: $n \leq 10$ (rot); $11 \leq n \leq 25$ (gelb); $n > 25$ (grün). Die Markierung X entspricht dem jeweiligen Durchschnitt der vorliegenden Studienergebnisse zu dieser Tumorentität.

Tabelle 4: Überblick über verschiedene Kriterien der untersuchten Studien zu NET. SCB = Santa Cruz Biotechnology (Hersteller). Z. T. keine Angaben zu Hersteller, Klon-ID, Ursprungstier, Rekombinanz vorhanden.

Publikation	Tumorentität	Antikörper/ Klon-ID	Gewebeinfo	Anzahl Tumoren	Positiv (%)
Mohanty et al., 2021	Appendix, NET	Monoklonal, SCB	TMA	5	20,00
Mohanty et al., 2021	Colorektaler NET	Monoklonal, SCB	TMA	6	67,00
Lai et al., 2015	Colorektaler NET	Maus, Monoklonal, SCB	Großschnitt	10	90,00
Lai et al., 2015	Duodener NET	Maus, Monoklonal, SCB	Großschnitt	12	92,00
Mohanty et al., 2021	Duodener NET	Monoklonal, SCB	TMA	4	75,00
Mohanty et al., 2021	Magen, NET	Monoklonal, SCB	TMA	5	0,00
Lai et al., 2015	Magen, NET	Maus, Monoklonal, SCB	Großschnitt	10	0,00
Lai et al., 2015	Ileum, NET	Maus, Monoklonal, SCB	Großschnitt	22	0,00
Mohanty et al., 2021	Ileum, NET	Monoklonal, SCB	TMA	22	0,00
Lai et al., 2015	Lunge, NET	Maus, Monoklonal, SCB	Großschnitt	30	0,00
Toriyama et al., 2014	Lunge, NET (Karzinoid)	P3U1	TMA	51	13,73
Toriyama et al., 2014	Lunge, NET (großzellig)	P3U1	TMA	106	18,87
Mohanty et al., 2021	Lunge, NET	Monoklonal, SCB	TMA	26	0,00
Lai et al., 2015	Pankreas, NET	Maus, Monoklonal, SCB	Großschnitt	26	65,00
Mohanty et al., 2021	Pankreas, NET	Monoklonal, SCB	TMA	50	70,00
Zhang et al., 2009	Pankreas, NET	Abcam, Hase, Polyklonal	Großschnitt	96	72,92
Lai et al., 2015	Lebermetastase NET (Pankreas)	Maus, Monoklonal, SCB	Großschnitt	24	41,67
Lai et al., 2015	Lebermetastase NET (Duodenum)	Maus, Monoklonal, SCB	Großschnitt	1	0,00
Lai et al., 2015	Lebermetastase NET (Ileum)	Maus, Monoklonal, SCB	Großschnitt	37	0,00
Lai et al., 2015	Lebermetastase NET (Rektum)	Maus, Monoklonal, SCB	Großschnitt	1	0,00
Lai et al., 2015	Lebermetastase NET (Lunge)	Maus, Monoklonal, SCB	Großschnitt	5	0,00

Eine Expression von Pax-6 scheint in neuroendokrinen Tumoren des Pankreas besonders häufig vorzukommen. Die drei Studien, in denen die Pax-6-Expression in Pankreas-NET untersucht wurden, liefern Ergebnisse von 65,00% (Lai et al., 2015), 70,00% (Mohanty et al., 2021) und 72,92% (Zhang et al., 2009). Zwei dieser drei Studien (Lai et al., 2015 und Zhang et al., 2009) waren an Großschnitten durchgeführt worden. Lai et al. untersuchten 26 Tumoren, Mohanty et al. 50 und Zhang et al. 96 Tumoren. Für andere untersuchte Tumorentitäten war die Studienlage teilweise diskrepant. Beispielsweise liegen die ermittelten Werte für Adenokarzinome der Lunge zwischen 10,28% und 100% (Toriyama et al., 2014, Kiselev et al., 2018) und für Plattenepithelkarzinome der Lunge zwischen 18,35% und 100% (Toriyama et al., 2014, Kiselev et al., 2018). Diese Unterschiede lassen sich grundsätzlich durch die Verwendung verschiedener Antikörper, unterschiedlicher Protokolle oder divergierender Auswertungskriterien erklären. Zusätzlich wurden bei vielen der Studien nur kleine Anzahlen an Tumoren untersucht, was die Aussagekraft der Ergebnisse grundsätzlich etwas einschränkt.

2.5 Andere potenzielle Marker für pankreatische NEN

2.5.1 Islet-1 (Isl-1)

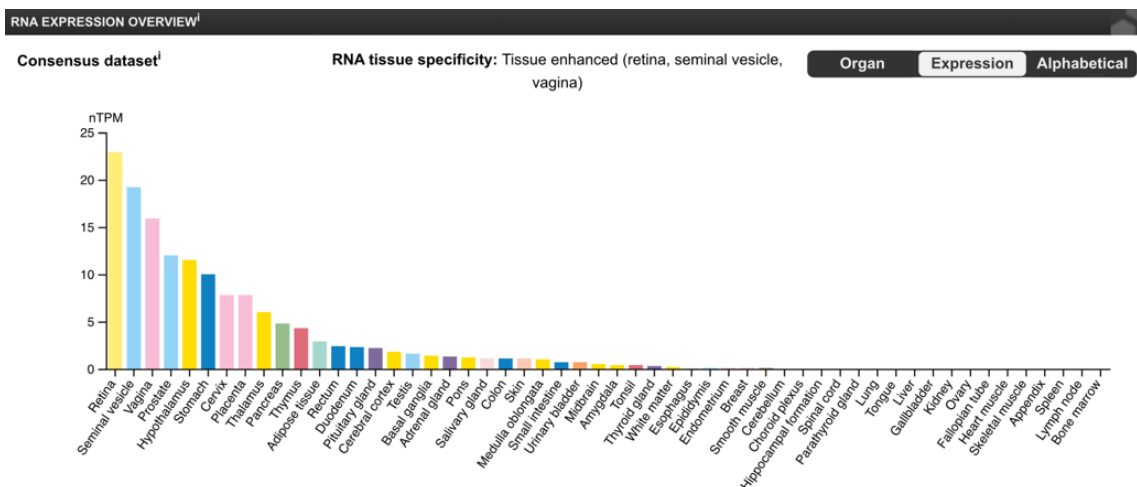


Abbildung 11: RNA-Expression von Isl-1 in verschiedenen Gewebstypen; entnommen aus <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000016082-ISL1/tissue>.

Isl-1 gehört zur Familie der LIM/Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren und reguliert seine Zielgene über Bindung an deren Enhancer. Isl-1 spielt unter anderem eine Rolle bei der Herzentwicklung, bei der er in Progenitorzellen des rechten Ventrikels und der Ein- und Ausflussbahn exprimiert wird (Bu et al., 2009), weiterhin in der Genese von Motoneuronen (Pfaff et al., 1996) und in der Differenzierung endokriner pankreatischer Zellen (Ahlgren et al., 1997, Du et al., 2009). Außerdem wirkt Isl-1 am Proglukagon-Promotor (Wang, Drucker, 1995), reguliert Angiogenese (Barzelay et al., 2010, Xiong et al., 2016) und steuert die Differenzierung verschiedener retinaler Zelltypen wie Bipolar- und Amakrinzellen (Elshatory et al., 2007) und retinalen Ganglionzellen (Pan et al., 2008). Abbildung 11 gibt einen

Überblick über die RNA-Expression von Isl-1 in verschiedenen Gewebetypen. Es fällt auf, dass die gewebespezifische Expression von Isl-1 deutlich breiter gestreut ist als die von Pax-6. Die einzelnen Zelltypen, in denen am meisten Isl-1 exprimiert wird, sind Bipolarzellen der Retina, endokrine Zellen des Pankreas und enteroendokrine Zellen des Gastrointestinaltraktes (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000016082-ISL1/single+cell+type>).

In Tumoren haben einzelne Studien eine potenzielle onkogene Wirkung von Isl-1 nachgewiesen, so beispielsweise in Gallenwegstumoren (Hansel et al., 2003), Brustkrebs (Rønneberg et al., 2011), Phäochromozytomen (Hattori et al., 2010) und neuroendokrinen Tumoren des Pankreas (Schmitt et al., 2008, Koo et al., 2012). Eine Übersicht über die Expression von Isl-1 in Tumoren nach dem TCGA-Dataset gibt Abbildung 12.

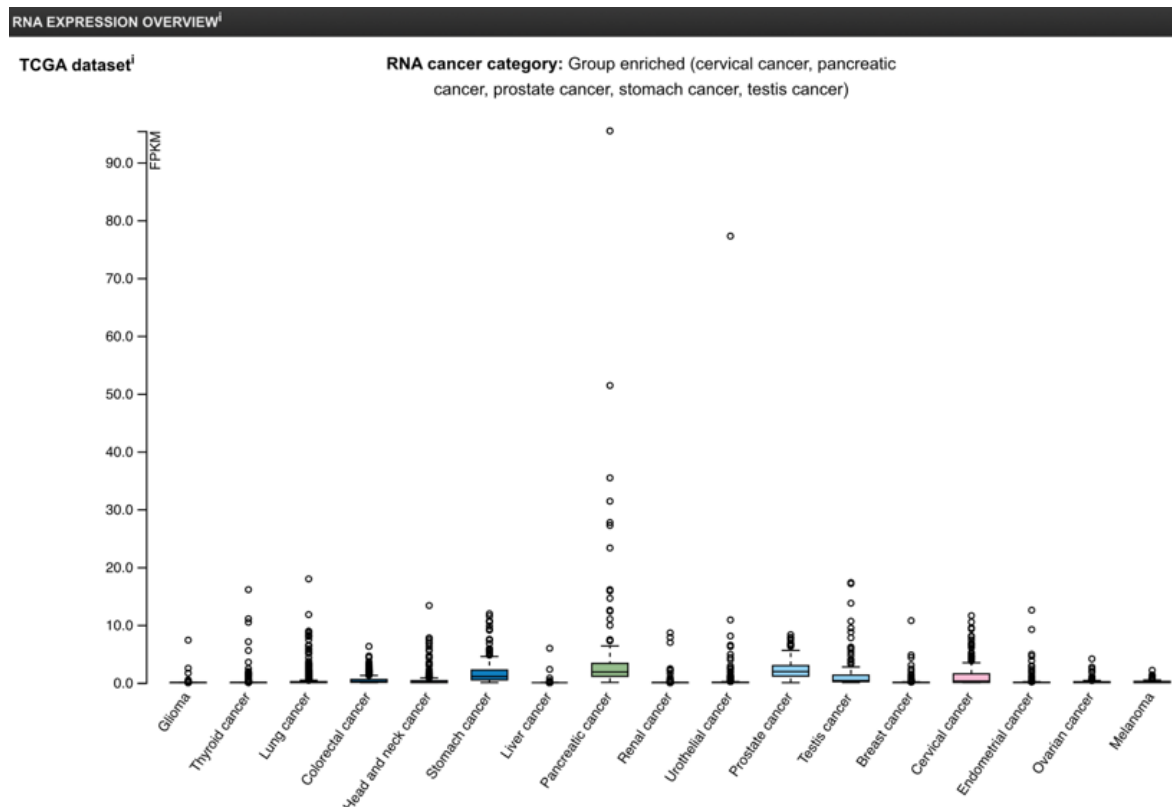


Abbildung 12: RNA-Expression von Isl-1 nach dem TCGA-Dataset; entnommen aus <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000016082-ISL1/pathology>.

Eine Übersicht über die bisherige Lage immunohistochemischer Studien zur Expression von Isl-1 in primären Tumoren gibt Abbildung 13. Generell lässt sich erkennen, dass keine besonders große Anzahl an Studien zur Isl-1-Expression in Tumoren existiert. Die vorhandenen Studien sind aufgrund ihrer oftmals kleinen Fallzahlen in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Dies ist auch erkennbar in einer großen Streuung der Ergebnisse verschiedener Studien zur gleichen Tumorentität. Beispielsweise finden sich für kolorektale neuroendokrine Tumoren Ergebnisse zwischen 0% und 93,55% (Schmitt et al., 2008, Koo et al., 2012). Auch beim pankreatischen NET sind Spannweiten der Expressionsdaten

zwischen 25 % und 93,75% zu finden (Lee et al., 2018, Juhlin et al., 2020). Insofern lassen sich aus den Daten der bisherigen Studien keine eindeutigen Schlüsse auf die Expression in verschiedenen Tumorentitäten ziehen.

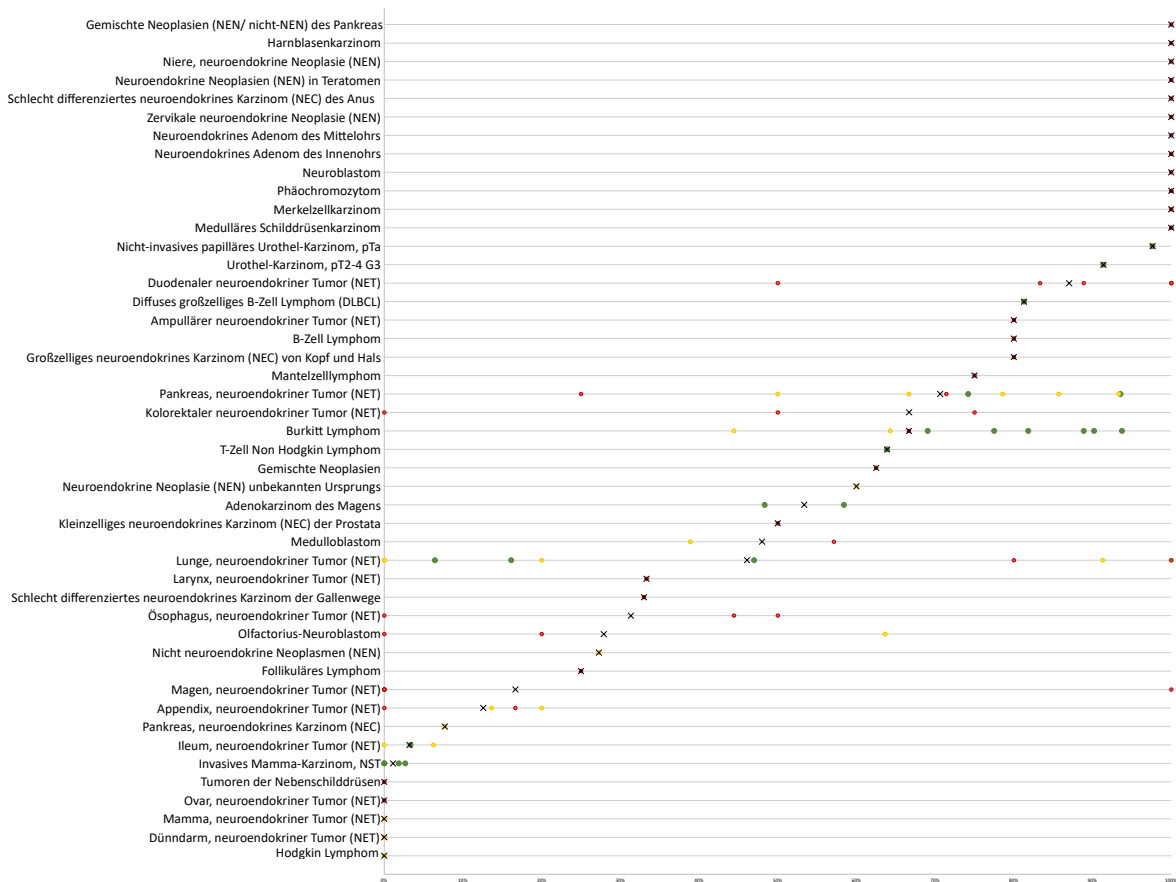


Abbildung 13: Überblick über die aussagekräftigsten aktuellen Studien zur Expression von Isl-1 in verschiedenen Tumorentitäten.

Trotzdem haben die Autoren einzelner Studien Isl-1 als hoch spezifischen und sensitiven Marker für neuroendokrine Tumoren des Pankreas beschrieben (Schmitt et al., 2008, Koo et al., 2012, Graham et al., 2013, Bellizzi, 2020). Eine Übersicht der bisherigen Studienergebnisse zur Sensitivität und Spezifität von Isl-1 für NET gibt Tabelle 5.

Tabelle 5: Vergleich verschiedener Studienergebnisse zur Sensitivität und Spezifität von Isl-1.

Studie	Jahr	Entität	Sensitivität	Spezifität
Schmitt et al.	2008	Pankreas, neuroendokriner Tumor (NET)	74,3%	78,4%
		Metastasen pankreatischer NET	77,8%	100%
Koo et al.	2012	Pankreas, neuroendokriner Tumor (NET)	82%	82%
		Metastasen pankreatischer NET	68%	98%
Graham et al.	2013	Pankreas, neuroendokriner Tumor (NET)	88%	80%
Juhlin et al.	2020	Neuroendokrine Neoplasmen	65%	73%

2.5.2 Progesteron-Rezeptor

Der Progesteron-Rezeptor ist ein nukleärer Steroidhormonrezeptor, der vor allem in Gewebetypen des weiblichen Reproduktionstraktes und der Mamma sowie der glatten Muskulatur exprimiert wird. Eine Übersicht über die Expression in verschiedenen Gewebetypen gibt Abbildung 14.

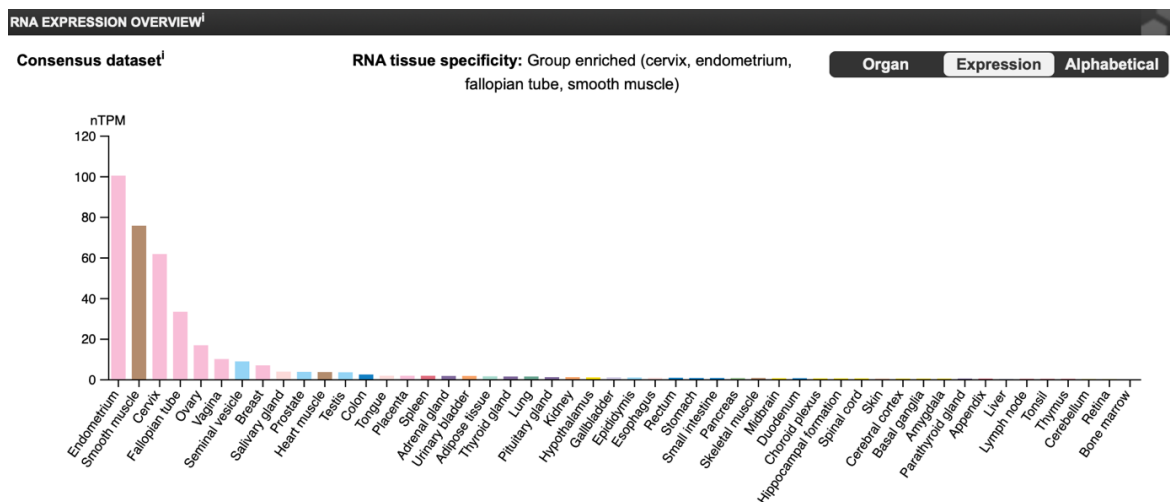


Abbildung 14: RNA-Expression von PR in verschiedenen Gewebetypen; entnommen aus <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000082175-PGR/tissue>

Auf Zellebene wird PR besonders in Stromazellen des Endometriums, glandulären und luminalen Zellen exprimiert (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000082175-PGR/single+cell+type>). PR entfaltet seine Hauptfunktionen in der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft, aber auch in der Entwicklung der Brustdrüse in Pubertät und Schwangerschaft, reguliert die neuronale Erregbarkeit im ZNS, inhibiert die Kontraktilität glatter Muskulatur und unterstützt die Lungenbildung (Lydon et al., 1995, Briskin et al., 1998, Wang et al., 2003, Shao et al., 2006, Kapur et Joshi, 2021).

PR wird genau wie der Östrogen-Rezeptor als tumorspezifischer immunohistochemischer Marker für Tumoren der Mamma, Ovarien und des Endometriums genutzt (Ettinger et al., 2011). Allerdings wird PR laut aktueller Studienlage auch in weiteren Tumorentitäten, unter anderem auch dem pankreatischen NET exprimiert und ist dort mit einem höheren progressionsfreien Überleben assoziiert (Viale et al., 1992, Estrella et al., 2014, Kim et al., 2017). Außerdem wurde PR deutlich häufiger in pankreatischen, als in extrapankreatischen NET exprimiert, wobei auch eine Expression bei duodenalen NET beobachtet wurde (Viale et al., 1992, Arnason et al., 2011, Zimmermann et al., 2016). Die Autoren einer weiteren Studie wiederum bestätigten zwar die Expression von PR in NET generell, stellten jedoch ihre Spezifität in Frage (Ohara et al., 2016).

Aufgrund der eingeschränkten Datenlage auch bei weiteren Tumorentitäten führten Viehweger et al. daher eine umfassende Studie an mehr als 16000 Gewebeproben am TMA durch und fanden unter anderem heraus, dass die PR-Expression im Bereich der nicht gynäkologischen und Mamma-Tumoren bei Pankreas-NET und -NEC mit 54,3% beziehungsweise 35,7% positiver Färbung am höchsten war. Weitere neuroendokrine Tumorentitäten wurden mit 16,7% (Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom der Prostata), 5,9% (Appendix-NET), und 4,3% (kleinzelliges NEC der Harnblase) deutlich weniger häufig beziehungsweise im Falle der restlichen neuroendokrinen Tumorentitäten gar nicht mit dem PR-Antikörper angefärbt (Viehweger et al., 2022). Für die PR-Färbung pankreatischer NEN ergibt sich im Rahmen der Daten der Viehweger-Studie eine Sensitivität von 52,5% und eine Spezifität von 91,3% (Viehweger et al., 2022).

2.5.3 GAD2

GAD2 (Glutamat Decarboxylase 2) – auch GAD65 – ist ein intrazellulär lokalisiertes Enzym, dessen Funktion gemeinsam mit dem Enzym GAD67 in der Herstellung des inhibitorischen Neurotransmitters Gamma-Aminobutyrat und damit der Regulation neuronaler Erregbarkeit im Gehirn sowie in der Insulinproduktion des Pankreas liegt (Baekkeskov et al., 1990; Erlander et al., 1991; Lee et al., 2019). Es wird in verschiedenen Geweben des ZNS und in den Langerhans-Inseln des Pankreas exprimiert (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000136750-GAD2/summary/rna>). Einen detaillierten Überblick über die Expression in verschiedenen Gewebetypen gibt Abbildung 15. Dabei fällt vor allem die überaus selektive Gewebsexpression auf, die einen diagnostischen Vorteil bietet.

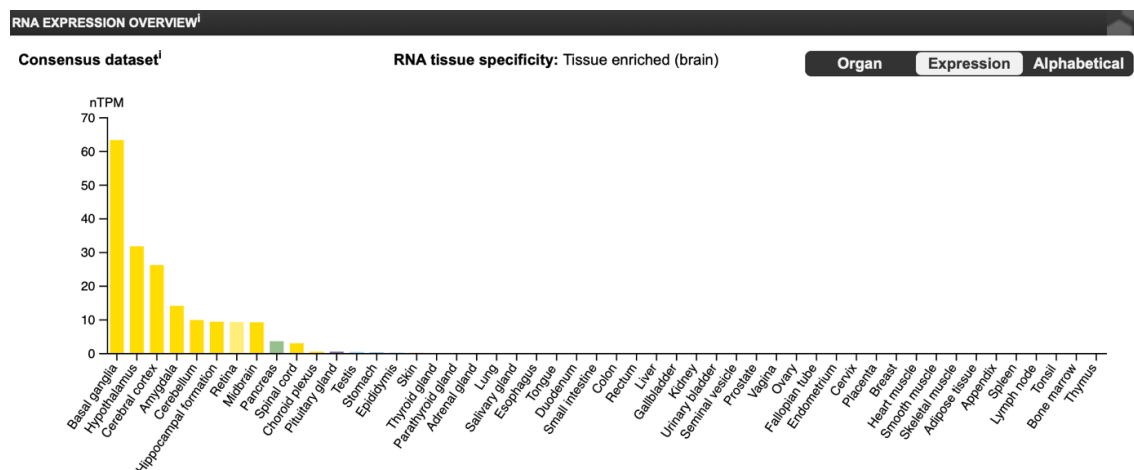


Abbildung 15: RNA-Expression von GAD2 in verschiedenen Gewebetypen; entnommen aus <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000136750-GAD2/tissue>

Auf Zellebene wird GAD2 analog seiner Wirkung in pankreatischen Beta-Zellen, GABAergen inhibitorischen Neuronen sowie zu geringeren Anteilen in Oozyten und

Astrozyten exprimiert (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000136750-GAD2/single+cell+type>). Pathologische Veränderungen von GAD2 werden beispielsweise mit Morbus Alzheimer, Autismus und Diabetes mellitus Typ 1 in Verbindung gebracht (Baekkeskov et al., 1990; Schwab et al., 2013; Wiebe et al., 2019). Bisherige Studien zur Expression in Tumorgeweben ergaben eine eventuelle Rolle von GAD2 in Entstehung, Progression und Prognose von Magen- und Gallenblasenkarzinomen, wobei eine erhöhte Expression von GAD2 allgemein mit schlechterer Prognose einherging (Kleinrok et al., 1998; Opolski et al., 2000; Matuszek et al., 2001; Deng et al., 2013; Song et al., 2013).

Aufgrund der äußerst kleinen Datenmengen führten Lennartz et al. daher eine umfassende TMA-Studie an über 19.000 Gewebeproben durch. Diese bestätigte zunächst die GAD2-Expression in Normalgeweben der Langerhans-Zellen sowie cerebraler und cerebellärer Gewebe. Im Tumorgewebe ergab sich eine zytoplasmatische GAD2-Expression vor allem im Bereich pankreatischer NET mit 63,2% sowie pankreatischer NEC mit 58,3%. Darüber hinaus stellten die Autoren der Studie GAD2-Expression in neuronalen Granularzelltumoren (37,0%) und neuroendokrinen Tumoren der Lunge (11,1%) fest. Weitere geringe Expressionsdaten von unter 10% wurden in Tumorentitäten wie Paragangliomen, medullären, anaplastischen und follikulären Schilddrüsenkarzinomen, Ganglioneuromen, kleinzelligen NEC der Harnblase, Ewing-Sarkomen, ampullären und duktaalen Adenokarzinomen des Pankreas, Adenokarzinomen der Harnblase, des Magens und der Prostata, serösen Ovarialkarzinomen, Nebennierenrindenkarzinomen, Plattenepithelkarzinomen der Vulva und Warthin-Tumoren der Parotis gefunden (Lennartz et al., 2024). Für die GAD2-Färbung pankreatischer NEN ergibt sich im Rahmen der Daten der Lennartz-Studie eine Sensitivität von 64,2% und eine Spezifität von 96,3% (Lennartz et al., 2024).

2.6 Ziel der Studie

Um festzustellen, ob sich Pax-6 als Tumormarker für neuroendokrine Tumoren des Pankreas eignet, ist es nun notwendig, eine große Zahl verschiedener Tumorentitäten mithilfe eines validierten Antikörpers unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen. Dazu wurden in dieser Studie 19.214 Tumoren 150 verschiedener Entitäten und Subentitäten mithilfe eines Tissue Micorarrays auf die Expression von Pax-6 untersucht. Die Validierung unseres Antikörpers und des Färbeprotokolls erfolgte an 608 Gewebeproben aus 76 verschiedenen Normalgewebstypen. Zudem sollte geklärt werden, inwiefern sich Pax-6 mit GAD2 und PR – zwei weiteren von der UKE-Pathologie kürzlich charakterisierten Markern für pankreatischen Ursprung neuroendokriner Tumoren – in der Diagnostik dieser Tumoren ergänzen könnte.

3 Material und Methoden

3.1 Die Tissue-Microarray-Technik

Das Tissue-Microarray (TMA)-Verfahren wird bereits seit 1998 verwendet und ist ein schnelles, kostengünstiges und höchst standardisiertes Verfahren zur gleichzeitigen Untersuchung hunderter Tumor-Gewebsproben auf einem einzelnen Objektträger (Kononen et al., 1998; Mengel et al., 2003). Grundlage dafür ist die Erstellung eines TMA-Blockes durch Einbringen zylindrischer Gewebsproben aus Tumor- oder Normalgewebe in einen vorgestanzten Paraffinblock. Dieser Block kann dann am Mikrotom geschnitten und die entstandenen Schnitte durch immunhistochemische Methoden gegen ein bestimmtes Protein gefärbt werden. Durch die große Zahl an auf dem Schnitt enthaltenen Gewebsproben können parallel und unter gleichen Bedingungen über 600 Fälle von einem einzigen Pathologen ausgewertet werden, was nicht nur zu einer massiven Kostenreduktion und Beschleunigung, sondern auch zu einer hohen Standardisierungsrate des Verfahrens führt (Mengel et al., 2003; Simon et al., 2004).

Zu beachten ist jedoch, dass zugunsten dieser positiven Eigenschaften der TMA-Technik ein ganz erheblicher Aufwand bei der Erstellung der TMA-Blöcke betrieben werden muss (Bubendorf et al., 2001). Diese gliedert sich in die im Folgenden beschriebenen fünf Arbeitsschritte, die sich teilweise über einen Zeitraum von Jahren hinweg erstrecken können:

3.1.1 Auswahl potenziell geeigneter Fälle für den TMA

Zunächst erfolgt eine Recherche per Volltextsuche in Datenbanken wie dem Pathologie-Informationssystem des UKE, um potenziell für den TMA interessante Tumortypen zu identifizieren. Diese werden anhand der pathologischen Berichte manuell auf Eignung untersucht, insbesondere in Hinblick auf Eindeutigkeit der Diagnose, ausreichende Tumorgroße sowie möglichst geringe Tumornekrosen und regressive Veränderungen.

3.1.2 Histologische Beurteilung durch einen Pathologen

Die vorgescreenten Tumoren werden als nächstes einem erfahrenen Pathologen zur Beurteilung ihrer Eignung vorgelegt. Dazu werden alle verfügbaren HE-Schnitte zu jedem Fall ausgelegt und nach der Größe des angeschnittenen Tumorgewebes beurteilt. Diese muss mindestens 1cm² im Durchmesser betragen, um zu gewährleisten, dass der entsprechende Block später technisch einwandfrei in den TMA-Block eingearbeitet werden kann. Durch Filzstiftmarkierung um das Tumorgewebe wird der später für den TMA-Block zu nutzende Teil des Schnittes markiert, erkennbar in Abbildung 16.



Abbildung 16: Foto eines Gewebsblocks mit zugehörigem histologischen Schnitt, in dem der später zu stanzende Bereich des Tumors markiert wurde.

Dann werden die zu den geeigneten Schnitten zugehörigen Blöcke aus dem Archiv herausgesucht und ebenfalls auf ihre Qualität untersucht. Eine Kontraindikation zur Verwendung im TMA-Block stellen beispielsweise eine gröbere Beschädigung des Tumorgewebes oder eine Dicke des Paraffinblockes <2mm dar, da in diesen Fällen keine beziehungsweise nicht ausreichend lange Gewebszylinder aus entnommen werden können – ein so entstandener TMA-Block könnte nicht oft genug mit dem Mikrotom für Studien geschnitten werden, da das Gewebe nach relativ wenigen Schnitten enden würde.

3.1.3 TMA-Organisation

Anschließend werden die als geeignet identifizierten Gewebsblöcke in die am UKE vorliegende standardisierte TMA-Liste eingetragen, um ihre jeweilige Position im zu erstellenden TMA festzulegen. Jeder TMA ist standardmäßig in sechs Sektoren A-F eingeteilt, die aufgrund ihrer Asymmetrie und der ungleichen Anzahl von Gewebssspots auch bei Rotation des TMA-Schnittes in der Auswertung gut voneinander unterschieden werden können. Die Gewebssspots sind in den einzelnen Sektoren numerisch und mit Buchstaben kodiert, um eine eindeutige Auswertung zu ermöglichen: So werden die Zeilen mit den Ziffern 1-9, die Spalten mit Buchstaben a-r bezeichnet, je nach tatsächlicher Größe des Sektors. Abbildung 17 zeigt den schematischen Aufbau eines Standard-TMAs. Je nach ihrer Position auf dem zu erstellenden TMA werden die Tumorblöcke und die dazugehörigen Schnitte mit den eingezeichneten Tumorgrenzen von A1a bis F9e sortiert.

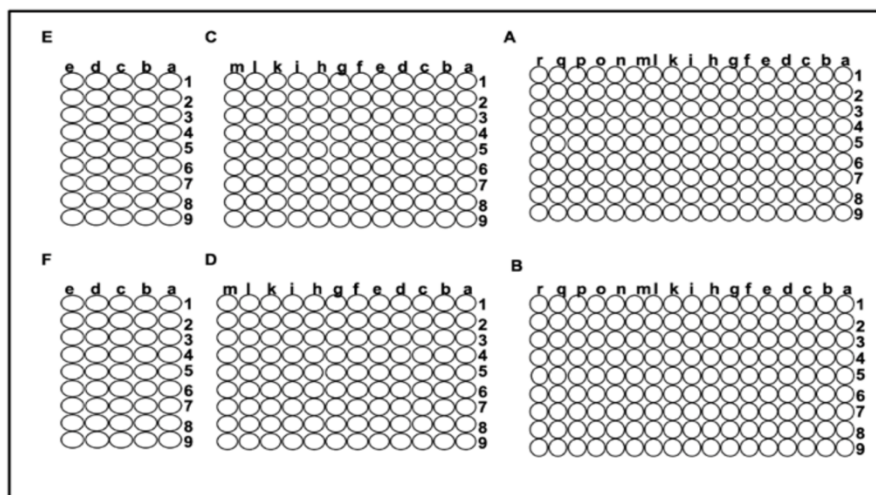


Abbildung 17: Schematischer Aufbau eines standardmäßigen TMAs am UKE

3.1.4 Herstellung des TMAs

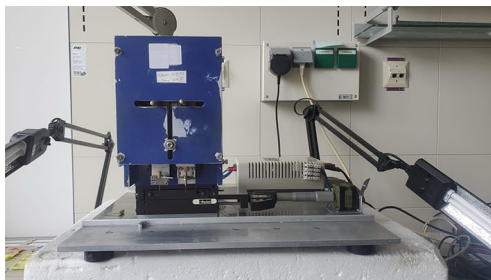
Im nächsten Schritt werden die durch Mitarbeiter der UKE-Pathologie entwickelten semi-automatischen Arrayer (M. und C. Mirlacher) genutzt, um aus den Gewebsblöcken zylindrische Proben zu entnehmen und in bereitliegende Paraffinblöcke zu stanzen, um den TMA zu erstellen. Die folgenden Erläuterungen können anhand von Abbildung 18 besser nachvollzogen werden.

Über eine mechanische Umschaltvorrichtung kann der Bediener des Gerätes zum einen den Bohrer bedienen, um exakt 0,6mm durchmessende Löcher in den neuen Paraffinblock zu stanzen. Zum anderen wird die Bedienung einer Hohnadel ermöglicht, mit deren Hilfe ebenfalls exakt 0,6mm durchmessende Gewebszylinder aus dem im HE-Schnitt markierten Tumorbereichs des Donorblocks entnommen und mittels einer Stahldrahtvorrichtung in das durch den Bohrer vorgestanzte Loch im Empfängerblock gesetzt werden können. Die Umschaltvorrichtung des Arrayers erlaubt es dabei, zwischen dem Donorblock und dem Mehrfachblockhalter für die Empfängerblöcke hin und her zu wechseln, ohne die Position unter der Hohnadel beziehungsweise dem Bohrer zu verändern. Außerdem kann der jeweilige Empfänger-TMA-Block über ein kleines Podest abgedeckt werden, während die Proben aus den Spenderblöcken entnommen werden, um eine Kontamination der entstehenden TMA-Blöcke zu verhindern.

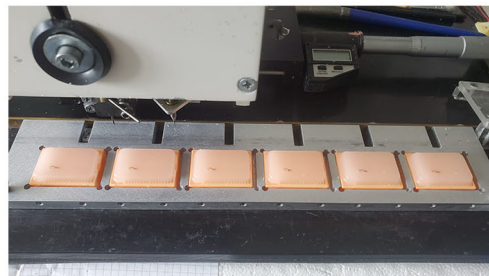
Dabei werden jeweils mindestens sechs, teilweise bis zu zwölf Replikate eines TMAs hergestellt. Dies wird erreicht, indem auf dem Mehrfachblockhalter bis zu sechs Empfängerblöcke (bei Verwendung zweier Mehrfachblockhalter bis zu zwölf) gelagert werden, die nacheinander mit Tumorzylindern aus dem gleichen Spenderblock gefüllt werden. Dazu wird mit der Hohnadel Gewebe aus unmittelbar an die erste Entnahmestelle

angrenzenden Tumorgebieten entnommen, um die Vergleichbarkeit der TMA-Replikate auch bei eventueller Heterogenität des Tumors so hoch wie möglich zu halten.

Sobald alle Replikate einer Koordinate gesetzt wurden, ermöglicht es ein elektrischer Schrittmotor im Arrayer dem Bediener, von dieser Koordinatenposition automatisch exakt um immer den gleichen Abstand zur nächsten zu springen. Somit lässt sich der Prozess der Vorbereitung des TMA-Blocks per Bohrer, der Entnahme des Gewebes per Hohlneedle und des Einsetzens in den TMA-Block nach und nach für jede Koordinate der wachsenden TMA-Blöcke wiederholen, bis alle Tumorblöcke einer Serie eingesetzt wurden oder die letzte Koordinate des Blocks erreicht ist.



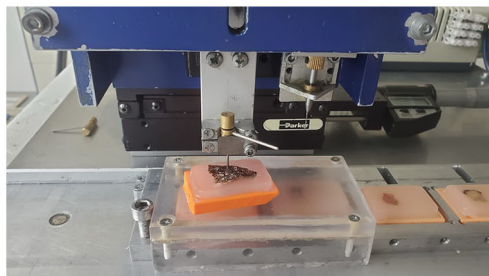
Vorderansicht des Arrayers



Sechs Empfängerblöcke auf dem Mehrfachblockhalter



Aufsicht der elektronischen Verschaltung des Arrayers



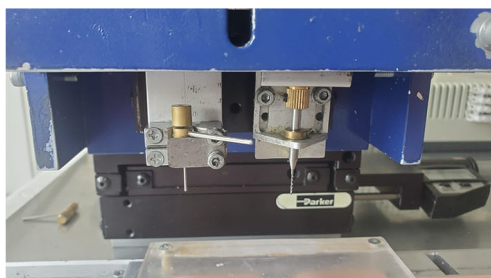
Entnahme von Donorblock-Gewebe mittels Hohlneedle



Ansicht des zugehörigen Schrittmotors



Detailansicht bereits teilweise gestanzter TMAs



Detailansicht von Bohrer (rechts) und Hohlneedle (links)

Abbildung 18: Übersicht über den Aufbau eines UKE-Arrayers und einzelne Schritte der TMA-Herstellung

3.1.5 Erstellung des TMA-Datenfiles

Zuletzt wird der fertige, anonymisierte Datenfile zum TMA erstellt, der eine Zuordnung zu personenbezogenen Daten unmöglich macht. Während die Patientenzuordnung zuvor bereits durch eine Pseudonymisierung durch Vergabe einer Biopsienummer erschwert wurde, bestünde in diesem Zustand theoretisch noch die Gefahr, dass bei einem Hackerangriff auf das Pathologie-Informationssystem des UKE eine Zuordnung dieser Biopsienummer zum Klarnamen der Patienten möglich wäre. Nach der erfolgreichen Erstellung des TMA wird die Biopsienummer nicht mehr länger gebraucht und kann permanent aus dem TMA-Datenfile gelöscht werden, was zu einer vollständigen Anonymisierung der Daten und Konformität mit Datenschutzrichtlinien führt. Eine Zuordnung der Gewebssspots im fertigen Datenfile zu den klinisch-pathologischen Daten über definierte Koordinaten kann trotzdem problemlos erfolgen. Tabelle 6 zeigt einen beispielhaften anonymisierten Datenfile.

Tabelle 6: Anonymisierter TMA-Datenfile (Lungenkarzinom, LUN 5.2) zur besseren Darstellung des Aufbaus.

Array_Part ▾	Lokalisation ▾	Entität ▾	Tumordurchmesser (mm) ▾	pT ▾	pN ▾	R ▾
A	B 4g	Plattenepithelkarzinom	72	pT3	0	1
A	B 4h	Plattenepithelkarzinom	25	pT1	0	0
A	B 4i	Plattenepithelkarzinom	55	pT2	3	0
A	B 4k	Plattenepithelkarzinom	19	pT1	0	0
A	B 4l	Plattenepithelkarzinom	35	pT2	2	0
A	B 4m	Plattenepithelkarzinom	32	pT2	0	0

3.2 Verwendete TMA-Blöcke für die Pax-6-Studie

Für die vorliegende Pax-6-Studie wurden zwei TMA-Sets genutzt.

Beim ersten Set handelt es sich um einen Normalgewebs-Array, der Gewebssproben von insgesamt 8 Patienten enthält, die aus insgesamt 76 verschiedenen, standardmäßig definierten Gewebskategorien stammen. Damit ergibt sich eine Gesamtzahl von 608 Normalgewebssproben aus 8 verschiedenen Individuen. Die genaue Zusammensetzung des Normalgewebs-Arrays wird ersichtlich aus Tabelle 7.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Normalgewebs-Arrays am UKE.

Position	Organ, Gewebe/ Lokalisation	Position	Organ, Gewebe/ Lokalisation
1	Aorta, Endothel	39	Rektum, Mukosa
2	Aorta, Media	40	Gallenblase, Epithel
3	Herz	41	Leber
4	Quergestreifte Skelettmuskulatur	42	Pankreas
5	Zunge, Muskulatur	43	Glandula parotis
6	Uterus, Myometrium	44	Glandula submandibularis
7	Appendix, muskuläre Wand	45	Glandula sublingualis
8	Ösophagus, muskuläre Wand	46	Knochenmark
9	Magen, muskuläre Wand	47	Duodenum, Brunner'sche Drüse
10	Ileum, muskuläre Wand	48	Niere, Rinde
11	Colon descendens, muskuläre Wand	49	Niere, Mark
12	Nierenbecken, muskuläre Wand	50	Prostata
13	Harnblase, muskuläre Wand	51	Glandula vesiculosa
14	Penis, Corpus spongiosum	52	Epididymis
15	Ovar, Stroma	53	Hoden
16	Fettgewebe	54	Bronchus, Mukosa
17	Haut	55	Bronchus, Drüsen
18	Haut, Haarfollikel, Talgdrüsen	56	Sinus paranasales
19	Lippe, Mukosa	57	Lunge
20	Mundhöhle	58	Mamma
21	Tonsille, Oberflächenepithel	59	Endozervix
22	Analkanal, Haut	60	Endometrium, Proliferation
23	Analkanal, Übergangszone	61	Endometrium, Sekretion
24	Ektozervix	62	Tuba uterina, Mukosa
25	Ösophagus, Plattenepithel	63	Frühe Plazenta, Dezidua
26	Nierenbecken, Urothel	64	Ovar, Corpus luteum
27	Harnblase, Urothel	65	Ovar, follikuläre Zyste
28	Reife Plazenta, Amnion, Chorion	66	Frühe Plazenta
29	Lymphknoten	67	Reife Plazenta
30	Milz	68	Nebennierenrinde
31	Thymus	69	Nebenschilddrüse
32	Tonsille	70	Schilddrüse
33	Magen, Antrum	71	Kleinhirn, Rinde (graue Substanz)
34	Magen, Corpus	72	Kleinhirn, Mark (weiße Substanz)
35	Duodenum, Mukosa	73	Großhirn, graue Substanz
36	Ileum, Mukosa	74	Großhirn, weiße Substanz
37	Appendix, Mukosa	75	Hypophyse, Hinterlappen/ Infundibulum
38	Colon descendens, Mukosa	76	Hypophyse, Vorderlappen

Beim zweiten verwendeten TMA-Set handelt es sich um einen Multitumor-Array, in dem 19.214 Tumor-Gewebsproben aus insgesamt 150 verschiedenen Tumortypen und Subtypen enthalten sind. Tabelle 8 gibt einen genauen Überblick über die Zusammensetzung des Multitumor-TMAs (MTA). Alle Gewebeproben stammten aus den Archiven des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, dem Institut für Pathologie des Klinikums Osnabrück sowie der Abteilung Pathologie des Akademischen Klinikums Fürth. Die Nutzung der archivierten Reste diagnostischer Gewebeproben für die Herstellung von TMAs und ihre Analyse zu Forschungszwecken sowie die Analyse der Patientendaten wurden im Einklang mit lokalen Gesetzen (HmbKHG, §12) vom lokalen Ethikkomitee (Ethikkomitee Hamburg, WF-049/09) genehmigt. Sämtliche Arbeiten wurden in Einklang mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Daten zur Expression von GAD2 und PR waren aus früheren Studien an denselben Tumor-TMAs vorhanden (Viehweger et al., 2022; Lennartz et al., 2024).

Tabelle 8: Genaue Zusammensetzung des für die Pax-6-Studie verwendeten Multitumor-Arrays.

Organsystem	Tumorentität	Probenzahl auf TMA (n)
Haut	Pilomatrixom	35
	Basalzellkarzinom	89
	Benigner Nävus	29
	Plattenepithelkarzinom der Haut	145
	Malignes Melanom	65
	Malignes Melanom (Lymphknotenmetastasen)	86
	Merkelzell-Karzinom	48
Kopf und Hals	Plattenepithelkarzinom des Larynx	109
	Plattenepithelkarzinom des Pharynx	60
	Orales Plattenepithelkarzinom des Mundbodens	130
	Pleomorphes Adenom der Glandula Parotis	50
	Warthin-Tumor der Glandula Parotis	104
	Adenokarzinom, NOS (Papilläres Zystadenokarzinom)	135
	Karzinom des Speicheldrüsen-Ausführungsganges	15
	Azinuszellkarzinom der Speicheldrüse	181
	Adenoides zystisches Karzinoma der Speicheldrüse	180
	Basalzell-Adenokarzinom der Speicheldrüse	25

Organsystem	Tumorentität	Probenzahl auf TMA (n)
Kopf und Hals	Basalzelladenom der Speicheldrüse	101
	Epithelial-myoepitheliales Karzinom der Speicheldrüse	53
	Mukoepidermoides Karzinom der Speicheldrüse	343
	Myoepitheliales Karzinom der Speicheldrüse	21
	Myoepitheliom der Speicheldrüse	11
	Polymorphes Adenokarzinom, low grade, der Speicheldrüse	41
	Pleomorphes Adenom der Speicheldrüse	53
Lunge, Pleura und Thymus	Adenokarzinom der Lunge	196
	Plattenepithelkarzinom der Lunge	80
	Kleinzelliges Karzinom der Lunge	16
	Mesotheliom, epithelioid	40
	Mesotheliom, biphasisch	77
	Thymom	29
	Lunge, neuroendokriner Tumor (NET)	29
Weiblicher Genitaltrakt	Plattenepithelkarzinom der Vagina	78
	Plattenepithelkarzinom der Vulva	157
	Plattenepithelkarzinom der Zervix	136
	Adenokarzinom der Zervix	23
	Endometrioides Endometriumkarzinom	338
	Seröses Endometriumkarzinom	86
	Karzinom des Uterus	57
	Endometriumkarzinom, high grade, G3	13
	Klarzelliges Endometriumkarzinom	9
	Endometrioides Ovarialkarzinom	130
	Seröses Ovarialkarzinom	580
	Muzinöses Ovarialkarzinom	101
	Klarzelliges Ovarialkarzinom	51
	Karzinom des Ovars	47
	Granulosazelltumor des Ovars	44
	Leydigzelltumor des Ovars	4

Organsystem	Tumorentität	Probenzahl auf TMA (n)
Weiblicher Genitaltrakt	Sertolizelltumor des Ovars	1
	Sertoli-Leydigzelltumor des Ovars	3
	Steroidzelltumor des Ovars	3
	Brenner-Tumor	41
Mamma	Invasives Mammakarzinom (NST)	1764
	Lobuläres Mammakarzinom	363
	Medulläres Mammakarzinom	34
	Tubuläres Mammakarzinom	29
	Muzinöses Mammakarzinom	65
	Phylloides-Tumor der Mamma	50
Gastrointestinal	Adenomatöser Polyp, low-grade Dysplasie	50
	Adenomatöser Polyp, high-grade Dysplasie	50
	Adenokarzinom des Kolons	2483
	Adenokarzinom des Magens, diffuser Typ	215
	Adenokarzinom des Magens, intestinaler Typ	215
	Adenokarzinom des Magens, gemischter Typ	62
	Adenokarzinom des Ösophagus	83
	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	76
	Plattenepithelkarzinom des Analkanals	91
	Cholangiokarzinom	58
	Adenokarzinom der Gallenblase	51
	Klatskin-Tumor der Gallenblase	42
	Hepatozelluläres Karzinom	312
	Duktales Adenokarzinom des Pankreas	659
	Ampulläres Adenokarzinom des Pankreas	98
	Azinuszellkarzinom des Pankreas	18
	Gastrointestinaler Stroma-Tumor (GIST)	62
	Appendix, neuroendokriner Tumor (NET)	25
	Kolorektal, neuroendokriner Tumor (NET)	12
	Ileum, neuroendokriner Tumor (NET)	53

Organsystem	Tumorentität	Probenzahl auf TMA (n)
Gastrointestinal	Pankreas, neuroendokriner Tumor (NET)	101
	Kolorektal, neuroendokrines Karzinom (NEC)	14
	Ileum, neuroendokrines Karzinom (NEC)	8
	Gallbladder, neuroendokrines Karzinom (NEC)	4
	Pankreas, neuroendokrines Karzinom (NEC)	14
Harnwege	Nicht invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2 low grade	177
	Nicht invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2 high grade	141
	Nicht invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G3	219
	Urothelkarzinom, pT2-4 G3	735
	Plattenepithelkarzinom der Harnblase	22
	Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom der Harnblase	23
	Sarkomatoides Urothelkarzinom	25
	Urothelkarzinom des Nierenbeckens	62
	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	1287
	Papilläres Nierenzellkarzinom	368
	Klarzelliges (tubuläres) papilläres Nierenzellkarzinom	26
	Chromophobes Nierenzellkarzinom	170
	Onkozytom	257
Männlicher Genitaltrakt	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 3+3	83
	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 4+4	80
	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 5+5	85
	Adenokarzinom der Prostata (Rezidiv)	258
	Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom der Prostata	19
	Seminom	682
	Embryonales Karzinom des Hodens	54
	Leydigzelltumor des Hodens	31
	Sertolizelltumor des Hodens	2
	Keimstrang-Stromatumor des Hodens	1
	Spermatozytischer Tumor des Hodens	13
	Dottersacktumor	53

Organsystem	Tumorentität	Probenzahl auf TMA (n)
Männlicher Genital-trakt	Teratom	53
	Plattenepithelkarzinom des Penis	92
Endokrinum	Schilddrüsenadenom	113
	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	391
	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	154
	Medulläres Schilddrüsenkarzinom	111
	Nebenschilddrüsenadenom	43
	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	45
	Adenom der Nebennierenrinde	50
	Karzinom der Nebennierenrinde	28
	Phäochromozytom	50
Hämatopoetisches und lymphathisches Gewebe	Hodgkin-Lymphom	103
	Kleinzelliges lymphozytisches Lymphom, B-Zell Typ (B-SLL/B-CLL)	50
	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom (DLBCL)	113
	Follikuläres Lymphom	88
	T-Zell Non-Hodgkin-Lymphom	25
	Mantelzell-Lymphom	18
	Marginalzonen-Lymphom	16
	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL) im Hoden	16
	Burkitt-Lymphom	5
Weichteilgewebe und Knochen	Tendosynovialer Riesenzelltumor	45
	Granularzelltumor	53
	Leiomyom	50
	Leiomyosarkom	94
	Liposarkom	145
	Maligner Tumor der peripheren Nervenscheiden (MPNST)	15
	Myofibrosarkom	26
	Angiosarkom	74
	Angiomyolipom	91
	Dermatofibrosarkoma protuberans	21

Organsystem	Tumorentität	Probenzahl auf TMA (n)
Weichteilgewebe und Knochen	Ganglioneurom	14
	Kaposi-Sarkom	8
	Neurofibrom	117
	Sarkom (NOS)	74
	Paragangliom	41
	Ewing-Sarkom	23
	Rhabdomyosarkom	7
	Schwannom	122
	Synovialsarkom	12
	Osteosarkom	44
	Chondrosarkom	40
	Rhabdoid-Tumor	5
	Solitärer fibröser Tumor	17
Summe		19.214

3.3 Immunhistochemie

Unverzichtbar für die Visualisierung und Diagnostik einzelner Proteine am pathologischen Gewebsschnitt ist die immunhistochemische Färbung mittels spezifischer Antikörper gegen verschiedene Zielproteine. Dieses Routineverfahren ermöglicht es unter anderem, Tumoren nach ihrer Proteinexpression zu klassifizieren und genauere Aussagen zu Prognose und Therapie zu treffen (Moch et al., 2019). Zur Visualisierung wird der spezifische, aber farblose Primärantikörper nach seiner Bindung an das Zielprotein über direkte oder indirekte Immunhistochemie nachgewiesen.

3.3.1 Herstellung von Antikörpern

Antikörper können je nach Herstellungsprozess mono- oder polyklonal sein. Polyklonale Antikörper werden aus dem Serum von im Labor gezüchteten Tieren wie Kaninchen oder Mäusen gewonnen und weisen aufgrund einer größeren Bandbreite produzierter Antikörper (jede B-Zelle produziert einen Typ von Antikörper) eine geringere Spezifität, durch ihre Fähigkeit zur Bindung an mehrere Epitope aber gleichzeitig oft eine höhere Sensitivität auf, wobei selbst bei fixierungsbedingter Zerstörung einzelner Zielepitope noch eine Bindungsreaktion möglich ist (Saper, 2009; Wine et al., 2013; Hantschke et Palmedo,

2015). Mögliche Gründe für die Bandbreite produzierter polyklonaler Antikörper liegen in der VDJ-Rekombination, Genkonversion – hier passen sich Teile eines Genabschnitts hinsichtlich der Struktur an einen anderen an, ohne dass wie beim Crossing-over die Lokalisation der Genabschnitte verändert wird – und somatischen Hypermutation (Baltimore, 1981; Kim et al., 1981; Becker et Knight, 1990; zusammengefasst in Cheung et al., 2012).

Monoklonale Antikörper hingegen werden in Zellkulturen produziert und sind – zumindest theoretisch – sehr spezifisch auf ein Antigen-Epitop gerichtet, obgleich es auch hier zu Kreuzreaktionen mit anderen Strukturen kommen kann (Hantschke et Palmedo, 2015). Eine Methode zur Herstellung monoklonaler Antikörper ist die Hybridoma-Technik, bei der über eine Fusion der gewünschten B-Zelllinie mit Tumorzellen deren Immortalisierung erreicht wird und somit die Produktion von Antikörpern über einen einzelnen Klon erfolgt (Köhler et Milstein, 1975; Uhr et al., 1984).

3.3.2 Direkte Immunhistochemie

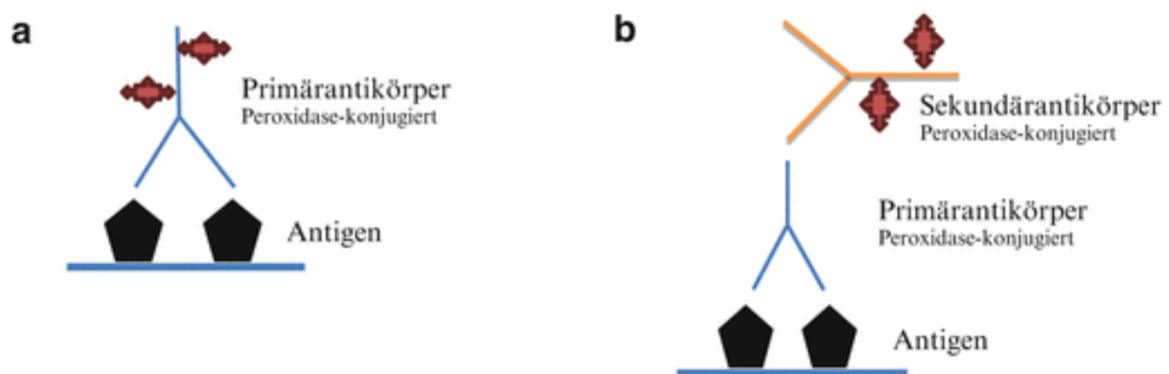


Abbildung 19: Schematische Darstellung der direkten (a) und indirekten (b) Immunhistochemie. Grafik modifiziert nach Hantschke et Palmedo, 2015.

In der klassischen direkten Immunhistochemie, erkennbar in Abbildung 19 (a), wird der Primärantikörper direkt an ein fluoreszenzmikroskopisch detektierbares Fluorophor wie Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) oder an ein Enzym wie alkalische Phosphatase oder Peroxidase konjugiert (Hantschke et Palmedo, 2015; Im et al., 2019). Bei Zugabe eines Substrates katalysiert das Enzym eine farblich detektierbare Reaktion und ermöglicht so eine visuelle Lokalisierung des nachzuweisenden, vom Primärantikörper gebundenen Antigens (Hantschke et Palmedo, 2015; Moch et al., 2019). Die Nutzung eines solchen „labeled antibody“ führt zu einer geringeren Sensitivität des Antigennachweises als nachfolgend beschriebene Techniken, da nur dieser eine Primärantikörper an das Antigen bindet und eine Signalverstärkung durch Bindung weiterer Sekundär- und Tertiärantikörper – wie in der indirekten Immunhistochemie – ausbleibt (Hantschke et Palmedo, 2015).

3.3.3 Indirekte Immunhistochemie

Alternativ steht die indirekte Methode zur Detektion zur Verfügung. Sie beruht auf einer Konjugation eines eine Farbreaktion katalysierenden Enzyms oder eines Fluorophors mit einem polyklonalen Sekundärantikörper, der wiederum gegen den F_c-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist, siehe Abbildung 19 (b) (Hantschke et Palmedo, 2015). Zentral dafür ist, dass der Sekundärantikörper einer anderen Spezies entstammt als das zu untersuchende Antigen, um eine Kreuzreaktivität des Sekundärantikörpers mit nicht nachzuweisenden Gewebetypen der Probe zu vermeiden (Im et al., 2019). Das indirekte Detektionssystem kann durch zahlreiche Verfahren weiter amplifiziert und in seiner Sensitivität gesteigert werden, beispielsweise durch Hinzufügen eines Tertiärantikörpers (Hantschke et Palmedo, 2015; Im et al., 2019).

Ogleich die direkte Immunhistochemie schneller durchführbar ist, ist die indirekte Methode der direkten bezüglich Sensitivität des Antigennachweises und Amplifikation des Signals deutlich überlegen: Bereits die standardmäßig stattfindende Bindung mehrerer Sekundärantikörper an verschiedene Epitope eines einzelnen Primärantikörpers führt zu einer deutlich höheren Sensitivität der Darstellung (Hantschke et Palmedo, 2015; Im et al., 2019).

3.3.4 EPOS-, PAP- und APAAP-Methodik

Alternative Methoden zur klassischen direkten und indirekten Immunhistochemie sind EPOS, PAP und APAAP.

EPOS, dargestellt in Abbildung 20 (a), steht für „Enhanced Polymer One Step Staining“ und ist eine sensitive direkte immunhistochemische Methode, im Rahmen derer kettenförmige Dextranpolymere mit Farbenzymen und Primärantikörpern konjugiert werden (Hantschke et Palmedo, 2015). Alternativ ist auch im Rahmen der EnVISION-Technik (Dako) eine indirekte Darstellung, erkennbar in Abbildung 20 (b), über eine Konjugation des Dextranpolymers mit an Primärantikörper bindenden Sekundärantikörpern möglich, die wiederum über konjugierte Enzyme Substrat umsetzen und eine Färbung bewirken können (Hantschke et Palmedo, 2015).

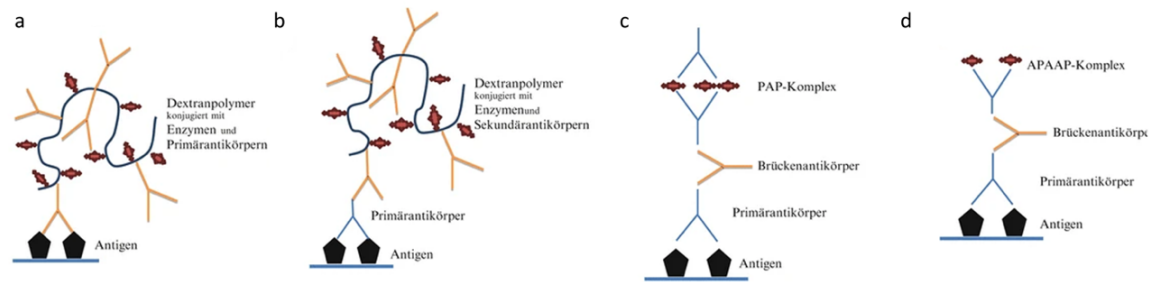


Abbildung 20: Schematische Darstellung der (a) und (b) EPOS-, (c) PAP- und (d) APAAP-Methodik. Modifiziert nach Hantschke et Palmedo, 2015.

In der PAP- (siehe Abbildung 20 (c)) und APAAP-Methode (siehe Abbildung 20 (d)) wird ein sogenannter Brückenantikörper eingesetzt, der über seinen F_{ab} -Bereich an den F_c -Bereich des Primärantikörpers bindet; zusätzlich bindet der Brückenantikörper auch an einen Komplex aus einem weiteren Antikörper und einem Farbenzym und bindet diesen Komplex damit auch an den Primärantikörper – wichtig dafür ist, dass der Primärantikörper aus derselben Spezies gezüchtet wurde wie der Antikörper im Komplex mit dem Farbenzym (Hantschke et Palmedo, 2015). Das eingesetzte Farbenzym ist hier wieder entweder Peroxidase, woraus sich ein Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex und damit der Name PAP ergeben; oder Alkalische Phosphatase, wobei der Name APAAP sich aus dem Komplex Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase ergibt (Hantschke et Palmedo, 2015).

3.3.5 ABC- und LSAB-Methode

Weitere immunhistochemische Nachweisformen stellen die ABC- und LSAB-Methoden dar, die die hohe Affinität von Avidin bzw. Streptavidin (Glykoproteine) zu Biotin ausnutzen (Hantschke et Palmedo, 2015; Im et al., 2019). Zunächst bindet ein mit Biotin (Vitamin H) markierter Sekundärantikörper an den Primärantikörper. In der ABC-Methode, erkennbar in Abbildung 21 (a), wird ein biotinylierter Brückenantikörper genutzt, um einen Avidin-Biotin-Enzymkomplex (ABC) zu binden (Hantschke et Palmedo, 2015; Im et al., 2019). In der LSAB-Methode hingegen, dargestellt in Abbildung 21 (b), werden Avidin oder Streptavidin ohne Biotin direkt mit einem Enzym zum späteren Substratumsatz oder mit Fluorophoren konjugiert (labeled Avidin/ Streptavidin) und binden dann an den biotinylierten Sekundärantikörper (Hantschke et Palmedo, 2015; Im et al., 2019).

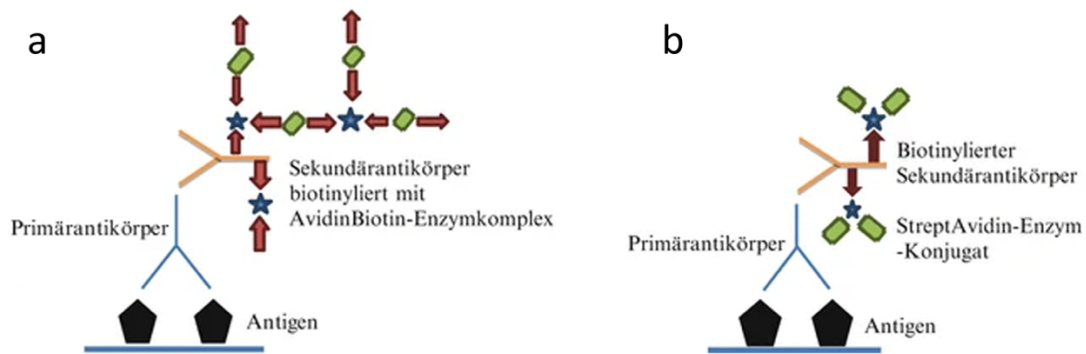


Abbildung 21: Schematische Darstellung der (a) ABC- und (b) LSAB-Methode. Modifiziert nach Hantschke et Palmedo, 2015.

3.3.6 Herausforderungen der immunhistochemischen Färbung

Obwohl durch die oben angesprochenen Techniken generell eine Visualisierung von Zielantigenen erfolgen kann, ergeben sich einige praktische Probleme in der Durchführung der Immunhistochemie, die sich negativ auf die Vergleichbarkeit von Studienergebnissen auswirken.

Zum einen sind polyklonale Antikörper spezifisch für ein einzelnes, zwangsläufig sterbliches Tier, dessen Serum regelmäßig zur Gewinnung der Antikörper genutzt wird (Saper, 2009). Weiterhin resultiert die Herstellung polyklonaler Antikörper – wie bereits angesprochen – aufgrund des Prozesses der Beimpfung eines lebendigen Tieres mit einem einzigen Zielprotein immer in einer hohen Anzahl verschiedener Antikörper, die aufgrund des physiologischen Prozesses der Antikörperbildung entstehen (Baltimore, 1981; Kim et al., 1981; Becker et Knight, 1990; zusammengefasst in Cheung et al., 2012). Dadurch ist bei polyklonalen Antikörpern nicht genau festzustellen, welche der gewonnenen Antikörper für die gewünschten immunhistochemischen Färbungen verantwortlich ist (Saper, 2009; Cheung et al., 2012). Die Herstellung monoklonaler Antikörper über Fusion der gewünschten Antikörper-herstellenden Zelllinie mit Tumorzellen und ihre subsequente Immortalisierung bietet daher deutliche Vorteile bezüglich Langlebigkeit der Antikörperlinie (Köhler et Milstein, 1975; Uhr et al., 1984). Auch hier besteht jedoch die Problematik, dass unterschiedliche Hersteller zwar jeweils monoklonale Antikörper gegen das gleiche Zielantigen produzieren, eine Vergleichbarkeit dieser jedoch nur gegeben ist, wenn exakt identische Klone genutzt werden – verschiedene monoklonale Antikörper-Klone gegen das gleiche Zielprotein sind in ihrer Vergleichbarkeit ebenfalls stark eingeschränkt.

Antikörper unterschiedlicher Anbieter weisen daher zwangsläufig eine sehr hohe Variabilität bezüglich Spezifität der Bindung an das Zielantigen versus uninteressante Hintergrundreaktionen sowie bezüglich der zu bevorzugenden Färbeprotokolle auf. Selbst bei Einhaltung des gleichen Färbeprotokolls ist die Vergleichbarkeit zweier verschiedener

Antikörper stark eingeschränkt; eine Vergleichbarkeit von Studien mit variierenden Antikörpern in verschiedenen Laboren ist kaum gegeben (Saper, 2009; Im et al., 2019; Jain et Salunke, 2019).

Neben dieser Problematik stellt auch die standardmäßig verwendete Fixierung von Schnitten mit Formalin zur Vermeidung von Zelluntergängen und Verwesungsvorgängen ein Problem für die Spezifität der Immunreaktion dar. Durch die Formalinfixierung entsteht vielfach sogenanntes Cross-Linking zwischen Proteinen und DNA, wodurch Epitope zerstört, in ihrer Zugänglichkeit für Antikörper behindert oder auch neu gebildet werden können, was zu unspezifischen Farbreaktionen führen kann (Helander, 1994; Werner et al., 2000). Eine Möglichkeit zur Umgehung dieser Problematik ist die Nutzung des Heat Induced Epitope Retrieval (HIER)-Verfahrens, in dem durch Hitzeinduktion teilweise das Crosslinking aufgehoben werden kann, wodurch die Färbeergebnisse deutlich verbessert werden (Hantschke et Palmedo, 2015; Im et al., 2019). Trotzdem reagiert Gewebe nach Fixierung durch Formalin und die HIER-assoziierte Exposition zu Temperaturen von 121°C immer anders auf Antikörper, als wenn es diesen im frischen Zustand exponiert worden wäre (Yamashita, 2007). Zusätzlich zur Formalinexposition spielt die Alkoholexposition des Gewebes im Färbeprozess ebenfalls eine erschwerende Rolle für die Antikörperreaktion, denn auch der Kontakt mit Alkohol führt zu einer Veränderung der Proteinstruktur über Koagulationsprozesse, die wiederum die Antikörperbindung erschweren (Werner et al., 1996).

3.4 Immunhistochemisches Färbeprotokoll

Der Ablauf der immunhistochemischen Färbung gegen Pax-6 gliederte sich in sechs Schritte, die Tabelle 9 entnommen werden können.

Tabelle 9: Detaillierte Darstellung des Färbeprotokolls für Pax-6

Arbeitsschritt	Genauer Ablauf
1. Vorbereitung der Objektträger	- Anfertigung frischer Schnitte am Mikrotom (2,5µm Dicke) - Inkubation über Nacht im Brutschrank (60°C) - Entparaffinierung und Rehydrierung mittels absteigender Alkoholreihe (beginnend bei Xylol, bis Aqua dest)
2. Vorbehandlung zur Demaskierung der Epitope	- Autoclavierung für 5 Minuten bei 121°C mit Target Retrieval Solution Buffer von DAKO (Agilent, CA, USA, #S2367; pH 7,8) 2x Spülung mit destilliertem Wasser 1x Spülung mit TBS-T-Puffer für 5 Minuten
3. Durchführung des Peroxidase-Blocks	- Durchführung in einer feuchten Kammer 10-minütige Inkubation mit RTU Peroxidase Blocking Solution (DAKO; Agilent, CA, USA, #52023) 3x Spülung mit TBS-T-Puffer für je 5 Minuten
4. Färbung mit dem spezifischen Primärantikörper	60-minütige Inkubation mit 1:150 Anti-Pax-6 (monoklonal, Maus, MSVA-706M, MS Validated Antibodies, Hamburg, Deutschland; #5703-706M) bei 37°C 3x Spülung mit TBS-T-Puffer für je 5 Minuten
5. Färbung mit einem Sekundärantikörper zur Visualisierung	30-minütige Inkubation mit Sekundärantikörper (Real EnVision Detection System von DAKO; Agilent, CA, USA, #K5007) bei 37°C 3x Spülung mit TBS-T-Puffer für je 3 Minuten
6. Chromogenisierung	10-minütige Inkubation mit DAKO-DAB Chromogen #K5007 bei Raumtemperatur 1x Spülung mit destilliertem Wasser 15-sekündige Färbung mit Hämatoxylin 15-sekündige Spülung in Leitungswasser zum Bläuen - Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe (bis Xylol) - Schutz durch Folie im Eindeckautomaten

Zunächst wurden am Vortag am Mikrotom Schnitte mit einer Dicke von 2,5µm angefertigt und im Brutschrank bei 60°C aufbewahrt. Am folgenden Tag erfolgte die Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte durch Behandlung mit einer absteigenden Alkoholreihe und destilliertem Wasser.

Anschließend wurde zur Aufhebung der bei Fixierung entstehenden Crosslinkings der Epitope eine Demaskierung mittels HIER-Technik im Autoclav durchgeführt. Dazu wurde ein Citratpuffer genutzt, um die Schnitte fünf Minuten lang bei 121°C zu autoclavieren. Danach erfolgten zwei Spülungen mit Aqua dest und eine fünfminütige Inkubation mit TBS-T-Puffer (Tris-buffered saline with Tween20), um unspezifische und ungewollte Antigen-Antikörper-Bindungen möglichst auf ein Minimum zu reduzieren.

Im nächsten Schritt wurde ein endogener Peroxidase-Block mittels Zugabe einer Peroxidase Blocking Solution und Inkubation für zehn Minuten vorgenommen. Danach fand zur Steigerung der Spezifität der Färbung erneut eine Spülung mit TBS-T-Puffer statt, diesmal in drei Zyklen à 5 Minuten.

Im Folgenden erfolgte die Färbung mittels einem spezifischen Primärantikörper für Pax-6 (monoklonal, Maus, MSVA-706M, MS Validated Antibodies, Hamburg, Deutschland; #5703-706M), der in einer Verdünnung von 1:150 und bei einem AcpH-Wert von 7,8 für 60 Minuten bei einer Temperatur von 37°C mit den Schnitten inkubiert wurde, wonach drei weitere Spülungen mit TBS-T-Puffer erfolgten.

Im fünften Schritt wurde dann der Sekundärantikörper hinzugegeben und bei 37°C mit den Schnitten inkubiert, um eine sichtbare Färbereaktion hervorzurufen. Nach 30 Minuten wurden erneut drei Spülungen mit TBS-T-Puffer durchgeführt, um wiederum unspezifische Antikörper-Antigen-Reaktionen zu minimieren.

Abschließend fand eine Chromogen-Behandlung statt, in der die Schnitte mit DAB-Chromogen bei Raumtemperatur inkubiert wurden, um die nachfolgende Auswertung zu erleichtern. Nach einer Spülung mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte mit Hämatoxylin eingefärbt, anschließend mit Leitungswasser gespült, um eine Bläuung zu erreichen, dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und schließlich mit Folie eingedeckt.

Eine Antikörpervalidierung fand mittels dem monoklonalen Pax-6-Antikörper [EPR15858] (Abcam, Cambridge, UK, #ab195045) statt, mit dem der Normalgewebs-Array in einer Verdünnung von 1:10.000 bei ansonsten identischem Färbeprotokoll ebenfalls eingefärbt und immunhistochemisch beurteilt wurde.

3.5 Immunhistochemische Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung fand bezüglich Prozentsatzes gefärbter Tumorzellen sowie semiquantitativ durch Angabe der Intensität der Färbung (Skala: 0, 1+, 2+, 3+) statt. Daraus ergeben sich vier der Tabelle 10 entnehmbare Kategorien, nach denen die Ergebnisse anschließend statistisch ausgewertet wurden.

Tabelle 10: Kriterien für die statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Auswertungskategorie	Anteil gefärbter Tumorzellen (%)	Semiquantitative Angabe der Färbeintensität
Negativ	0	0
Schwach positiv	≤70	1+
	≤30	2+
Moderat positiv	>70	1+
	31-70	2+
	≤30	3+
Stark positiv	>70	2+
	>30	3+

3.6 Statistik

Sensitivität und Spezifität von Pax-6, PR und GAD2 (allein oder in Kombination) für die Identifizierung pankreatischen Ursprungs wurden anhand der folgenden Formeln berechnet, wobei n für die jeweilige Anzahl steht:

$$\text{Sensitivität} = \frac{n \text{ (korrekt positiv)}}{n \text{ (korrekt positiv)} + n \text{ (falsch negativ)}}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{n \text{ (korrekt negativ)}}{n \text{ (korrekt negativ)} + n \text{ (falsch positiv)}}$$

Diese Analysen schlossen 79 pankreatische NET, 12 pankreatische NEC, 4 NEC aus der Gallenblase, 28 Merkelzellkarzinome, 15 kleinzellige NEC der Harnblase, 6 kleinzellige NEC der Prostata, 11 kolorektale NET, 10 kolorektale NEC, 16 NET der Appendix, 18 NET der Lunge, 11 kleinzellige Lungenkarzinome, 48 NET des Ileums, 104 medulläre Schilddrüsenkarzinome, 41 Paragangliome und 49 Phäochromozytome ein.

4 Ergebnisse

4.1 Technische Aspekte

Insgesamt 17.224 (89,6%) von 19.214 Tumorgewebeproben waren in unserer TMA-Untersuchung auswertbar. Ursachen für nicht auswertbare Proben beinhalteten entweder das Fehlen eindeutiger Tumorzellen in den entsprechenden Gewebeproben oder das vollständige Fehlen einzelner Proben an den dafür vorgesehenen TMA-Positionen. Am Normalgewebe-TMA waren von jedem Gewebetyp mindestens vier Gewebeproben auswertbar.

4.2 Pax-6 in Normalgeweben

Eine mäßig bis stark ausgeprägte nukleäre Pax-6-Färbung zeigte sich in Inselzellen des Pankreas, einer variablen Anzahl von neuroendokrinen Zellen in den Epithelien des Gastrointestinaltrakts einschließlich Brunner-Drüsen, einem Subset von respiratorischen Epithelzellen sowie von darunter liegenden Drüsenepithelien in paranasalen Sinus, einzelnen epithelialen Zellen der Adenohypophyse, Granularzellen des Cerebellums und in einem Subset von Gliazellen im Cerebrum. Repräsentative Abbildungen von Pax-6-gefärbten Normalgeweben sind in Abbildung 22 bis Abbildung 29 dargestellt. Eine Pax-6-Positivität der genannten Zelltypen wurde auch mit einem zweiten, unabhängigen Antikörper [EPR15858] bestätigt, erkennbar in Abbildung 30 bis Abbildung 37. Eine Pax-6-Färbung war in den folgenden Gewebetypen nicht nachweisbar: Skelettmuskel, Herzmuskel, glatte Muskulatur, Aortenwand, Myometrium des Uterus, Corpus spongiosum des Penis, Ovarialstroma, Fett, Haut (einschließlich Haarfollikel und Talgdrüsen), nicht verhornendes Plattenepithel von Lippe, Mundhöhle, Tonsillenoberfläche, Ektozervix und Ösophagus, Übergangsepithel des Analkanals, Urothel von Nierenbecken und Harnblase, Dezidua, Plazenta, Lymphknoten, Milz, Knochenmark, Thymus, Tonsille, Gallenblase, Leber, Karotis, Glandula submandibularis, Glandula sublingualis, Niere, Prostata, Samenblase, Hoden, Nebenhoden, Lunge, Brust, Endozervix, Endometrium, Eileiter, Nebenniere, Schilddrüse und Nebenschilddrüse.

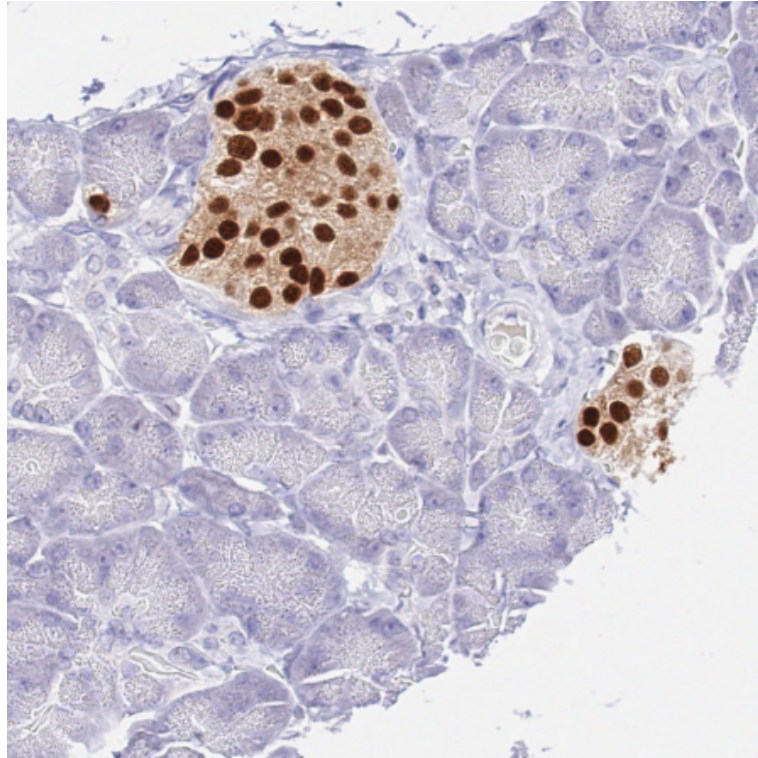


Abbildung 22: Pankreas mit starker nukleärer und diskreter zytoplasmatischer Pax-6-Anfärbung von Zellen in Langerhans'schen Inseln.

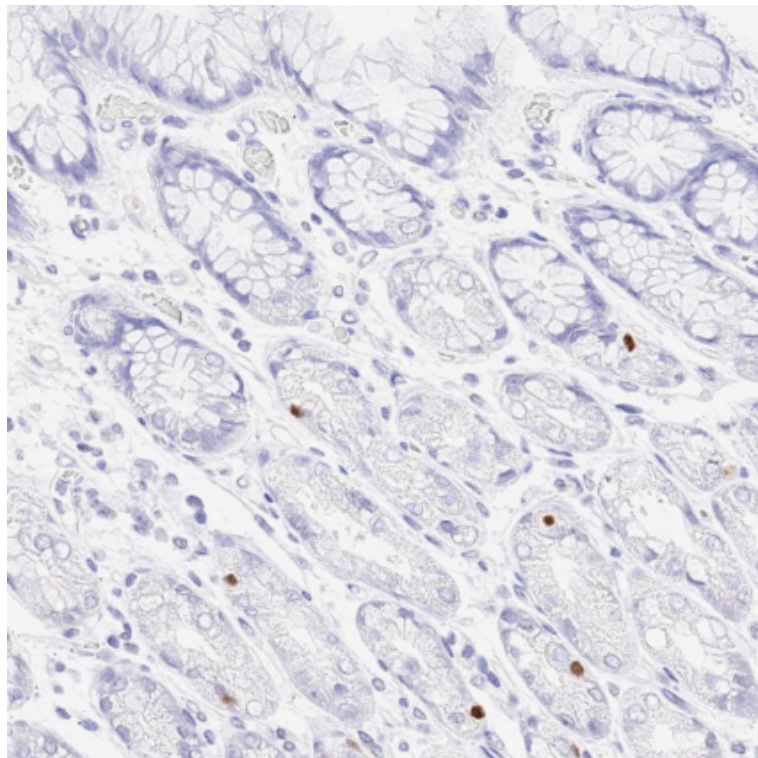


Abbildung 23: Magen-Mukosa mit Pax-6-Anfärbung einzelner (endokriner) Zellen.

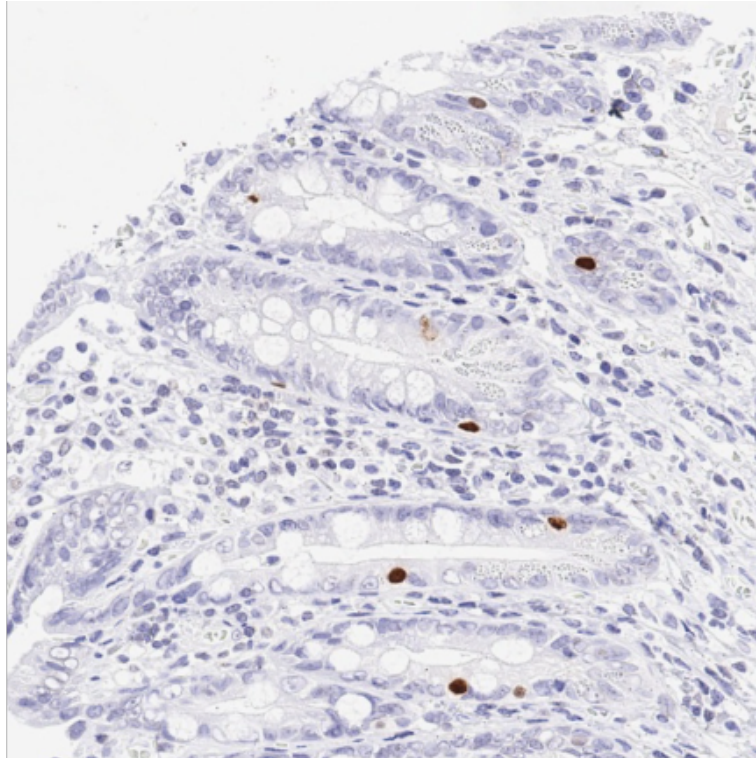


Abbildung 24: Duodenum mit Pax-6-Anfärbung einzelner endokriner Zellen.

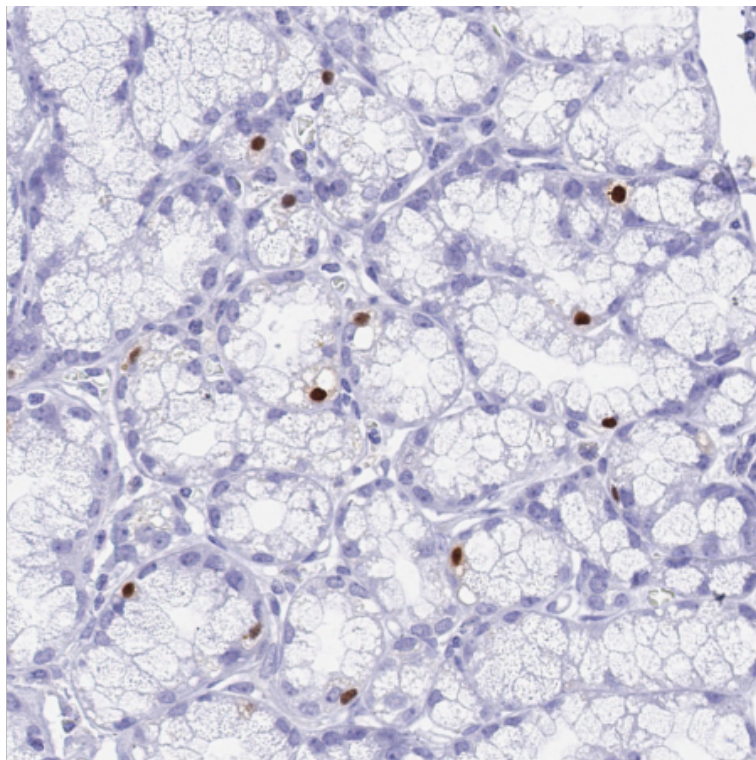


Abbildung 25: Brunner'sche Drüse mit kräftiger nukleärer Anfärbung einzelner endokriner Zellen.

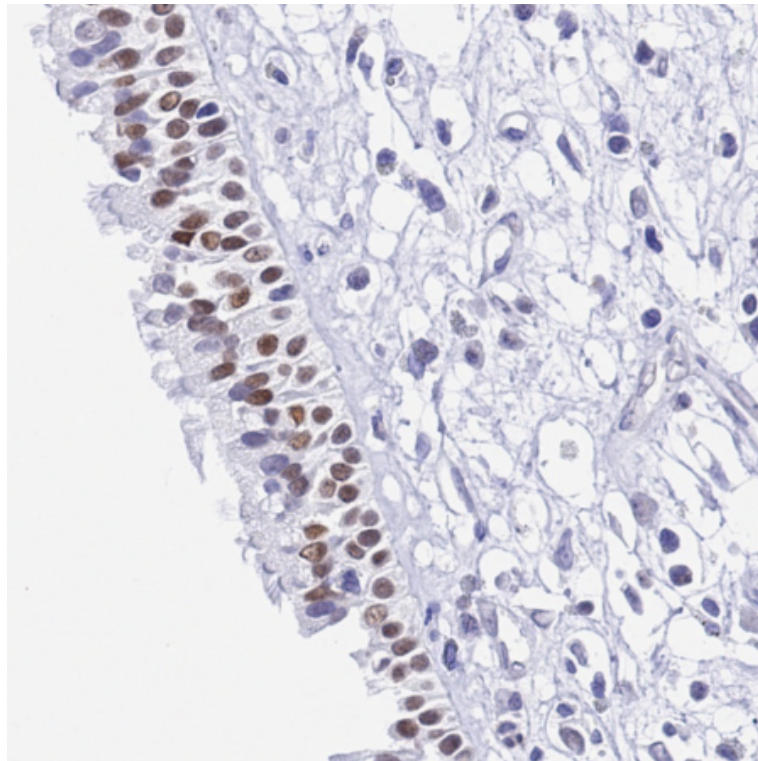


Abbildung 26: Respiratorisches Epithel eines Bronchus mit nukleärer Pax-6-Anfärbung einzelner respiratorischer Epithelzellen.

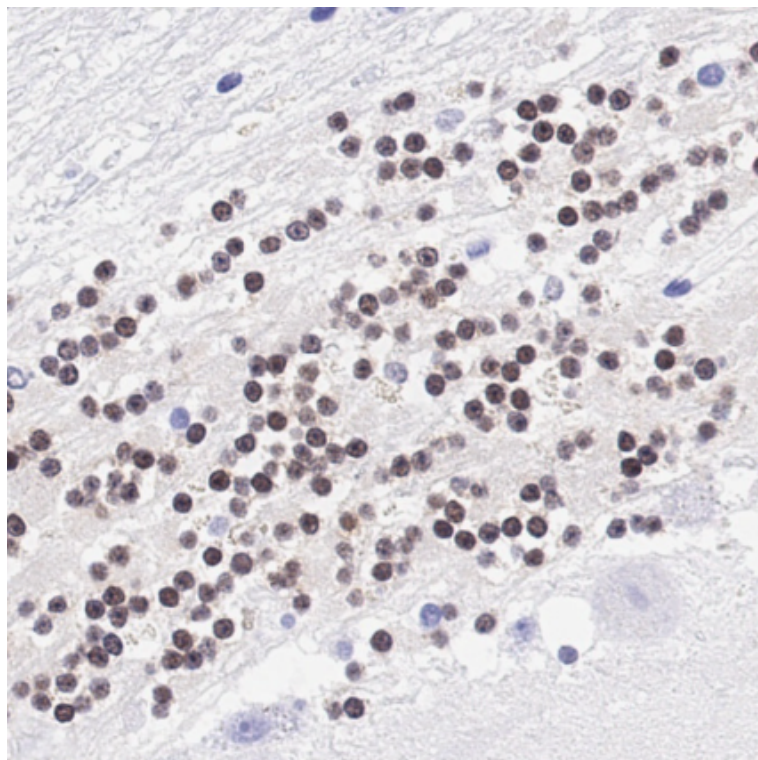


Abbildung 27: Cerebrum mit kräftiger nukleärer Pax-6-Anfärbung von Granularzellen.

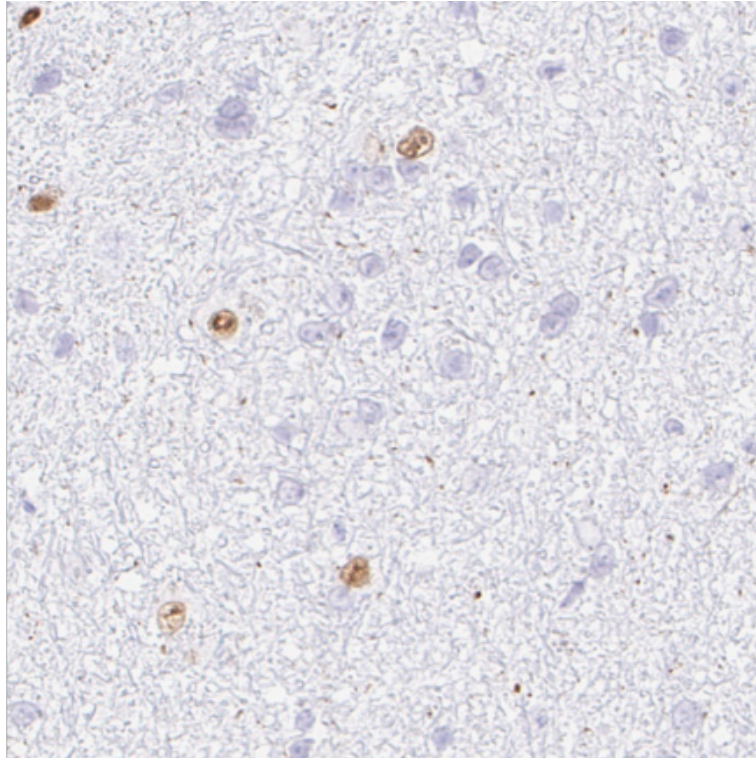


Abbildung 28: Cerebrum mit mäßig starker Pax-6-Anfärbung einzelner Gliazellen.

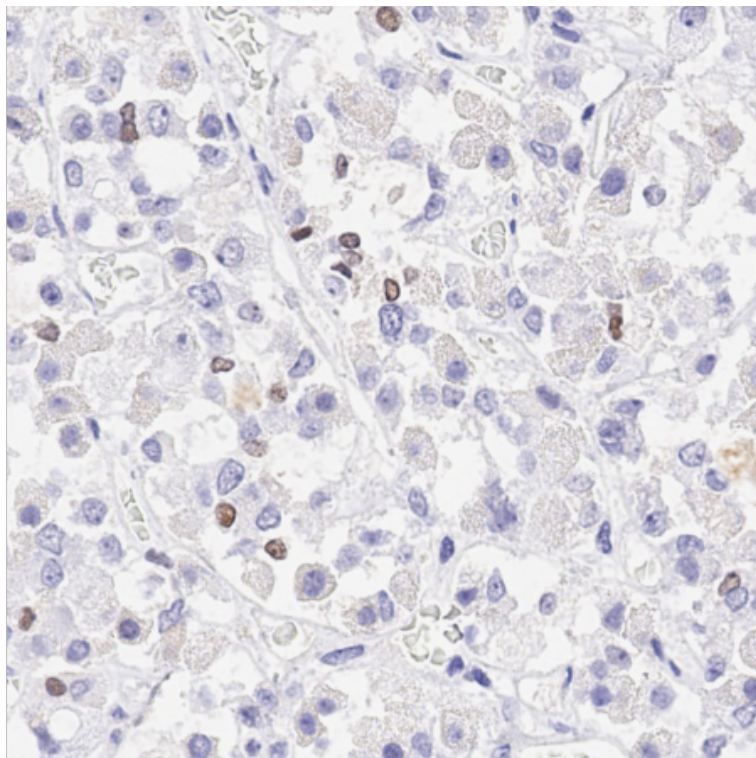


Abbildung 29: Hypophyse mit geringgradiger nukleärer Pax-6-Anfärbung einzelner Epithelzellen (Adenohypophyse).

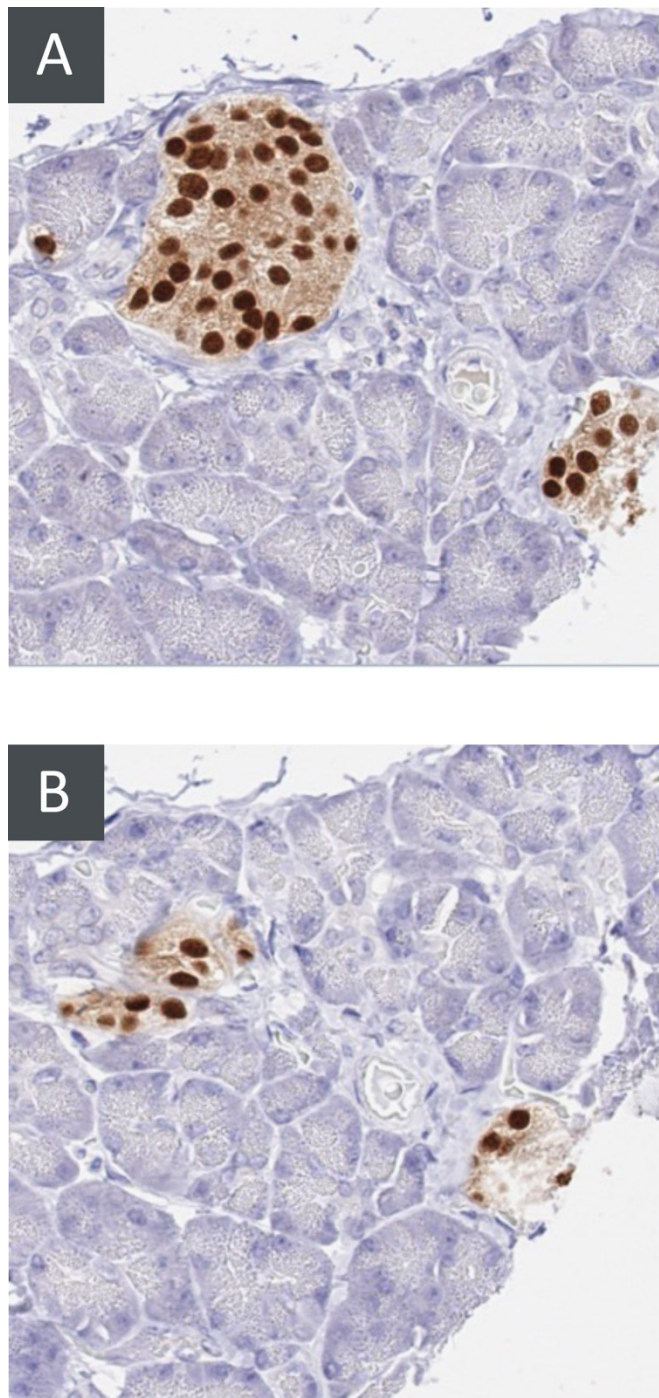


Abbildung 30: Pankreas mit kräftiger nukleärer Anfärbung von Inselzellen mit den Antikörpern MSVA-706M (A) und [EPR15858] (B).

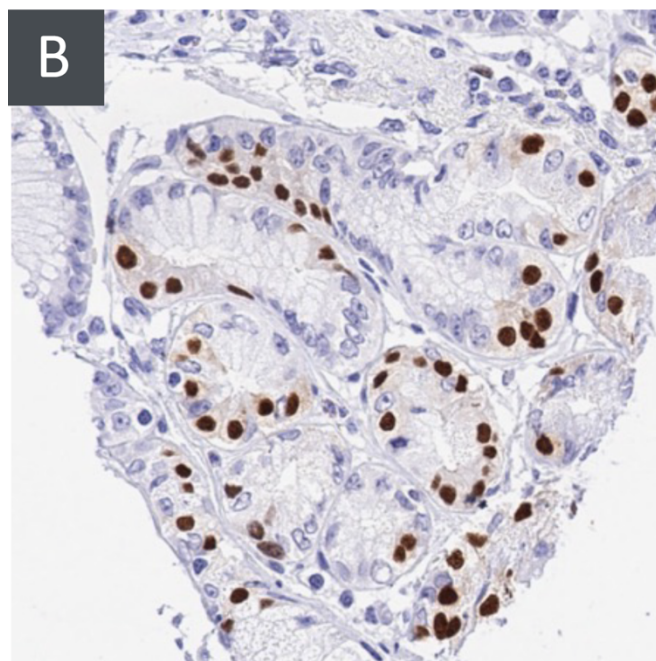
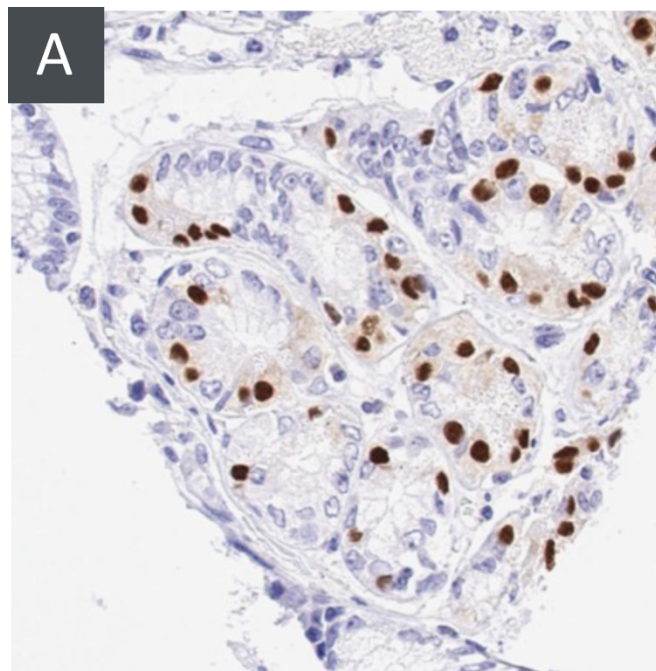


Abbildung 31: Magen mit kräftiger nukleärer Positivität von endokrinen Zellen, nachgewiesen mit MSVA-706M (A) und [EPR15858] (B).

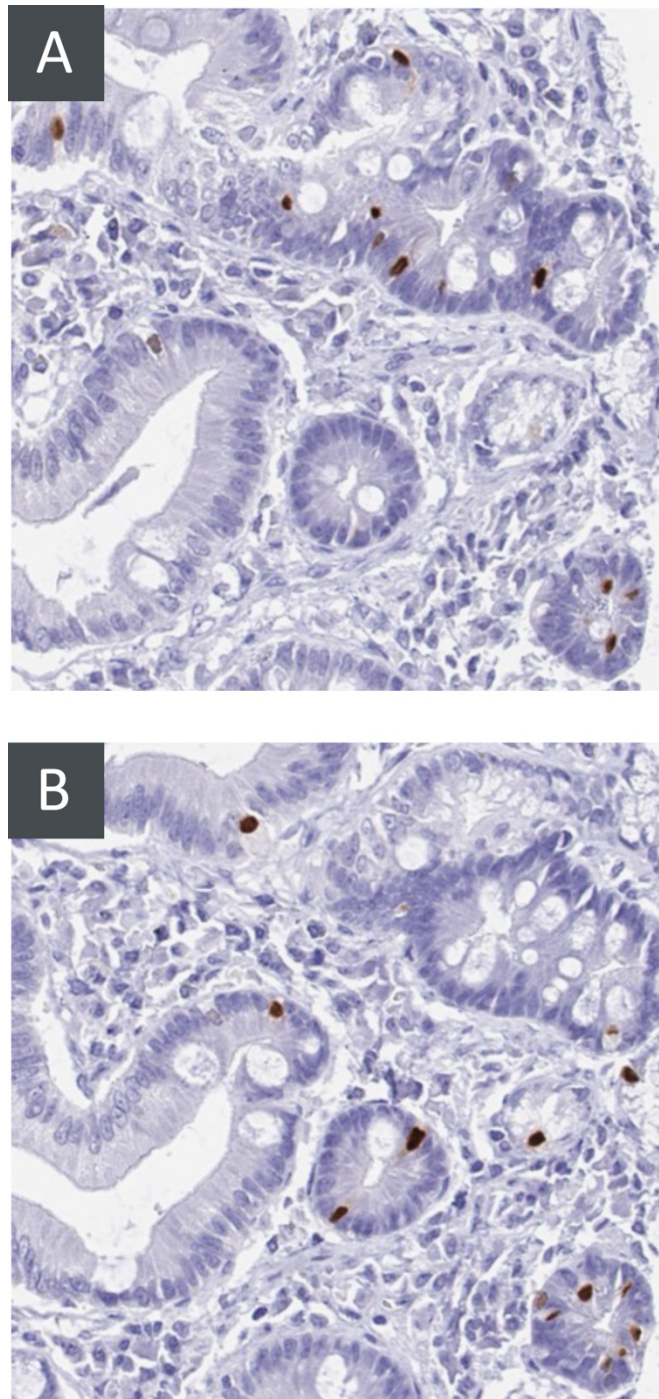


Abbildung 32: Rektum-Mukosa mit kräftiger nukleärer Pax-6-Positivität in einzelnen endokrinen Zellen, dargestellt mit MSVA-706M (A) und [EPR15858] (B).

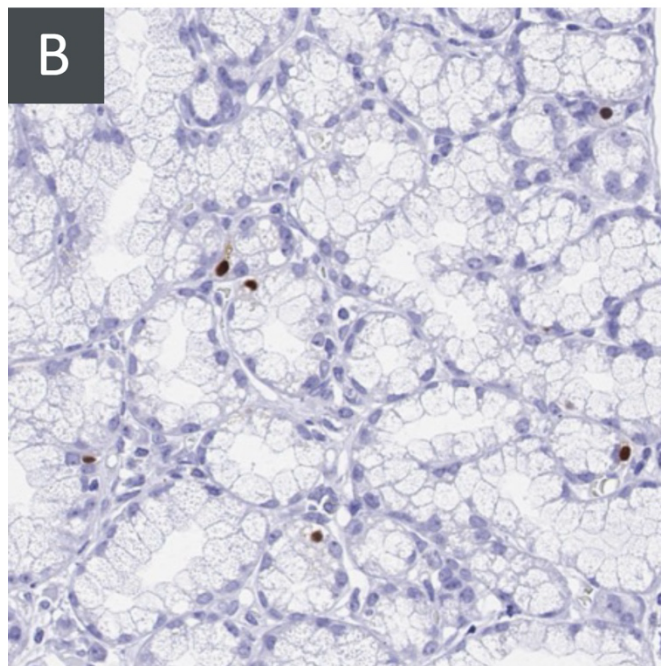
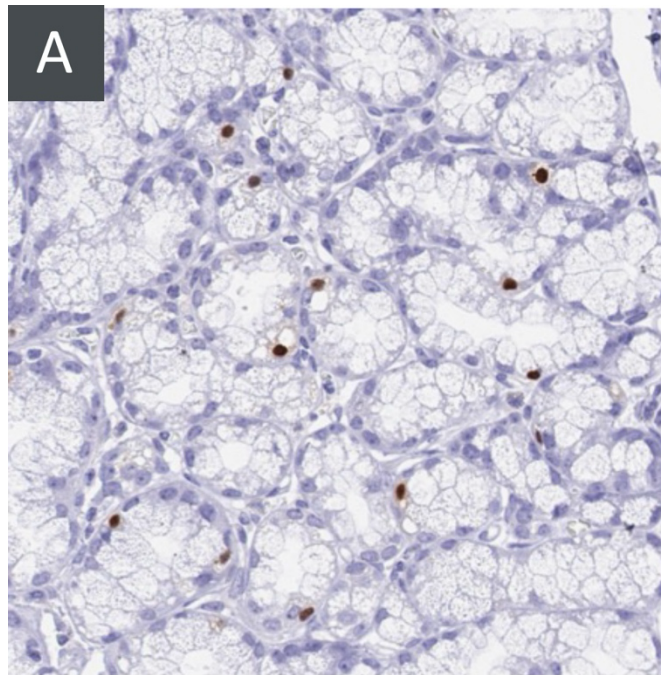


Abbildung 33: Brunner'sche Drüsen des Duodenums mit starker Pax-6-Anfärbung einzelner endokriner Zellen, dargestellt mit Antikörpern MSVA-706M (A) und [EPR15858] (B).

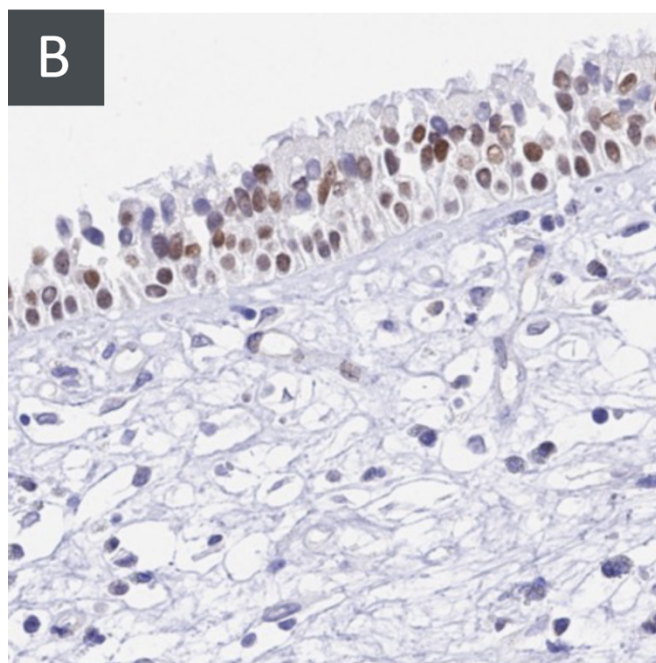
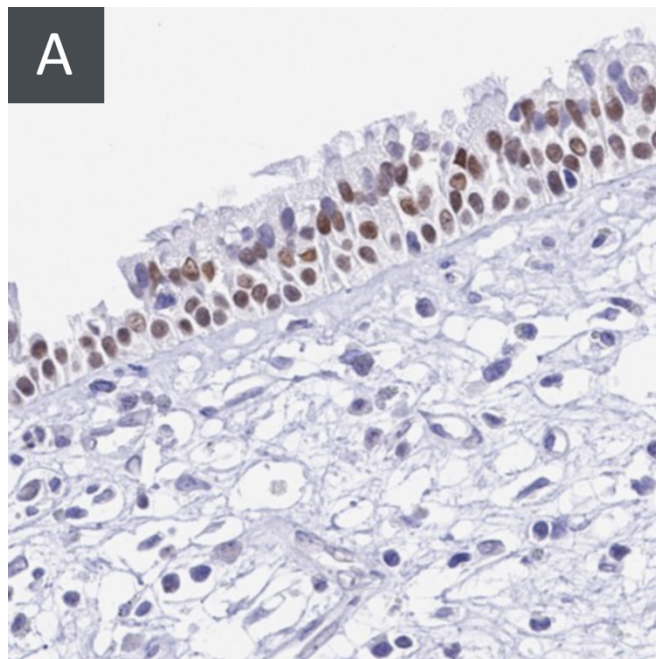


Abbildung 34: Respiratorisches Epithel des Bronchus mit kräftiger nukleärer Färbung einzelner respiratorischer Zellen, nachgewiesen mit Antikörpern MSVA-706M (A) und [EPR15858] (B).

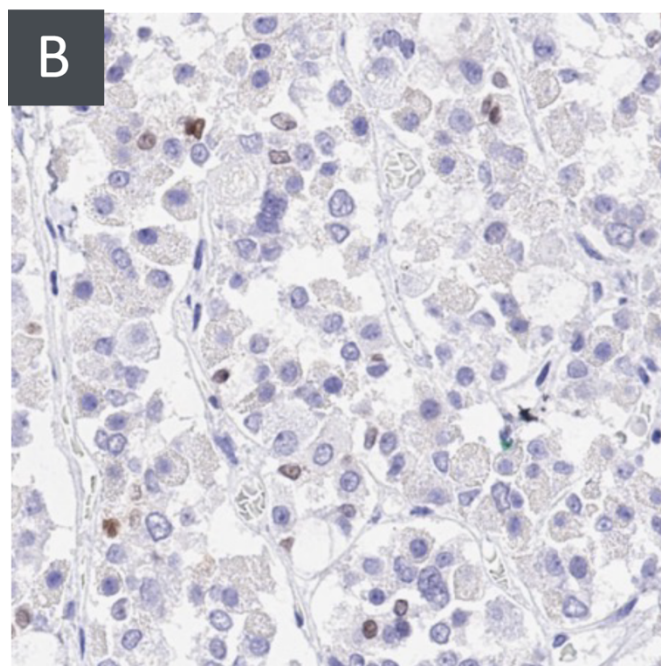
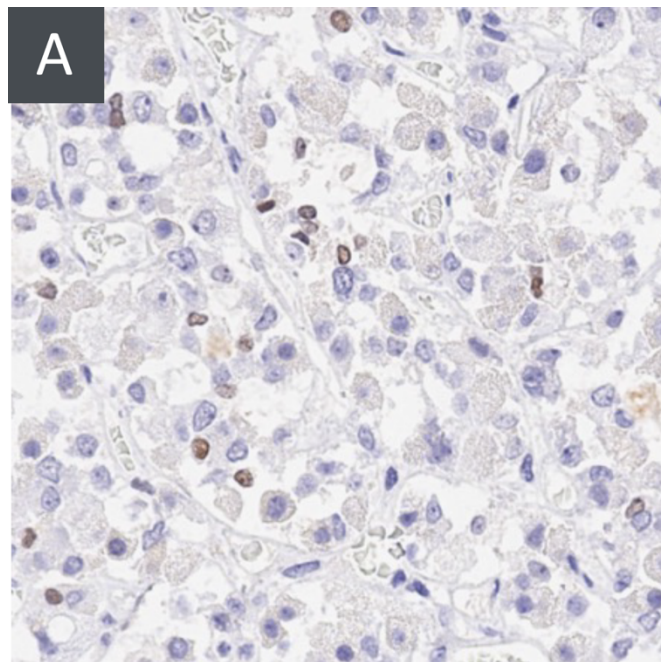


Abbildung 35: Adenohypophyse mit mäßiggradiger nukleärer Positivität einzelner epithelialer Zellen, dargestellt mit MSVA-706M (A) und [EPR15858] (B).

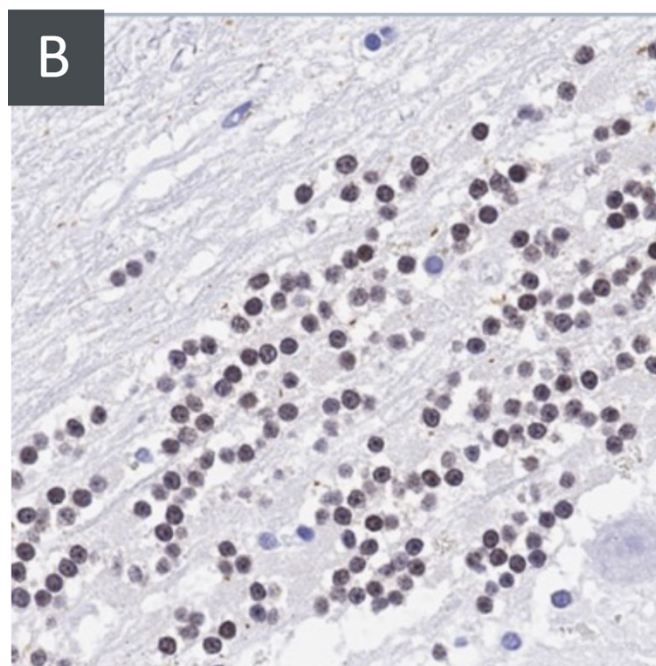
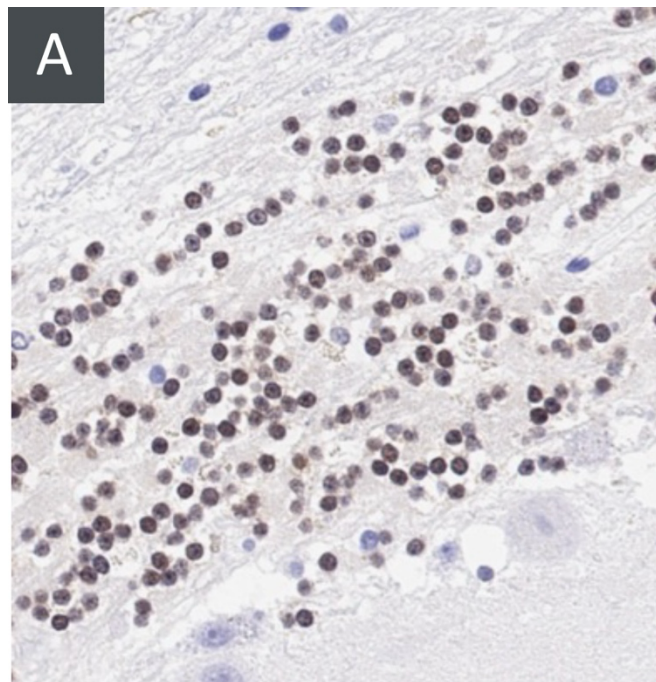


Abbildung 36: Cerebrum mit kräftiger nukleärer Positivität von Granularzellen, dargestellt mit MSVA-706M (A) und [EPR15858] (B).

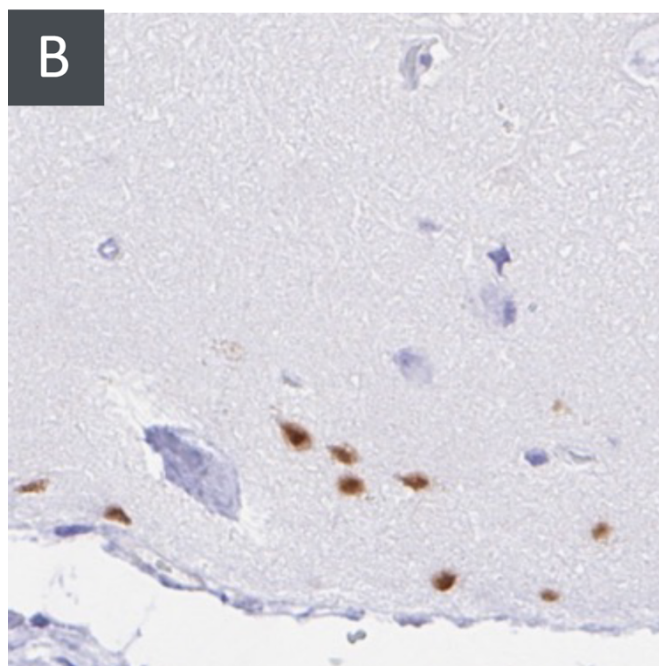
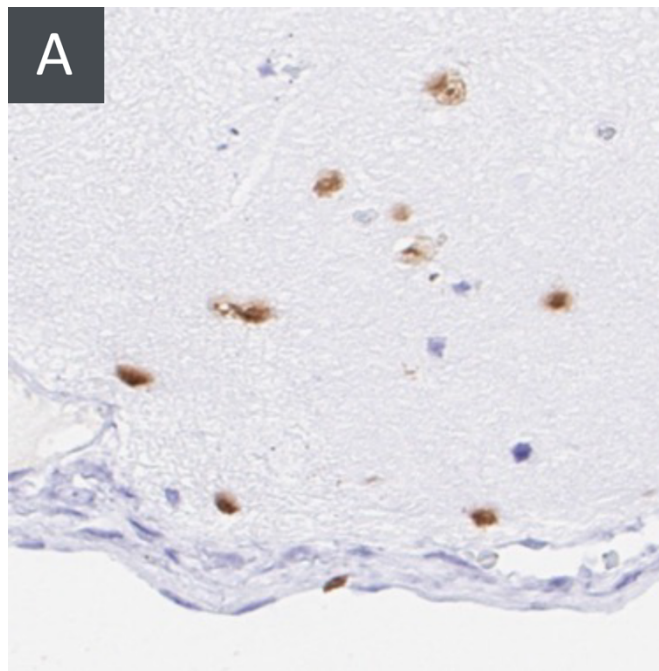


Abbildung 37: Cerebrum mit mäßig starker bis starker nukleärer Pax-6-Anfärbung von Gliazellen, dargestellt mit Antikörper MSVA-706M (A) und [EPR15858] (B).

4.3 Pax-6 in Tumoren

Eine Pax-6-Immunfärbung fand sich in 426 (2,5%) der 17.224 auswertbaren Tumoren. Darunter fanden sich 269 (1,6%) mit schwacher, 96 (0,6%) mit mäßig starker und 61 (0,4%) mit starker Färbung. Insgesamt 60 (40%) der 150 untersuchten Tumorkategorien zeigten mindestens einen Fall mit Pax-6-Positivität und 16 (10,5%) der Tumorkategorien beinhalteten mindestens einen Fall mit einer starken Pax-6-Positivität, erkennbar in Tabelle 11. Repräsentative Bilder von Pax-6-gefärbten Tumoren sind in Abbildung 38 bis Abbildung 45 dargestellt. Die höchste Pax-6-Positivitätsrate fand sich in pankreatischen neuroendokrinen Neoplasmen (NEN; 42,9-70,8%), anderen NEN (bis zu 50% positiv) Hoden-Tumoren (bis zu 58% positiv), Basalzellkarzinomen der Haut (51,9%), Plattenepithelkarzinomen von verschiedenen Ursprungsorganen (1,5-11,8%) und in verschiedenen gynäkologischen Tumoren (bis zu 30%). Eine Pax-6-Positivitätsrate von weniger als 8% – meistens mit schwacher Intensität – fand sich in 43 Tumorkategorien, beispielsweise bei Sarkomen NOS (7,2%), Hodgkin-Lymphomen (4,3%), Mamma-Karzinomen (0,6-2,6%) und kolorektalen Adenokarzinomen (0,3%). Der Vergleich von pankreatischen und extrapankreatischen NEN ergab einen signifikanten Unterschied für neuroendokrine Tumoren (NET), aber nicht für die weniger differenzierten neuroendokrinen Karzinome (NEC). Pankreatische NET waren in 70,8% der Fälle Pax-6-positiv (63 von 89 positiv), während extrapankreatische NET nur in 2,7% (3 von 112 positiv; $p < 0,0001$) positiv waren. Der Unterschied war wesentlich geringer zwischen pankreatischen NEC (42,9% positiv) und extrapankreatischen NEC (25% positiv, $p = 0,1732$).

Tabelle 11: Übersicht über die Auswertungsergebnisse der Pax-6-Immunhistochemie-Färbung.

	Tumorentität	Pax-6-Immunfärbung					
		Auf TMA (n)	Analysierbar (n)	Negativ (%)	Schwach (%)	Moderat (%)	Stark (%)
Haut	Pilomatrixom	35	22	100.0	0.0	0.0	0.0
	Basalzellkarzinom	89	54	48.1	46.3	5.6	0.0
	Benigner Nävus	29	27	100.0	0.0	0.0	0.0
	Plattenepithelkarzinom der Haut	145	130	98.5	1.5	0.0	0.0
	Malignes Melanom	65	61	98.4	1.6	0.0	0.0
	Malignes Melanom (Lymphknotenmetastasen)	86	72	100.0	0.0	0.0	0.0

	Tumorentität	Pax-6-Immunfärbung					
		Auf TMA (n)	Analysierbar (n)	Negativ (%)	Schwach (%)	Moderat (%)	Stark (%)
Haut	Merkelzell-Karzinom	48	33	54.5	24.2	15.2	6.1
Kopf und Hals	Plattenepithelkarzinom des Larynx	109	94	94.7	3.2	1.1	1.1
	Plattenepithelkarzinom des Pharynx	60	51	88.2	7.8	3.9	0.0
	Orales Plattenepithelkarzinom des Mundbodens	130	114	95.6	4.4	0.0	0.0
	Pleomorphes Adenom der Glandula Parotis	50	47	100.0	0.0	0.0	0.0
	Warthin-Tumor der Glandula Parotis	104	100	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom, NOS (Papilläres Zystadenokarzinom)	135	110	100.0	0.0	0.0	0.0
	Karzinom des Speicheldrüsen-Ausführungsganges	15	12	100.0	0.0	0.0	0.0
	Azinuszellkarzinom der Speicheldrüse	181	151	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenoides zystisches Karzinoma der Speicheldrüse	180	115	100.0	0.0	0.0	0.0
	Basalzell-Adenokarzinom der Speicheldrüse	25	23	100.0	0.0	0.0	0.0
	Basalzelladenom der Speicheldrüse	101	87	100.0	0.0	0.0	0.0
	Epithelial-myoepitheliales Karzinom der Speicheldrüse	53	52	100.0	0.0	0.0	0.0
	Mukoepidermoides Karzinom der Speicheldrüse	343	307	100.0	0.0	0.0	0.0

	Tumorentität	Pax-6-Immunfärbung					
		Auf TMA (n)	Analysierbar (n)	Negativ (%)	Schwach (%)	Moderat (%)	Stark (%)
Kopf und Hals	Plattenepithelkarzinom des Larynx	21	18	100.0	0.0	0.0	0.0
	Myoepitheliom der Speicheldrüse	11	9	100.0	0.0	0.0	0.0
	Polymorphes Adenokarzinom, low grade, der Speicheldrüse	41	32	100.0	0.0	0.0	0.0
	Pleomorphes Adenom der Speicheldrüse	53	39	100.0	0.0	0.0	0.0
Lunge, Pleura und Thymus	Adenokarzinom der Lunge	196	190	99.5	0.0	0.5	0.0
	Plattenepithelkarzinom der Lunge	80	75	94.7	5.3	0.0	0.0
	Kleinzelliges Karzinom der Lunge	16	12	100.0	0.0	0.0	0.0
	Mesotheliom, epithelioid	40	30	100.0	0.0	0.0	0.0
	Mesotheliom, biphasisch	77	48	100.0	0.0	0.0	0.0
	Thymom	29	28	100.0	0.0	0.0	0.0
	Lunge, neuroendokriner Tumor (NET)	29	28	96.4	0.0	3.6	0.0
Weiblicher Genitaltrakt	Plattenepithelkarzinom der Vagina	78	63	98.4	1.6	0.0	0.0
	Plattenepithelkarzinom der Vulva	157	143	96.5	2.8	0.7	0.0
	Plattenepithelkarzinom der Zervix	136	126	96.8	3.2	0.0	0.0
	Adenokarzinom der Zervix	23	19	78.9	10.5	10.5	0.0
	Endometrioides Endometriumkarzinom	338	267	93.3	5.2	1.5	0.0
	Seröses Endometriumkarzinom	86	63	95.2	4.8	0.0	0.0
	Karzosarkom des Uterus	57	47	80.9	12.8	4.3	2.1

	Tumorentität	Pax-6-Immunfärbung					
		Auf TMA (n)	Analysierbar (n)	Negativ (%)	Schwach (%)	Moderat (%)	Stark (%)
Weiblicher Genitaltrakt	Endometriumkarzinom, high grade, G3	13	10	70.0	30.0	0.0	0.0
	Klarzelliges Endometriumkarzinom	9	8	100.0	0.0	0.0	0.0
	Endometrioides Ovarialkarzinom	130	121	88.4	5.8	5.0	0.8
	Seröses Ovarialkarzinom	580	536	89.0	8.6	2.4	0.0
	Muzinöses Ovarialkarzinom	101	85	95.3	1.2	3.5	0.0
	Klarzelliges Ovarialkarzinom	51	49	98.0	2.0	0.0	0.0
	Karzinom des Ovars	47	47	87.2	8.5	4.3	0.0
	Granulosazelltumor des Ovars	44	37	100.0	0.0	0.0	0.0
	Leydigzelltumor des Ovars	4	4	100.0	0.0	0.0	0.0
	Sertolizelltumor des Ovars	1	1	100.0	0.0	0.0	0.0
	Sertoli-Leydigzelltumor des Ovars	3	3	100.0	0.0	0.0	0.0
	Steroidzelltumor des Ovars	3	3	100.0	0.0	0.0	0.0
	Brenner-Tumor	41	40	97.5	2.5	0.0	0.0
Mamma	Invasives Mammakarzinom (NST)	1764	1675	97.4	2.1	0.5	0.1
	Lobuläres Mammakarzinom	363	340	99.4	0.6	0.0	0.0
	Medulläres Mammakarzinom	34	33	97.0	0.0	3.0	0.0
	Tubuläres Mammakarzinom	29	24	100.0	0.0	0.0	0.0
	Muzinöses Mammakarzinom	65	57	100.0	0.0	0.0	0.0
	Phylloides-Tumor der Mamma	50	44	100.0	0.0	0.0	0.0

	Tumorentität	Pax-6-Immunfärbung					
		Auf TMA (n)	Analysierbar (n)	Negativ (%)	Schwach (%)	Moderat (%)	Stark (%)
Gastrointestinal	Adenomatöser Polyp, low-grade Dysplasie	50	50	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenomatöser Polyp, high-grade Dysplasie	50	50	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom des Kolons	2483	2290	99.7	0.3	0.1	0.0
	Adenokarzinom des Magens, diffuser Typ	215	198	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom des Magens, intestinaler Typ	215	204	98.5	1.0	0.5	0.0
	Adenokarzinom des Magens, gemischter Typ	62	62	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom des Ösophagus	83	71	98.6	0.0	1.4	0.0
	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	76	61	98.4	1.6	0.0	0.0
	Plattenepithelkarzinom des Analkanals	91	80	96.3	1.3	2.5	0.0
	Cholangiokarzinom	58	57	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom der Gallenblase	51	49	98.0	2.0	0.0	0.0
	Klatskin-Tumor der Gallenblase	42	36	100.0	0.0	0.0	0.0
	Hepatozelluläres Karzinom	312	275	99.6	0.0	0.4	0.0
	Duktales Adenokarzinom des Pankreas	659	642	99.1	0.9	0.0	0.0
	Ampulläres Adenokarzinom des Pankreas	98	98	98.0	1.0	1.0	0.0
	Azinuszellkarzinom des Pankreas	18	18	100.0	0.0	0.0	0.0
	Gastrointestinaler Stroma-Tumor (GIST)	62	61	100.0	0.0	0.0	0.0

	Tumorentität	Pax-6-Immunfärbung					
		Auf TMA (n)	Analysierbar (n)	Negativ (%)	Schwach (%)	Moderat (%)	Stark (%)
Gastrointestinal	Appendix, neuroendokriner Tumor (NET)	25	21	95.2	0.0	0.0	4.8
	Kolorektal, neuroendokriner Tumor (NET)	12	11	100.0	0.0	0.0	0.0
	Ileum, neuroendokriner Tumor (NET)	53	52	98.1	0.0	0.0	1.9
	Pankreas, neuroendokriner Tumor (NET)	101	89	29.2	10.1	14.6	46.1
	Kolorektal, neuroendokrines Karzinom (NEC)	14	12	83.3	8.3	8.3	0.0
	Ileum, neuroendokrines Karzinom (NEC)	8	8	100.0	0.0	0.0	0.0
	Gallenblase, neuroendokrines Karzinom (NEC)	4	4	50.0	50.0	0.0	0.0
	Pankreas, neuroendokrines Karzinom (NEC)	14	14	57.1	14.3	14.3	14.3
Harnwege	Nicht invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2 low grade	177	171	100.0	0.0	0.0	0.0
	Nicht invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2 high grade	141	136	100.0	0.0	0.0	0.0
	Nicht invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G3	219	139	100.0	0.0	0.0	0.0
	Urothelkarzinom, pT2-4 G3	735	636	97.0	2.0	0.6	0.3
	Plattenepithelkarzinom der Harnblase	22	20	100.0	0.0	0.0	0.0
	Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom der Harnblase	23	17	58.8	23.5	5.9	11.8

	Tumorentität	Pax-6-Immunfärbung					
		Auf TMA (n)	Analysierbar (n)	Negativ (%)	Schwach (%)	Moderat (%)	Stark (%)
Harnwege	Sarkomatoides Urothelkarzinom	25	19	94.7	0.0	5.3	0.0
	Urothelkarzinom des Nierenbeckens	62	54	96.3	3.7	0.0	0.0
	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	1287	1134	99.7	0.2	0.0	0.1
	Papilläres Nierenzellkarzinom	368	317	100.0	0.0	0.0	0.0
	Klarzelliges (tubuläres) papilläres Nierenzellkarzinom	26	24	100.0	0.0	0.0	0.0
	Chromophobes Nierenzellkarzinom	170	150	100.0	0.0	0.0	0.0
	Onkozytom	257	223	100.0	0.0	0.0	0.0
Männlicher Genitaltrakt	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 3+3	83	78	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 4+4	80	69	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 5+5	85	79	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom der Prostata (Rezidiv)	258	243	99.6	0.0	0.4	0.0
	Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom der Prostata	19	7	71.4	28.6	0.0	0.0
	Seminom	682	675	99.7	0.3	0.0	0.0
	Embryonales Karzinom des Hodens	54	49	95.9	2.0	0.0	2.0
	Leydigzelltumor des Hodens	31	22	100.0	0.0	0.0	0.0
	Sertolizelltumor des Hodens	2	2	100.0	0.0	0.0	0.0

	Tumorentität	Pax-6-Immunfärbung					
		Auf TMA (n)	Analysierbar (n)	Negativ (%)	Schwach (%)	Moderat (%)	Stark (%)
Männlicher Genitaltrakt	Keimstrang-Stromatumor des Hodens	1	1	100.0	0.0	0.0	0.0
	Spermatozytischer Tumor des Hodens	13	12	41.7	33.3	8.3	16.7
	Dottersacktumor	53	48	75.0	20.8	4.2	0.0
	Teratom	53	47	97.9	2.1	0.0	0.0
	Plattenepithelkarzinom des Penis	92	72	94.4	5.6	0.0	0.0
Endokrinum	Schilddrüsenadenom	113	111	100.0	0.0	0.0	0.0
	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	391	356	100.0	0.0	0.0	0.0
	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	154	145	100.0	0.0	0.0	0.0
	Medulläres Schilddrüsenkarzinom	111	107	100.0	0.0	0.0	0.0
	Nebenschilddrüsenadenom	43	27	100.0	0.0	0.0	0.0
	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	45	43	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenom der Nebennierenrinde	50	47	100.0	0.0	0.0	0.0
	Karzinom der Nebennierenrinde	28	28	100.0	0.0	0.0	0.0
	Phäochromozytom	50	50	100.0	0.0	0.0	0.0
Hämatopoetisches und lymphathisches Gewebe	Hodgkin-Lymphom	103	94	95.7	0.0	3.2	1.1
	Kleinzelliges lymphozytisches Lymphom, B-Zell Typ (B-SLL/B-CLL)	50	39	100.0	0.0	0.0	0.0
	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom (DLBCL)	113	93	100.0	0.0	0.0	0.0
	Follikuläres Lymphom	88	70	98.6	1.4	0.0	0.0

	Tumorentität	Pax-6-Immunfärbung					
		Auf TMA (n)	Analysierbar (n)	Negativ (%)	Schwach (%)	Moderat (%)	Stark (%)
Hämatopoetisches und lymphathisches Gewebe	T-Zell Non-Hodgkin-Lymphom	25	20	95.0	5.0	0.0	0.0
	Mantelzell-Lymphom	18	12	100.0	0.0	0.0	0.0
	Marginalzonen-Lymphom	16	12	100.0	0.0	0.0	0.0
	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL) im Hoden	16	16	100.0	0.0	0.0	0.0
	Burkitt-Lymphom	5	1	100.0	0.0	0.0	0.0
Weichteilgewebe und Knochen	Tendosynovialer Riesenzelltumor	45	28	100.0	0.0	0.0	0.0
	Granularzelltumor	53	29	100.0	0.0	0.0	0.0
	Leiomyom	50	50	100.0	0.0	0.0	0.0
	Leiomyosarkom	94	87	95.4	0.0	3.4	1.1
	Liposarkom	145	120	100.0	0.0	0.0	0.0
	Maligner Tumor der peripheren Nervenscheiden (MPNST)	15	14	100.0	0.0	0.0	0.0
	Myofibrosarkom	26	26	100.0	0.0	0.0	0.0
	Angiosarkom	74	53	100.0	0.0	0.0	0.0
	Angiomyolipom	91	89	100.0	0.0	0.0	0.0
	Dermatofibrosarkoma protuberans	21	16	100.0	0.0	0.0	0.0
	Ganglioneurom	14	14	100.0	0.0	0.0	0.0
	Kaposi-Sarkom	8	4	100.0	0.0	0.0	0.0
	Neurofibrom	117	117	100.0	0.0	0.0	0.0
	Sarkom (NOS)	74	69	92.8	5.8	1.4	0.0
	Paragangliom	41	41	100.0	0.0	0.0	0.0
	Ewing-Sarkom	23	16	100.0	0.0	0.0	0.0
	Rhabdomyosarkom	7	6	100.0	0.0	0.0	0.0
	Schwannom	122	121	100.0	0.0	0.0	0.0

	Tumorentität	Pax-6-Immunfärbung					
		Auf TMA (n)	Analysierbar (n)	Negativ (%)	Schwach (%)	Moderat (%)	Stark (%)
Weichteilgewebe und Knochen	Tendosynovialer Riesenzelltumor	12	11	100.0	0.0	0.0	0.0
	Osteosarkom	44	28	100.0	0.0	0.0	0.0
	Chondrosarkom	40	22	100.0	0.0	0.0	0.0
	Rhabdoid-Tumor	5	5	100.0	0.0	0.0	0.0
	Solitärer fibröser Tumor	17	14	100.0	0.0	0.0	0.0

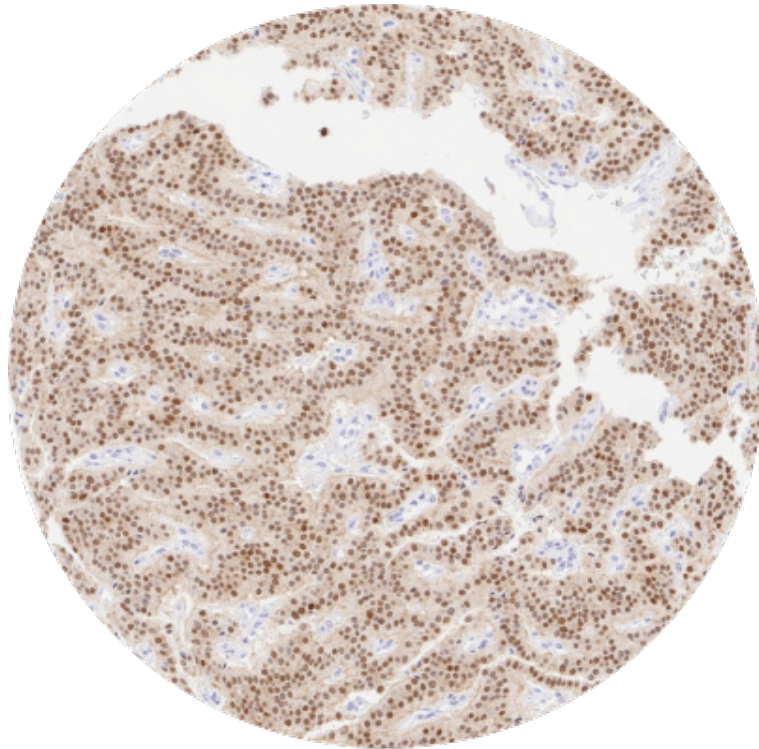


Abbildung 38: Neuroendokriner Tumor (NET) des Pankreas mit kräftiger nukleärer Pax-6-Färbung.

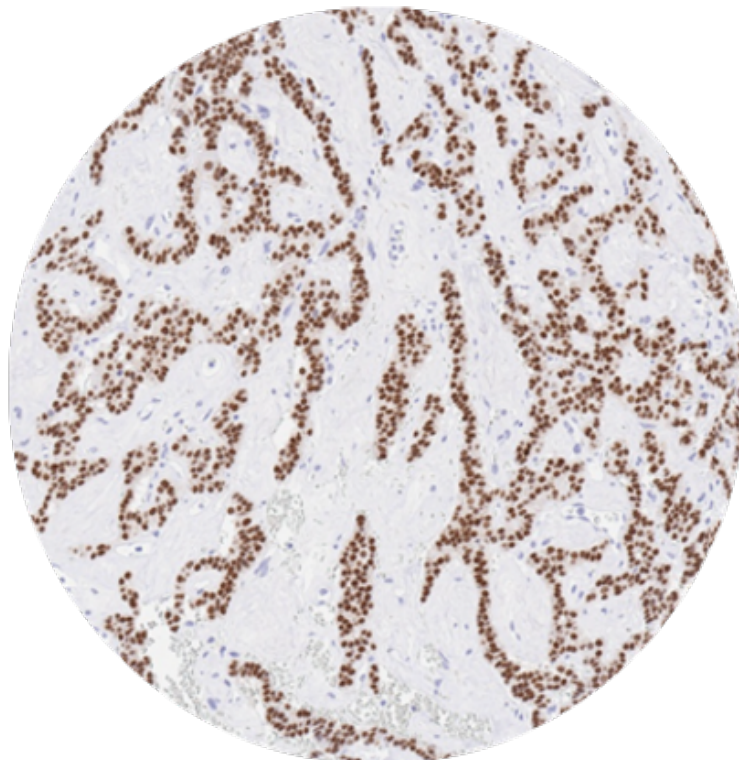


Abbildung 39: Neuroendokrines Karzinom (NEC) des Pankreas mit kräftiger nukleärer Pax-6-Positivität in allen Tumorzellen.

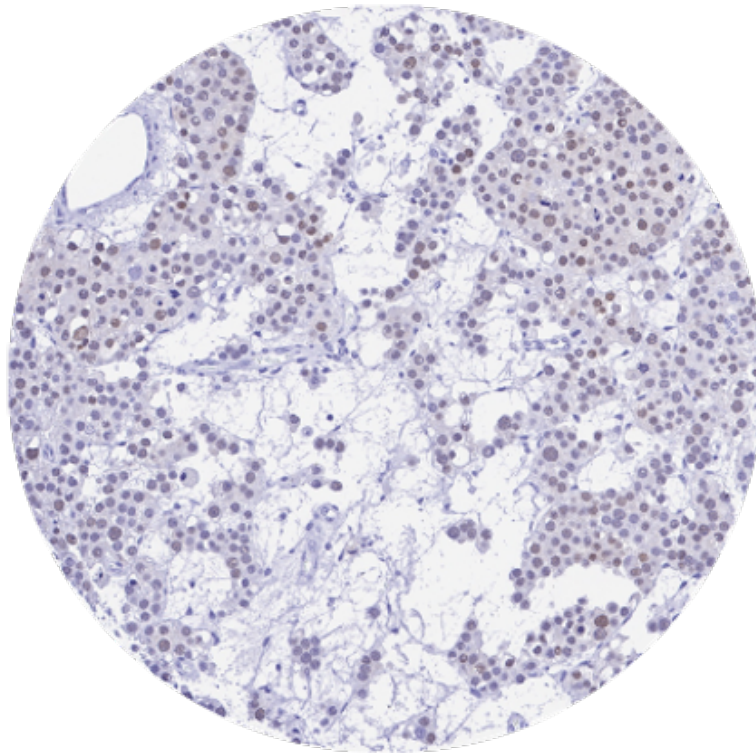


Abbildung 40: Spermatozytischer Tumor des Hodens mit gering- bis mäßiggradiger nukleärer Pax-6-Positivität in der Mehrzahl der Tumorzellen.

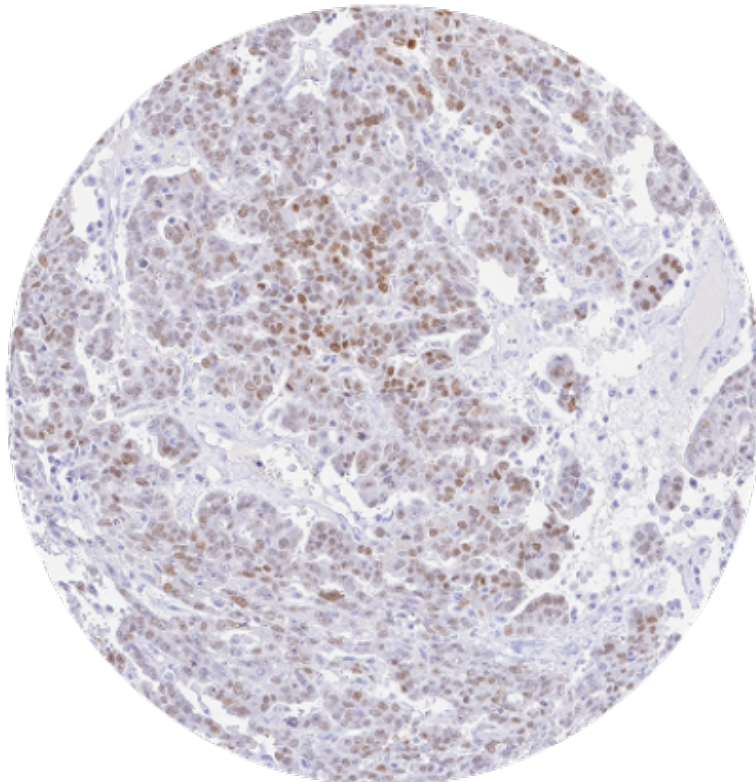


Abbildung 41: Seröses high-grade-Karzinom des Ovars mit nukleärer Pax-6-Positivität der meisten Tumorzellen.

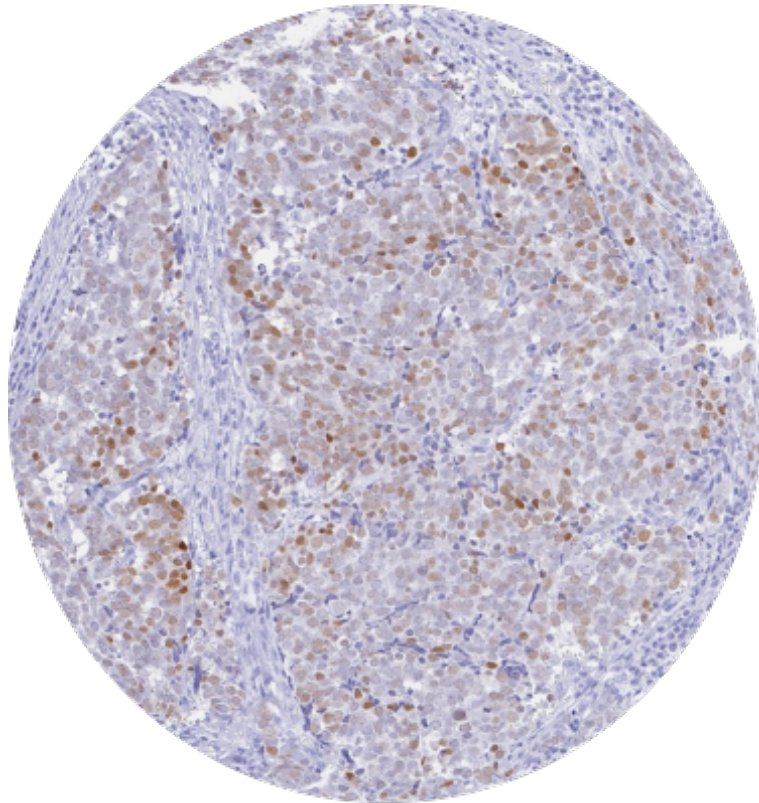


Abbildung 42: Merkelzellkarzinom der Haut mit inhomogener (geringgradiger bis stark ausgeprägter) nukleärer Anfärbung von Tumorzellen.

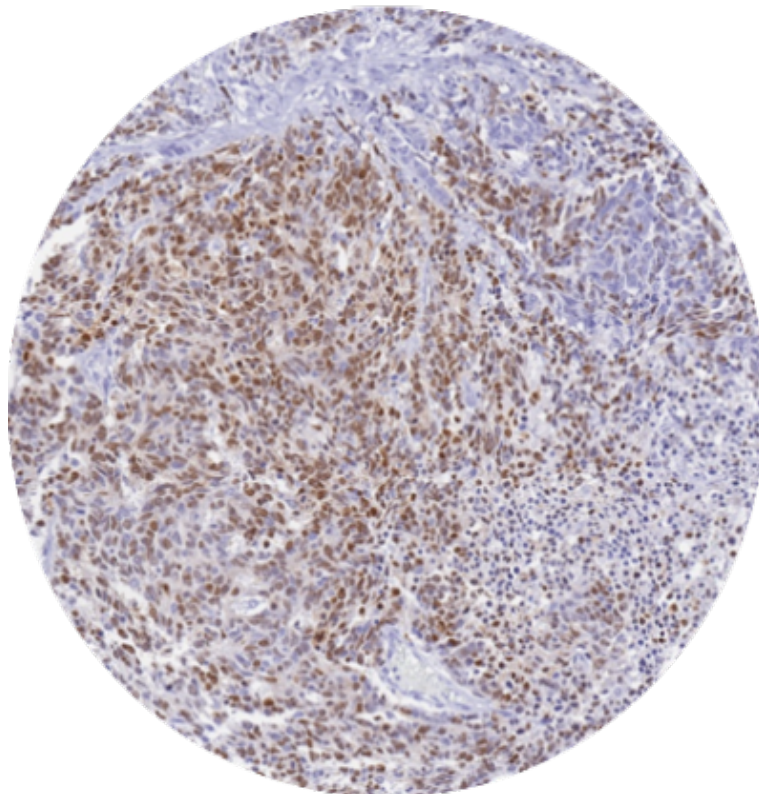


Abbildung 43: Kleinzelliges NEC der Harnblase mit kräftiger nukleärer Pax-6-Positivität von > 90% der Tumorzellen.

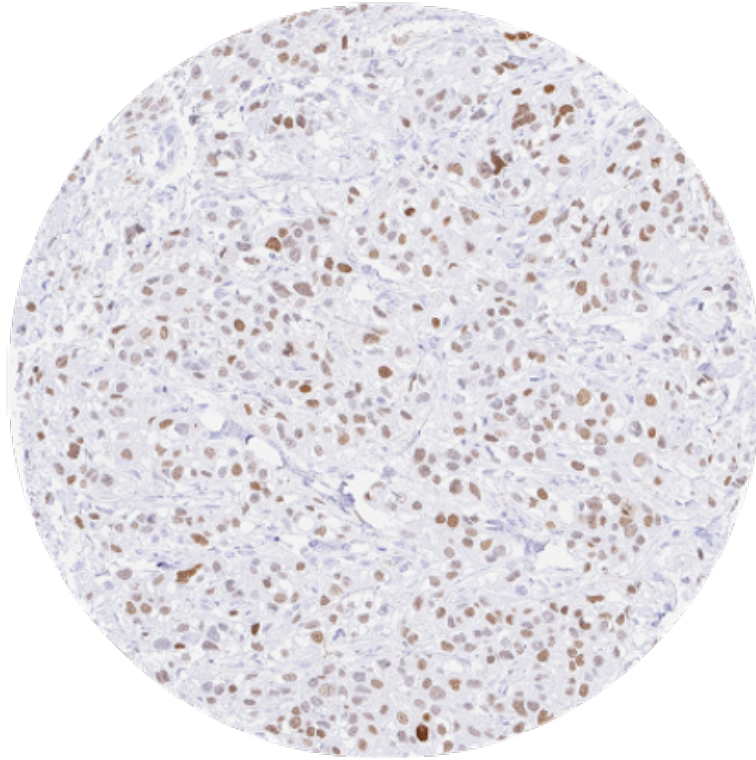


Abbildung 44: Mamma-Karzinom von keinem speziellen Typ (NST) mit kräftiger nukleärer Pax-6-Färbung von zahlreichen Tumorzellen.

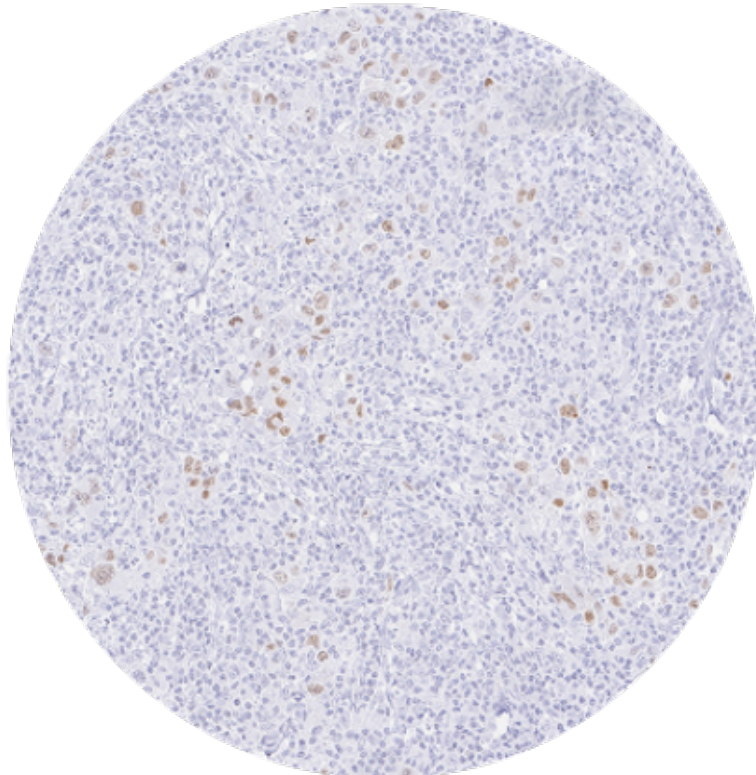


Abbildung 45: Hodgkin-Lymphom mit distinkter Pax-6-Färbung von Reed-Sternberg- und Hodgkin-Zellen.

4.4 Pax-6-, Progesteron-Rezeptor- und GAD2-Färbung bei NEN

Daten zur Expression vom Progesteron-Rezeptor (PR) und GAD2 – zwei andere Marker, welche bevorzugt in neuroendokrinen Neoplasien (NEN) mit pankreatischem Ursprung exprimiert werden – waren in 397 und 384 der NEN mit Pax-6-Daten aus unseren Studien vorhanden (Viehweger et al., 2022; Lennartz et al., 2024). Eine grafische Darstellung der individuellen Ergebnisse für diese Marker (A), der Kombination von Pax-6 und PR (B), der Kombination von Pax-6 und GAD2 (C) und der Kombination von Pax-6, GAD2 und PR (D) liegt in Abbildung 46 und Abbildung 47 vor.

Der Vergleich der drei Parameter – dargestellt in Tabelle 12 – zeigt, dass für die Diagnose eines pankreatischen Tumorursprungs die Sensitivität am höchsten für Pax-6 ist (68,7%), gefolgt von GAD2 (62,6%) und PR (52,5%). Dagegen ist die Spezifität am höchsten für GAD2 (95,2%), gefolgt von PR (91,3%) und Pax-6 (91,1%). Von den in dieser Untersuchung getesteten Kombinationen – bestehend aus GAD2, PR und Pax-6 – ergab sich die beste Sensitivität (53,8%) und Spezifität (100%) für die Kombination Pax-6 / GAD2. Allerdings zeigten die anderen möglichen Kombinationen wie Pax-6 / PR (49,5% / 99,3%), PR / GAD2 (40,7% / 98,9%) und Pax-6 / PR / GAD2 (40,6% / 100%) ebenfalls eine sehr hohe Spezifität. Nur 14% von 118 NEN mit Negativität für alle drei Antikörper waren pankreatischen Ursprungs.

Tabelle 12: Vergleich der Sensitivität und Spezifität der Marker Pax-6, GAD2 und PR allein und in verschiedenen Kombinationen für die Erkennung pankreatischen Tumorursprungs.

Marker	Für pankreatischen Tumorursprung:		Häufigste Differentialdiagnosen
	Sensitivität	Spezifität	
Pax-6	68.7	91.1	NEC der Gallenblase, kolorektales NEC, NET der Appendix, ilealer NET, Lungen-NET, Merkelzellkarzinom, kleinzelliges Karzinom der Prostata and Harnblase
GAD2	62.6	95.2	Lungen-NET, Paragangliom
PR	52.5	91.3	Medulläres Schilddrüsenkarzinom, NET der Appendix, kleinzelliges Karzinom der Prostata and Harnblase
Pax-6 and GAD2	53.8	100.0	
Pax-6 and PR	49.5	99.3	
PR and GAD2	40.7	98.9	
Pax-6, PR and GAD2	40.6	100.0	

A

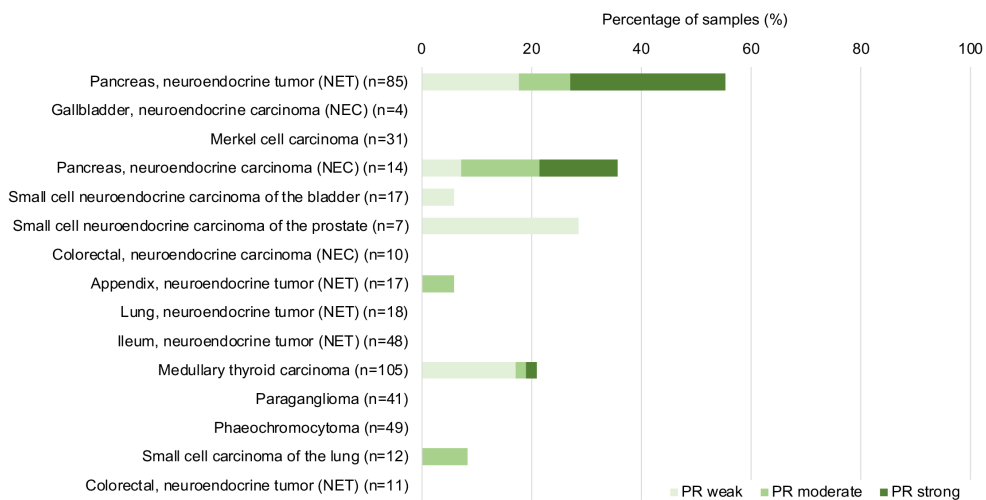
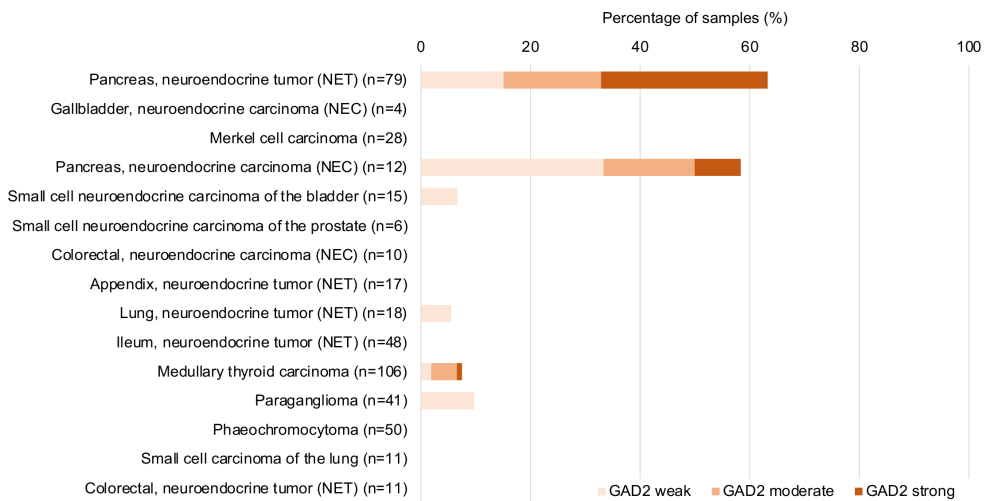
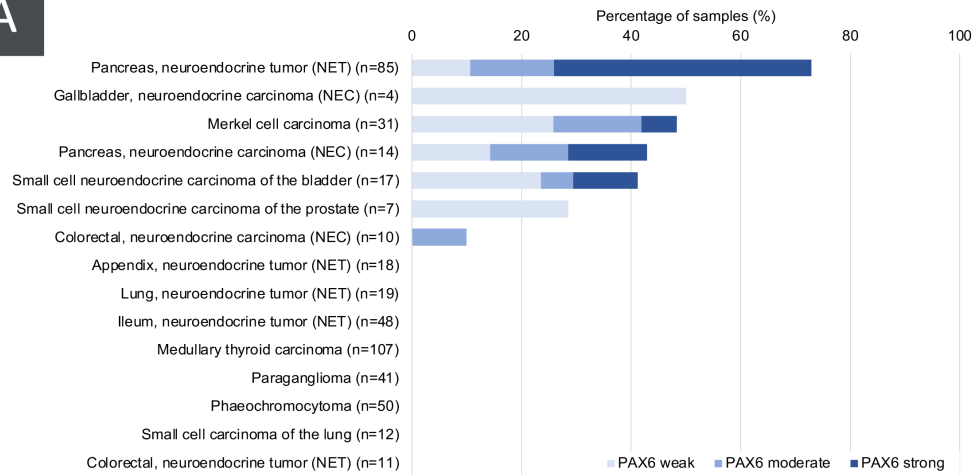


Abbildung 46: Grafische Darstellung der individuellen Ergebnisse für die Marker Pax-6, GAD2 und PR (A).

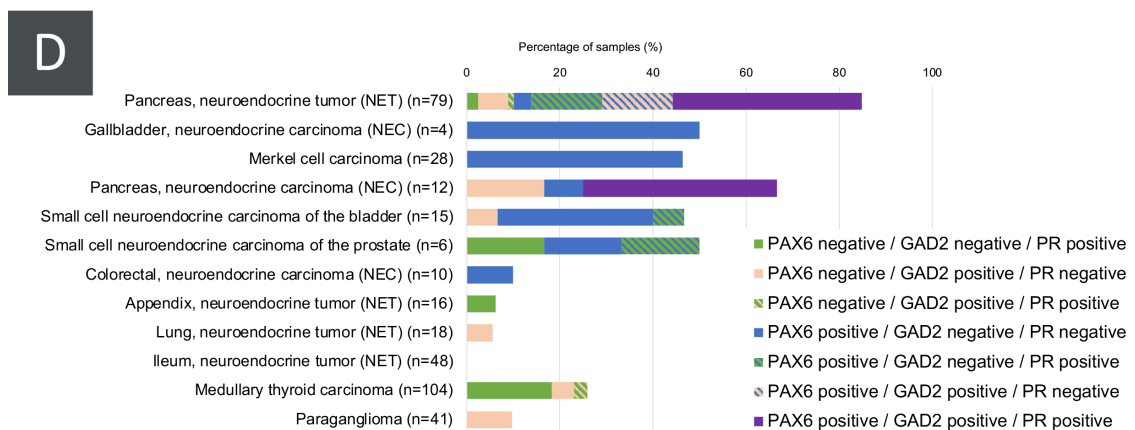
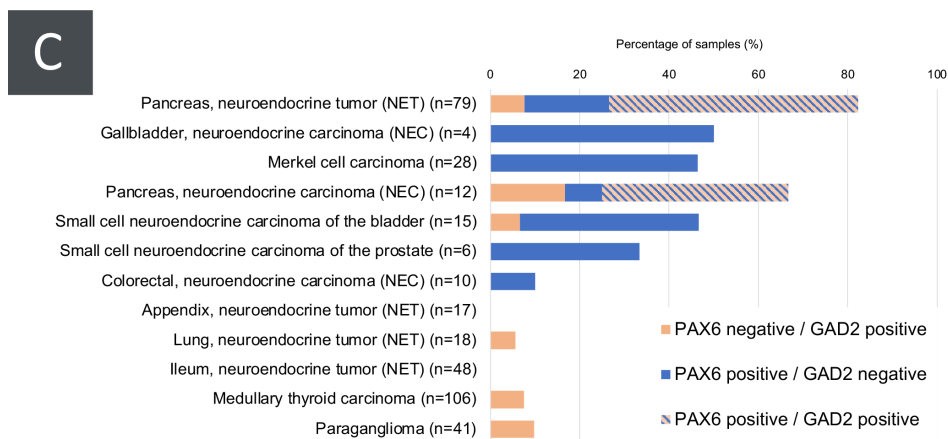
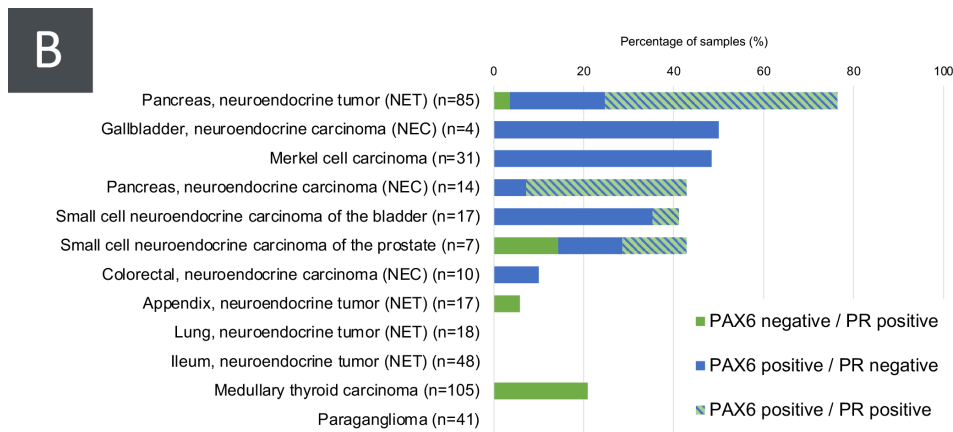


Abbildung 47: Grafische Darstellung der Kombinationen von Pax-6 und PR (B), Pax-6 und GAD2 (C) und Pax-6, GAD2 und PR (D).

5 Diskussion

Unsere immunhistochemische Untersuchung von 19.214 Tumoren von 150 verschiedenen Tumorentitäten ergab eine umfassende Übersicht zur Pax-6-Proteinexpression in humanen Tumoren und identifizierte dabei eine signifikante diagnostische Bedeutung der Pax-6-Immunhistochemie für die Abgrenzung von pankreatischen und extrapankreatischen neuroendokrinen Neoplasmen (NEN).

Der Nachweis der höchsten Pax-6-Positivitätsrate in pankreatischen und extrapankreatischen Neoplasien passt gut zu unseren Normalgewebefunden mit Pax-6-Positivität in zahlreichen neuroendokrinen Zellen; nicht nur im Pankreas, sondern vor allem auch im übrigen Gastrointestinaltrakt.

Mit der Ausnahme von Gliazellen, welche häufig Ursprung von Hirntumoren sind, sind die meisten anderen normalen Zelltypen mit Pax-6-Positivität – wie respiratorisches Epithel, paranasale Drüsen oder Epithelzellen der Adenohypophyse – nur selten Ausgangsort für die Entstehung maligner Tumoren. Angesichts des Fehlens nachweisbarer Pax-6-Proteinmengen in ihren normalen Vorläuferzellen dürfte die Pax-6-Positivität in gynäkologischen Tumoren, testikulären Neoplasien, Plattenepithelkarzinomen von verschiedenen Ursprungsorten und in weiteren gelegentlich Pax-6-positiven Tumoren entweder einer Neoexpression von Pax-6 entsprechen oder aber einer Hochregulation von Pax-6 in Zellen mit vorher nur sehr geringen (mit unseren Immunhistochemie-Protokollen nicht nachweisbaren) Pax-6-Mengen.

Eine Hochregulation von Proteinen in Tumoren ist häufig assoziiert mit einer onkogenen Rolle der betreffenden Proteine (zusammengefasst in Pessoa et al., 2022). Die Funktion von Pax-6, sowohl in normalen als auch in Tumorzellen, ist aber bisher nicht vollständig verstanden. Tatsächlich wurde eine onkogene Rolle von Pax-6 von Wu et al. postuliert (Wu et al., 2019). Die Autoren hatten bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen herausgefunden, dass eine Überexpression von Pax-6 die Metastasierung via Förderung der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) begünstigt. Auch weitere Daten unterstützen die Hypothese einer onkogenen Rolle von Pax-6. Zhao et al. fanden heraus, dass die Hemmung von Pax-6 sowohl das Zellwachstum als auch die Bildung von Kolonien in Zelllinienexperimenten hemmt (Zhao et al., 2014). Liu et al. zeigten eine verminderte Zellproliferation, Zellmigration und Invasionsfähigkeit von Retinoblastomzellen nach artifiziellem Silencing von Pax-6 (Liu et al., 2019).

Allerdings hatten andere Autoren auch Hinweise auf eine tumorsuppressive Rolle von Pax-6 gefunden. Beispielsweise fanden Farheen et al. eine gesteigerte Zellproliferation nach artifiziellem Knockdown von Pax-6 in Gliomzellen und Shyr et al. stellten ein vermindertes

Zellwachstum und eine verminderte Fähigkeit zur Ausbildung von Kolonien bei Prostatakarzinom-Zelllinien nach Überexpression von Pax-6 fest (Farheen et al., 2023; Shyr et al., 2010).

Die signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit einer Pax-6-Positivität zwischen NEN verschiedener Ursprungsorte suggerieren eine mögliche diagnostische Anwendung der Pax-6-Immunhistochemie zur Festlegung der Herkunft von metastastischen NET. Diese Anwendung der Pax-6-Immunhistochemie scheint jedoch vor allem für NET, aber weniger für NEC anwendbar zu sein. Denn eine Pax-6-Positivität fand sich in lediglich 3% der extrapankreatischen NET, aber in immerhin 25% der extrapankreatischen NEC.

Passend zu unseren Befunden war die Pax-6-Immunhistochemie bereits früher als diagnostisches Verfahren zur Unterscheidung pankreatischer NET von neuroendokrinen Tumoren anderer Ursprungsorte vorgeschlagen worden, obwohl Pax-6-Positivitäten gehäuft auch in duodenalen und kolorektalen neuroendokrinen Tumoren gefunden worden waren (Lai et al., 2015; Mohanty et al., 2021).

Immunhistochemische Marker zur Abgrenzung von neuroendokrinen Tumoren unterschiedlicher Entstehungsorte sind sehr gefragt, denn immerhin manifestieren sich 10-20% aller NET initial als Metastasen (Bellizzi, 2013; zusammengefasst in Bellizzi, 2020). Während der Ausgangsort eines Karzinoms bei disseminierter Metastasierung in vielen klinischen Situationen von eher untergeordneter Rolle ist, spielt der Entstehungsort von NEN für Therapie und Prognose eine erhebliche Rolle (Yao et al., 2011; zusammengefasst in Bellizzi, 2020). Das mittlere Patientenüberleben bei jejunoilealen, pankreatischen und bronchopulmonalen NET beträgt jeweils etwa 65, 27 und 17 Monate (Yao et al., 2011; zusammengefasst in Bellizzi, 2020). Patienten mit pankreatischen NET werden oft mit Everolimus und Capecitabin/Temozolomid behandelt, während diese Kombination bei gastrointestinalen NET weniger angewendet wird (Kunz et al., 2013; zusammengefasst in Bellizzi, 2020).

Der Ursprungsort eines NET beeinflusst auch die mögliche chirurgische Strategie. Eine chirurgische Entfernung des Primärtumors erfolgt insbesondere bei NET des Dünndarms, da diese Tumoren sowohl zu einem akuten Darmverschluss als auch zu chronischen Blutungen mit Ausbildung einer Anämie führen können (Howe et al., 2017; Bellizzi, 2020; Scott et al., 2020).

Obwohl sich histogische Aspekte teilweise zwischen NET unterschiedlicher Lokalisationen etwas unterscheiden können, ist bereits der Versuch einer morphologischen Abgrenzung des Ursprungsortes von NEN heute obsolet. Beim Vorliegen von Metastasen von NET/ NEC mit unbekanntem Ursprungsort kommen daher regelmäßig Antikörper-Panels zum Einsatz (Bellizzi, 2020).

Die Liste früher vorgeschlagener immunhistochemischer Marker für die Abgrenzung pankreatischer von nicht-pankreatischen NET beinhaltet Islet-1, PR, GAD2, Pax-6 und polyklonales Pax-8 (zusammengefasst in Bellizzi, 2020; Viehweger et al., 2022). Für Islet-1 wurde früher eine Sensitivität von bis zu 75% berichtet, wobei extrapankreatische Positivitäten vor allem in duodenalen und rektalen NET, aber auch in medullären Karzinomen der Schilddrüse gefunden wurden (Koo et al., 2012; Bellizzi, 2020; Xiang et al., 2023). GAD2 hat eine hohe Spezifität für NET des Pankreas, wird aber auch insbesondere in NET der Lunge gefunden (Lennartz et al., 2024). Eine Expression von Progesteron-Rezeptor (PR) wurde früher in 54-82% aller pankreatischen NEN gefunden, wobei eine PR-Positivität auch in NET der Appendix, kleinzelligen Karzinomen der Lunge und in kleinzelligen NEC der Harnblase gefunden worden war (Viale et al., 1992; Viehweger et al., 2022). Da Pax-6 auch von verschiedenen, kreuzreagierenden mono- und polyklonalen Pax-8-Antikörpern angefärbt wird, wurde Pax-8 ebenfalls als Marker für pankreatischen Ursprung von NEN beschrieben, allerdings wurde eine Positivität auch in NETs von Lunge, Appendix, Kolorektum, Magen und Ileum beschrieben (Toriyama et al., 2014; Lai et al., 2015; Mohanty et al., 2021).

Da an der gleichen Tumorkohorte bereits früher GAD2 und PR immunhistochemisch untersucht worden waren, war es uns möglich, unsere Pax-6-Daten mit diesen früher erhobenen GAD2- und PR-Daten zu vergleichen und zu klären, inwieweit der kombinierte Einsatz dieser Marker einen gesteigerten diagnostischen Nutzen erbringt (Viehweger et al. 2022; Lennartz et al., 2024). Während Pax-6 (69%) von allen Markern der sensitivste und GAD2 (95%) der spezifischste war, zeigte sich, dass für Tumoren mit einer Positivität auf zwei der drei Marker eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit (99-100%) für einen pankreatischen Ursprung vorlag. Darüber hinaus stammten nur 14% der NEN mit Negativität für alle drei Antikörper aus dem Pankreas. Die Gesamtheit dieser Daten suggeriert, dass die Kombination aus Pax-6, PR und GAD2 eine potente Kombination für die Abgrenzung pankreatischer von nicht-pankreatischen NET/NEC darstellt.

Die wesentlichsten Stärken dieser Studie liegen in der sehr großen Fallzahl, der maximalen Standardisierung der Analyse und der sorgfältigen Validierung unseres Assays. Die Zahl von 17.224 erfolgreich auf die Expression von Pax-6 untersuchten Tumoren übersteigt die Gesamtzahl der bisher auf Pax-6 untersuchten Tumoren um ein Weites. In 12 von uns identifizierten immunhistochemischen Studien – dargestellt in Tabelle 13 – zur Expression von Pax-6 in Tumoren waren lediglich 2.061 Tumoren untersucht worden, gerade 12% der aktuellen Studie.

Tabelle 13: Übersicht über die bisherige immunhistochemische Studienlage zur Expression von Pax-6 in Tumoren. Die Tabelle gibt einen Überblick über die im Rahmen der jeweiligen Studie untersuchten Tumorentitäten sowie die zugehörigen Fallzahlen.

Publikation	Tumorentität	Anzahl untersuchter Tumoren (n)
Abiko et al., 2010	Teratom, Ovar	18
Farheen et al., 2023	Gliom	25
Kiselev et al., 2018	Adenokarzinom der Lunge	113
	Plattenepithelkarzinom der Lunge	191
Kozmik et al., 1995	Medulloblastom	23
Lai et al., 2015	Colorektaler NET	10
	Duodener NET	12
	Ileum, NET	22
	Lebermetastase NET (Duodenum)	1
	Lebermetastase NET (Ileum)	37
	Lebermetastase NET (Lunge)	5
	Lebermetastase NET (Pankreas)	24
	Lebermetastase NET (Rektum)	1
	Lunge, NET	30
	Magen, NET	10
	Pankreas, NET	26
Mascarenhas et al., 2009	Duktales Adenokarzinom des Pankreas	46
Mohanty et al., 2021	Appendix, NET	5
	Colorektaler NET	6
	Duodener NET	4
	Ileum, NET	22
	Lunge, NET	26
	Magen, NET	5
	Pankreas, NET	50
Tabasaran et al., 2022	Ependymom	172
Thill et al., 2011	Uveales Melanom	8
Toriyama et al., 2014	Adenokarzinom der Lunge	253

Publikation	Tumorentität	Anzahl untersuchter Tumoren (n)
Toriyama et al., 2014	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	5
	Follikuläres Schilddrüsenadenom	5
	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	7
	Großzelliges Lungenkarzinom	11
	Karzinom des Thymus	36
	Kleinzelliges Lungenkarzinom	67
	Lunge, NET (großzellig)	106
	Lunge, NET (Karzinoid)	51
	Mesotheliom, epitheloid and biphasisch	40
	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	80
	Plattenepithelkarzinom der Lunge	158
	Pleomorphes Karzinom der Lunge	41
	Thymom	102
Xia et al., 2015	Invasives Mamma-Karzinom, NST	111
Zhang et al., 2009	Pankreas, NET	96
Gesamt		2061

Die große Zahl der in unser Projekt eingeschlossenen Fälle wurde ermöglicht durch die Anwendung der Tissue-Microarray-Methode (TMA) und die intensiven Vorarbeiten, welche in den letzten Jahren durch engagierte Pathologen, Medizinische Technologen, Wissenschaftler und Doktoranden erfolgt waren.

Die kontinuierliche Verwendung von TMAs für Studien bringt aber auch den Vorteil, dass zunehmend Vergleichsdaten vorliegen, welche genutzt werden können. Die vorliegende Arbeit profitiert dabei wesentlich vom Vorliegen von Daten zu PR und GAD2, zwei anderen Markern mit hoher Spezifität für einen neuroendokrinen Ursprung pankreatischer Tumoren (Viehweger et al., 2022; Lennartz et al., 2024).

TMAs bringen für Studien nicht nur erhebliche ökonomische und Geschwindigkeitsvorteile, sondern erlauben auch eine Standardisierung in einem Ausmaß, wie diese früher für gewebebasierte Analysen nicht möglich war (vgl. Mengel et al., 2003; Simon et al., 2004). Neben Parametern wie Reagenzienkonzentration, Inkubationstemperatur und Inkubationszeit, welche theoretisch auch in einem Färbeautomaten standardisiert werden

können, sind auch Parameter wie die Schnittlagerungszeit (Zeit zwischen Herstellung eines Schnittes und seiner Verwendung für die immunhistochemische Färbung) oder die pro Patienten untersuchte Tumormenge standardisiert (Mengel et al., 2003; Simon et al., 2004; zusammengefasst in Jawhar, 2009). Je länger ein Schnitt auf seine immunhistochemische Färbung wartet, desto geringer wird die Färbeintensität und bereits nach zwei Wochen kann für viele Antikörper eine deutliche Verminderung der Anfärbbarkeit festgestellt werden (Jacobs et al., 1996; Mirlacher et al., 2004). Auch die Gewebemenge, welche pro Patienten untersucht wird, hat einen Einfluss auf die Ergebnisse immunhistochemischer Studien: Je mehr Gewebe untersucht wird, desto größer wird die Wahrscheinlichkeit, entweder biologisch relevante oder biologisch irrelevante fokale Veränderungen nachzuweisen oder aber auch Artefakte zu identifizieren (Camp et al., 2000; Torhorst et al., 2001; Kallioniemi et al., 2001).

Angeichts der Größe der durchgeführten Studie und der Werthaltigkeit der eingesetzten TMAs wurde auch ein besonderes Augenmerk auf eine angemessene Validierung der verwendeten Antikörper gelegt. Entsprechend den Empfehlungen der internationalen Arbeitsgruppe für Antikörper-Validierung (*international working group for antibody validation, iwgapv*) wurden unsere immunhistochemischen Befunde an Normalgeweben sowohl mit den Färbeergebnisse durch einen anderen, unabhängigen Pax-6-Antikörper, als auch mit RNA-Daten von drei verschiedenen, öffentlich zugänglichen Datenbanken verglichen (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007372-PAX6/summary/rna>; Consortium, G.T., 2013; Lizio et al., 2015; Thul et al., 2017; Lizio et al., 2019). Zudem wurde ein sehr breites Kollektiv von 76 verschiedenen Normalgeweben verwendet, welches Proben von praktisch allen Organen des erwachsenen Menschen beinhaltet. Die Verwendung eines dermaßen großen Sets von verschiedenen Normalgeweben stellt sicher, dass die überwiegende Mehrzahl der bei adulten humanen Geweben exprimierten Proteine auch für eine Testung auf Kreuzreaktivität zu Verfügung stand. Die Validität unseres Pax-6-Antikörpers MSVA-706M wurde letztlich durch die Validierungsdaten belegt. Eine immunhistochemische Pax-6-Positivität fand sich in allen Organen mit eindeutiger Pax-6-RNA-Expression (Hirn, Hypophyse, Pankreas, Magen, Duodenum). Alle Zelltypen, welche mit unserem Studienantikörper angefärbt wurden, wurden auch mit einem zweiten, unabhängigen Pax-6-Antikörper als positiv bestätigt. Dass diese immunhistochemische Untersuchung auch zum Nachweis einer Pax-6-Expression in Organen führte, bei welchen eine Pax-6-RNA-Expression bisher nicht beschrieben worden war, ist wahrscheinlich durch die kleine Menge der in diesen Organen vorkommenden Pax-6-positiven Zellen zu erklären. Wenn ganze Organe für eine RNA-Untersuchung verwendet werden, kann es ohne Weiteres vorkommen, dass die RNA von seltenen Zelltypen unterhalb der Nachweisgrenze bleibt (Kallioniemi et al., 2001; Koo et al., 2019).

Zusammengefasst geben die Daten dieser Studie eine umfassende Übersicht über die Pax-6-Expression in normalen und neoplastischen humanen Geweben und identifizieren die Pax-6-Immunhistochemie als eine nützliche Methode für die Abgrenzung pankreatischer von extrapankreatischen Neoplasmen. Der Vergleich mit früher erhobenen GAD2- und PR-Daten macht zudem deutlich, dass Pax-6 insbesondere in Kombination mit GAD2 und PR eine potente Methode zur Abgrenzung pankreatischer neuroendokriner Neoplasmen von neuroendokrinen Neoplasmen anderer Ursprungsorte darstellt.

6 Zusammenfassung

Pax-6 (Paired-Box Protein 6) spielt eine entscheidende Rolle für neurale und pankreatische Entwicklung. Die Pax-6-Expression beschränkt sich auf wenige Normalgewebe inklusive pankreatischen neuroendokrinen Zellen. Aus diesem Grund könnte die Pax-6-Immunhistochemie als Mittel zur Abgrenzung pankreatischen Ursprungs neuroendokriner Tumoren (NET) genutzt werden. Um die diagnostische Relevanz der Pax-6-Immunhistochemie bewerten zu können, wurde ein Tissue-Micorarray (TMA) mit 19.214 Proben aus 150 verschiedenen Tumortypen immunhistochemisch analysiert. Daten zur Expression von Progesteronrezeptor (PR) und GAD2 waren aus früheren Studien vorhanden. Eine Pax-6-Färbung war in 2,5% der 17.224 analysierbaren Tumoren erkennbar, davon in 1,6% schwach, in 0,6% moderat und in 0,4% stark positiv ausgeprägt. 60 von 150 Tumorkategorien zeigten eine nachweisbare Pax-6-Expression und 16 wiesen zumindest einen stark positiven Fall auf. Die höchsten Raten von Pax-6-Positivität fanden sich in pankreatischen neuroendokrinen Neoplasmen (NEN; 42,9-70,8%), anderen NEN (1,9-50%), testikulären Tumoren (0,3-58,3%), Basalzellkarzinomen der Haut (51,9%), Plattenepithelkarzinomen unterschiedlicher Herkunftsorte (1,5-11,8%) und in zahlreichen gynäkologischen Tumoren (bis zu 30%). Ein Vergleich von Pax-6, PR und GAD2 zeigte, dass für einen pankreatischen Ursprung neuroendokriner Neoplasmen die Sensitivität am höchsten für Pax-6 (68,7%) war, gefolgt von GAD2 (62,6%) und PR (52,5%); während die Spezifität am höchsten für GAD2 (95,2%) war, gefolgt von PR (91,3%) und Pax-6 (91,1%). Die analysierten Kombinationen ergaben die höchste Sensitivität (53,8%) und Spezifität (100%) für Pax-6/GAD2, aber auch die Kombinationen Pax-6/PR (49,5%/99,3%), PR/GAD2 (40,7%/98,9%) und Pax-6/PR/GAD2 (40,6%/100%) resultierten in einer hohen Spezifität. Nur 14% der 118 NEN mit Negativität für alle drei Antikörper waren pankreatischen Ursprungs. Zusammengefasst ist die Pax-6-Immunhistochemie ein nützliches diagnostisches Instrument, um eine pankreatische Herkunft bei NEN unbekannten Ursprungsortes zu identifizieren. Die Kombination mit PR und GAD2 erhöht die diagnostische Effektivität von Pax-6 weiter und führt insbesondere zu einer hohen Spezifität.

7 English summary

Pax-6 (paired box protein 6) has a pivotal role for neural and pancreatic development. Pax-6 expression is limited to few normal tissues including pancreatic neuroendocrine cells. Therefore, Pax-6 immunohistochemistry may serve as a tool for the distinction of pancreatic origin of neuroendocrine tumors. To evaluate the diagnostic utility of Pax-6 immunohistochemistry, a tissue microarray containing 19,214 samples from 150 different tumor types was analyzed by immunohistochemistry. Data on progesterone receptor (PR) and GAD2 expression were available from previous studies. Pax-6 staining was detectable in 2.5% of 17,224 analyzable tumors, including 1.6% with weak, 0.6% with moderate, and 0.4% with strong positivity. 60 of 150 tumor categories showed detectable Pax-6 expression and 16 had at least one case with strong positivity. The highest rates of Pax-6 positivity occurred in pancreatic neuroendocrine neoplasms (42.9-70.8%), other neuroendocrine neoplasms (1.9-50%), testicular tumors (0.3-58.3%), basal cell carcinomas of the skin (51.9%), squamous cell carcinomas of different sites of origin (1.5-11.8%), and in various gynecological tumors (up to 30%). A comparison of Pax-6, PR, and GAD2 revealed that for a pancreatic origin of neuroendocrine neoplasms, the sensitivity was highest for Pax-6 (68.7%) followed by GAD2 (62.6%) and PR (52.5%) while the specificity was highest for GAD2 (95.2%), followed by PR (91.3%), and Pax-6 (91.1%). Of the analyzed combinations, the highest sensitivity (53.8%) and specificity (100%) was found for Pax-6/GAD2, although combinations of PAX6/PR (49.5%/99.3%), PR/GAD2 (40.7%/98.9%), and Pax-6/PR/GAD2 (40.6%/100%) did also result in high specificity. Only 14% of the 118 neuroendocrine neoplasms with negativity for all three antibodies were of pancreatic origin. In summary, Pax-6 immunohistochemistry is a useful diagnostic tool for the identification of pancreatic origin in case of neuroendocrine neoplasms with unknown site of origin. Combination with GAD2 and PR further increase the diagnostic performance of Pax-6 and especially results in a high specificity.

8 Literaturverzeichnis

- Abiko K, Mandai M, Hamanishi J, Matsumura N, Baba T, Horiuchi A, Mikami Y, Yoshioka S, Wakasa T, Shiozawa T, Konishi I. Oct4 expression in immature teratoma of the ovary: relevance to histologic grade and degree of differentiation. *Am J Surg Pathol*. 2010 Dec;34(12):1842-8. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181fcd707. PMID: 21107090.
- Abouzeid H, Youssef MA, ElShakankiri N, Hauser P, Munier FL, Schorderet DF. PAX6 aniridia and interhemispheric brain anomalies. *Mol Vis*. 2009 Oct 17;15:2074-83. PMID: 19862335; PMCID: PMC2765237.
- Ackerman SL, Kozak LP, Przyborski SA, Rund LA, Boyer BB, Knowles BB. The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. *Nature*. 1997 Apr 24;386(6627):838-42. doi: 10.1038/386838a0. PMID: 9126743.
- Agaimy A, Erlenbach-Wünsch K, Konukiewicz B, Schmitt AM, Rieker RJ, Vieth M, Kieseewetter F, Hartmann A, Zamboni G, Perren A, Klöppel G. ISL1 expression is not restricted to pancreatic well-differentiated neuroendocrine neoplasms, but is also commonly found in well and poorly differentiated neuroendocrine neoplasms of extrapancreatic origin. *Mod Pathol*. 2013 Jul;26(7):995-1003. doi: 10.1038/modpathol.2013.40. Epub 2013 Mar 15. PMID: 23503646.
- Ahlgren U, Pfaff SL, Jessell TM, Edlund T, Edlund H. Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature*. 1997 Jan 16;385(6613):257-60. doi: 10.1038/385257a0. PMID: 9000074.
- Akhir MKAM, Choy CS, Abdullah MA, Ghani FA, Veerakumarasivam A, Hussin H. The Role of ISL1 and LHX5 LIM Homeobox Genes in Bladder Tumorigenesis. *Malays J Med Sci*. 2020 Feb;27(1):37-45. doi: 10.21315/mjms2020.27.1.4. Epub 2020 Feb 27. PMID: 32158343; PMCID: PMC7053544.
- Alshaikh OM, Yoon JY, Chan BA, Krzyzanowska MK, Butany J, Asa SL, Ezzat S. Pancreatic Neuroendocrine Tumor Producing Insulin and Vasopressin. *Endocr Pathol*. 2018 Mar;29(1):15-20. doi: 10.1007/s12022-017-9492-5. PMID: 28718084.
- Aota S, Nakajima N, Sakamoto R, Watanabe S, Ibaraki N, Okazaki K. Pax6 autoregulation mediated by direct interaction of Pax6 protein with the head surface ectoderm-specific enhancer of the mouse Pax6 gene. *Dev Biol*. 2003 May 1;257(1):1-13. doi: 10.1016/s0012-1606(03)00058-7. PMID: 12710953.
- Arnason T, Sapp HL, Barnes PJ, Drewniak M, Abdolell M, Rayson D. Immunohistochemical expression and prognostic value of ER, PR and HER2/neu in pancreatic and small intestinal neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology*. 2011;93(4):249-58. doi: 10.1159/000326820. Epub 2011 Apr 10. PMID: 21487213.
- Asa SL, Lloyd RV, Tischler AS (2021) Neuroendocrine neoplasms: Historical background and terminologies. In: *The Spectrum of Neuroendocrine Neoplasia*. Asa SL, La Rosa S, Mete O (Hrsg.) Springer Nature, Cham, Switzerland, 1–14.
- Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, Matsushima S, Watanabe T, Kohsaka S, Kida Y, Shiraishi T, Ogura T, Shimamura K, Nakafuku M. The Pax6 isoform bearing an alternative spliced exon promotes the development of the neural retinal structure. *Hum Mol Genet*. 2005 Mar 15;14(6):735-45. doi: 10.1093/hmg/ddi069. Epub 2005 Jan 27. PMID: 15677484.
- Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme

glutamic acid decarboxylase. *Nature*. 1990 Sep 13;347(6289):151-6. doi: 10.1038/347151a0. Erratum in: *Nature* 1990 Oct 25;347(6295):782. Camilli, PD [corrected to De Camilli, P]. PMID: 1697648.

Baltimore D. Gene conversion: some implications for immunoglobulin genes. *Cell*. 1981 Jun;24(3):592-4. doi: 10.1016/0092-8674(81)90082-9. PMID: 7018693.

Barr FG. Chromosomal translocations involving paired box transcription factors in human cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997 Dec;29(12):1449-61. doi: 10.1016/s1357-2725(97)00095-2. PMID: 9570138.

Barzelay A, Ben-Shoshan J, Entin-Meer M, Maysel-Auslender S, Afek A, Barshack I, Keren G, George J. A potential role for islet-1 in post-natal angiogenesis and vasculogenesis. *Thromb Haemost*. 2010 Jan;103(1):188-97. doi: 10.1160/TH09-07-0433. Epub 2009 Oct 26. PMID: 20062933.

Becker RS, Knight KL. Somatic diversification of immunoglobulin heavy chain VDJ genes: evidence for somatic gene conversion in rabbits. *Cell*. 1990 Nov 30;63(5):987-97. doi: 10.1016/0092-8674(90)90502-6. PMID: 2124176.

Bellizzi AM. Assigning site of origin in metastatic neuroendocrine neoplasms: a clinically significant application of diagnostic immunohistochemistry. *Adv Anat Pathol*. 2013 Sep;20(5):285-314. doi: 10.1097/PAP.0b013e3182a2dc67. PMID: 23939147.

Bellizzi AM. Immunohistochemistry in the diagnosis and classification of neuroendocrine neoplasms: what can brown do for you? *Hum Pathol*. 2020 Feb;96:8-33. doi: 10.1016/j.humpath.2019.12.002. Epub 2019 Dec 17. PMID: 31857137; PMCID: PMC7177196.

Berkhout M, Nagtegaal ID, Cornelissen SJ, Dekkers MM, van de Molengraft FJ, Peters WH, Nagengast FM, van Krieken JH, Jeuken JW. Chromosomal and methylation alterations in sporadic and familial adenomatous polyposis-related duodenal carcinomas. *Mod Pathol*. 2007 Dec;20(12):1253-62. doi: 10.1038/modpathol.3800952. Epub 2007 Sep 14. PMID: 17873900.

Bhatia S, Bengani H, Fish M, Brown A, Divizia MT, de Marco R, Damante G, Grainger R, van Heyningen V, Kleinjan DA. Disruption of autoregulatory feedback by a mutation in a remote, ultraconserved PAX6 enhancer causes aniridia. *Am J Hum Genet*. 2013 Dec 5;93(6):1126-34. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.10.028. Epub 2013 Nov 27. PMID: 24290376; PMCID: PMC3852925.

Briskin C, Park S, Vass T, Lydon JP, O'Malley BW, Weinberg RA. A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 28;95(9):5076-81. doi: 10.1073/pnas.95.9.5076. PMID: 9560231; PMCID: PMC20216.

Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, Caron L, Zhu S, Shao Y, Roberts DJ, Huang PL, Domian IJ, Chien KR. Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature*. 2009 Jul 2;460(7251):113-7. doi: 10.1038/nature08191. PMID: 19571884.

Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol*. 2001 Sep;195(1):72-9. doi: 10.1002/path.893. PMID: 11568893.

Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*. 2000 Dec;80(12):1943-9. doi: 10.1038/labinvest.3780204. PMID: 11140706.

Carić D, Gooday D, Hill RE, McConnell SK, Price DJ. Determination of the migratory capacity of embryonic cortical cells lacking the transcription factor Pax-6. *Development*. 1997 Dec;124(24):5087-96. doi: 10.1242/dev.124.24.5087. PMID: 9362466.

Cheung WC, Beausoleil SA, Zhang X, Sato S, Schieferl SM, Wieler JS, Beaudet JG, Ramenani RK, Popova L, Comb MJ, Rush J, Polakiewicz RD. A proteomics approach for the identification and cloning of monoclonal antibodies from serum. *Nat Biotechnol.* 2012 Mar 25;30(5):447-52. doi: 10.1038/nbt.2167. PMID: 22446692.

Cinar HN, Chisholm AD. Genetic analysis of the *Caenorhabditis elegans* pax-6 locus: roles of paired domain-containing and nonpaired domain-containing isoforms. *Genetics.* 2004 Nov;168(3):1307-22. doi: 10.1534/genetics.104.031724. PMID: 15579687; PMCID: PMC1448762.

Cloyd JM, Poultides GA. Non-functional neuroendocrine tumors of the pancreas: Advances in diagnosis and management. *World J Gastroenterol.* 2015 Aug 28;21(32):9512-25. doi: 10.3748/wjg.v21.i32.9512. PMID: 26327759; PMCID: PMC4548112.

Czapiewski P, Gorczynski A, Radecka K, Wiewiora C, Haybaeck J, Adam P, Fend F, Zakrzewska M, Zakrzewski K, Liberski PP, Biernat W. Expression of SOX11, PAX5, TTF-1 and ISL-1 in medulloblastoma. *Pathol Res Pract.* 2016 Nov;212(11):965-971. doi: 10.1016/j.prp.2016.08.006. Epub 2016 Aug 11. PMID: 27623204.

Czerny T, Busslinger M. DNA-binding and transactivation properties of Pax-6: three amino acids in the paired domain are responsible for the different sequence recognition of Pax-6 and BSAP (Pax-5). *Mol Cell Biol.* 1995 May;15(5):2858-71. doi: 10.1128/MCB.15.5.2858. PMID: 7739566; PMCID: PMC230517.

D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant *reeler*. *Nature.* 1995 Apr 20;374(6524):719-23. doi: 10.1038/374719a0. PMID: 7715726.

Dahl E, Koseki H, Balling R. Pax genes and organogenesis. *Bioessays.* 1997 Sep;19(9):755-65. doi: 10.1002/bies.950190905. PMID: 9297966.

Davis A, Cowell JK. Mutations in the PAX6 gene in patients with hereditary aniridia. *Hum Mol Genet.* 1993 Dec;2(12):2093-7. doi: 10.1093/hmg/2.12.2093. PMID: 8111379.

Davis N, Yoffe C, Raviv S, Antes R, Berger J, Holzmans S, Stoykova A, Overbeek PA, Tamm ER, Ashery-Padan R. Pax6 dosage requirements in iris and ciliary body differentiation. *Dev Biol.* 2009 Sep 1;333(1):132-42. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.06.023. Epub 2009 Jun 27. PMID: 19563798.

Davis-Silberman N, Kalich T, Oron-Karni V, Marquardt T, Kroeber M, Tamm ER, Ashery-Padan R. Genetic dissection of Pax6 dosage requirements in the developing mouse eye. *Hum Mol Genet.* 2005 Aug 1;14(15):2265-76. doi: 10.1093/hmg/ddi231. Epub 2005 Jun 29. PMID: 15987699.

Deng X, Pei D. Ornithine decarboxylase and glutamate decarboxylase 65 as prognostic markers of gallbladder malignancy: a clinicopathological study in benign and malignant lesions of the gallbladder. *Mol Med Rep.* 2013 Feb;7(2):413-8. doi: 10.3892/mmr.2012.1178. Epub 2012 Nov 12. PMID: 23152127.

Dias AR, Azevedo BC, Alban LBV, Yagi OK, Ramos MFKP, Jacob CE, Barchi LC, Ceconello I, Ribeiro U Jr, Zilberstein B. GASTRIC NEUROENDOCRINE TUMOR: REVIEW AND UPDATE. *Arq Bras Cir Dig.* 2017 Apr-Jun;30(2):150-154. doi: 10.1590/0102-6720201700020016. PMID: 29257854; PMCID: PMC5543797.

Dimanlig PV, Faber SC, Auerbach W, Makarenkova HP, Lang RA. The upstream ectoderm enhancer in Pax6 has an important role in lens induction. *Development.* 2001 Nov;128(22):4415-24. doi: 10.1242/dev.128.22.4415. PMID: 11714668.

Dominguez M, Ferres-Marco D, Gutierrez-Aviño FJ, Speicher SA, Beneyto M. Growth and specification of the eye are controlled independently by Eyegone and Eyeless in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet.* 2004 Jan;36(1):31-9. doi: 10.1038/ng1281. Epub 2003 Dec 14. PMID: 14702038.

Du A, Hunter CS, Murray J, Noble D, Cai CL, Evans SM, Stein R, May CL. Islet-1 is required for the maturation, proliferation, and survival of the endocrine pancreas. *Diabetes*. 2009 Sep;58(9):2059-69. doi: 10.2337/db08-0987. Epub 2009 Jun 5. PMID: 19502415; PMCID: PMC2731519.

Du Z, Lovly CM. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer*. 2018 Feb 19;17(1):58. doi: 10.1186/s12943-018-0782-4. PMID: 29455648; PMCID: PMC5817791.

Duncan MK, Kozmik Z, Cveklova K, Piatigorsky J, Cvekl A. Overexpression of PAX6(5a) in lens fiber cells results in cataract and upregulation of (alpha)5(beta)1 integrin expression. *J Cell Sci*. 2000 Sep;113 (Pt 18):3173-85. doi: 10.1242/jcs.113.18.3173. PMID: 10954416.

Ellison-Wright Z, Heyman I, Frampton I, Rubia K, Chitnis X, Ellison-Wright I, Williams SC, Suckling J, Simmons A, Bullmore E. Heterozygous PAX6 mutation, adult brain structure and fronto-striato-thalamic function in a human family. *Eur J Neurosci*. 2004 Mar;19(6):1505-12. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03236.x. PMID: 15066147.

Elshatory Y, Everhart D, Deng M, Xie X, Barlow RB, Gan L. Islet-1 controls the differentiation of retinal bipolar and cholinergic amacrine cells. *J Neurosci*. 2007 Nov 14;27(46):12707-20. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3951-07.2007. PMID: 18003851; PMCID: PMC2972590.

Elvenes J, Thomassen EI, Johnsen SS, Kaino K, Sjøttem E, Johansen T. Pax6 represses androgen receptor-mediated transactivation by inhibiting recruitment of the coactivator SPBP. *PLoS One*. 2011;6(9):e24659. doi: 10.1371/journal.pone.0024659. Epub 2011 Sep 15. PMID: 21935435; PMCID: PMC3174178.

Engelkamp D, Rashbass P, Seawright A, van Heyningen V. Role of Pax6 in development of the cerebellar system. *Development*. 1999 Aug;126(16):3585-96. doi: 10.1242/dev.126.16.3585. PMID: 10409504.

Enwright JF 3rd, Grainger RM. Altered retinoid signaling in the heads of small eye mouse embryos. *Dev Biol*. 2000 May 1;221(1):10-22. doi: 10.1006/dbio.2000.9652. PMID: 10772788.

Epstein JA, Glaser T, Cai J, Jepeal L, Walton DS, Maas RL. Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes Dev*. 1994 Sep 1;8(17):2022-34. doi: 10.1101/gad.8.17.2022. PMID: 7958875.

Ericson J, Rashbass P, Schedl A, Brenner-Morton S, Kawakami A, van Heyningen V, Jessell TM, Briscoe J. Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell*. 1997 Jul 11;90(1):169-80. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80323-2. PMID: 9230312.

Erlander MG, Tillakaratne NJ, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron*. 1991 Jul;7(1):91-100. doi: 10.1016/0896-6273(91)90077-d. PMID: 2069816.

Estrella JS, Broaddus RR, Mathews A, Milton DR, Yao JC, Wang H, Rashid A. Progesterone receptor and PTEN expression predict survival in patients with low- and intermediate-grade pancreatic neuroendocrine tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 Aug;138(8):1027-36. doi: 10.5858/arpa.2013-0195-OA. PMID: 25076292.

Ettinger DS, Agulnik M, Cates JM, Cristea M, Denlinger CS, Eaton KD, Fidias PM, Gierada D, Gockerman JP, Handorf CR, Iyer R, Lenzi R, Phay J, Rashid A, Saltz L, Shulman LN, Smerage JB, Varadhachary GR, Zager JS, Zhen WK; National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines Occult primary. *J Natl Compr Canc Netw*. 2011 Dec;9(12):1358-95. doi: 10.6004/jnccn.2011.0117. PMID: 22157556.

Faber SC, Robinson ML, Makarenkova HP, Lang RA. Bmp signaling is required for development of primary lens fiber cells. *Development*. 2002 Aug;129(15):3727-37. doi: 10.1242/dev.129.15.3727. PMID: 12117821.

Falconi M, Eriksson B, Kaltsas G, Bartsch DK, Capdevila J, Caplin M, Kos-Kudla B, Kwekkeboom D, Rindi G, Klöppel G, Reed N, Kianmanesh R, Jensen RT; Vienna Consensus Conference participants. ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Patients with Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors and Non-Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology*. 2016;103(2):153-71. doi: 10.1159/000443171. Epub 2016 Jan 5. PMID: 26742109; PMCID: PMC4849884.

Farheen S, Ahmed SP, Mariyath P M M, Kausar T, Hoda MF, Arif SH, Nayeem SM, Ali A, Chosdol K, Shahi MH. Differential role of Pax6 and its interaction with Shh-Gli1-IDH2 axis in regulation of glioma growth and chemoresistance. *J Biochem Mol Toxicol*. 2023 Feb;37(2):e23241. doi: 10.1002/jbt.23241. Epub 2022 Oct 7. PMID: 36205257.

Fischbach BV, Trout KL, Lewis J, Luis CA, Sika M. WAGR syndrome: a clinical review of 54 cases. *Pediatrics*. 2005 Oct;116(4):984-8. doi: 10.1542/peds.2004-0467. PMID: 16199712.

Glaser T, Jepeal L, Edwards JG, Young SR, Favor J, Maas RL. PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nat Genet*. 1994 Aug;7(4):463-71. doi: 10.1038/ng0894-463. Erratum in: *Nat Genet* 1994 Oct;8(2):203. PMID: 7951315.

Glaser T, Walton DS, Maas RL. Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene. *Nat Genet*. 1992 Nov;2(3):232-9. doi: 10.1038/ng1192-232. PMID: 1345175.

Goldowitz D, Hamre KM, Przyborski SA, Ackerman SL. Granule cells and cerebellar boundaries: analysis of Unc5h3 mutant chimeras. *J Neurosci*. 2000 Jun 1;20(11):4129-37. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-11-04129.2000. PMID: 10818148; PMCID: PMC6772639.

Gosmain Y, Avril I, Mamin A, Philippe J. Pax-6 and c-Maf functionally interact with the alpha-cell-specific DNA element G1 in vivo to promote glucagon gene expression. *J Biol Chem*. 2007 Nov 30;282(48):35024-34. doi: 10.1074/jbc.M702795200. Epub 2007 Sep 27. PMID: 17901057.

Gosmain Y, Cheyssac C, Heddad Masson M, Dibner C, Philippe J. Glucagon gene expression in the endocrine pancreas: the role of the transcription factor Pax6 in α -cell differentiation, glucagon biosynthesis and secretion. *Diabetes Obes Metab*. 2011 Oct;13 Suppl 1:31-8. doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01445.x. PMID: 21824254.

Graham RP, Shrestha B, Caron BL, Smyrk TC, Grogg KL, Lloyd RV, Zhang L. Islet-1 is a sensitive but not entirely specific marker for pancreatic neuroendocrine neoplasms and their metastases. *Am J Surg Pathol*. 2013 Mar;37(3):399-405. doi: 10.1097/PAS.0b013e31826f042c. PMID: 23348208.

Grindley JC, Davidson DR, Hill RE. The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development*. 1995 May;121(5):1433-42. doi: 10.1242/dev.121.5.1433. PMID: 7789273.

Grønskov K, Rosenberg T, Sand A, Brøndum-Nielsen K. Mutational analysis of PAX6: 16 novel mutations including 5 missense mutations with a mild aniridia phenotype. *Eur J Hum Genet*. 1999 Apr;7(3):274-86. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200308. PMID: 10234503.

GTEx Consortium. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet*. 2013 Jun;45(6):580-5. doi: 10.1038/ng.2653. PMID: 23715323; PMCID: PMC4010069.

Guo C, Wang W, Shi Q, Chen P, Zhou C. An abnormally high expression of ISL-1 represents a potential prognostic factor in gastric cancer. *Hum Pathol*. 2015 Sep;46(9):1282-9. doi: 10.1016/j.humpath.2015.05.006. Epub 2015 May 27. PMID: 26142548.

Hackeng WM, Brosens LAA, Kim JY, O'Sullivan R, Sung YN, Liu TC, Cao D, Heayn M, Brosnan-Cashman J, An S, Morsink FHM, Heidsma CM, Valk GD, Vriens MR, Nieveen van Dijkum E, Offerhaus GJA, Dreijerink KMA, Zeh H, Zureikat AH, Hogg M, Lee K, Geller D, Marsh JW, Panizza A, Ongchin M, Pingpank JF, Bahary N, Aijazi

M, Brand R, Chennat J, Das R, Fasanella KE, Khalid A, McGrath K, Sarkaria S, Singh H, Slivka A, Nalesnik M, Han X, Nikiforova MN, Lawlor RT, Mafficini A, Rusev B, Corbo V, Luchini C, Bersani S, Pea A, Cingarlini S, Landoni L, Salvia R, Milione M, Milella M, Scarpa A, Hong SM, Heaphy CM, Singhi AD. Non-functional pancreatic neuroendocrine tumours: ATRX/DAXX and alternative lengthening of telomeres (ALT) are prognostically independent from ARX/PDX1 expression and tumour size. *Gut*. 2022 May;71(5):961-973. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322595. Epub 2021 Apr 13. PMID: 33849943; PMCID: PMC8511349.

Halder G, Callaerts P, Gehring WJ. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science*. 1995 Mar 24;267(5205):1788-92. doi: 10.1126/science.7892602. PMID: 7892602.

Han JC, Liu QR, Jones M, Levinn RL, Menzie CM, Jefferson-George KS, Adler-Wailes DC, Sanford EL, Lacbawan FL, Uhl GR, Rennert OM, Yanovski JA. Brain-derived neurotrophic factor and obesity in the WAGR syndrome. *N Engl J Med*. 2008 Aug 28;359(9):918-27. doi: 10.1056/NEJMoa0801119. Erratum in: *N Engl J Med*. 2008 Sep 25;359(13):1414. PMID: 18753648; PMCID: PMC2553704.

Hansel DE, Rahman A, Hidalgo M, Thuluvath PJ, Lillemoe KD, Schulick R, Ku JL, Park JG, Miyazaki K, Ashfaq R, Wistuba II, Varma R, Hawthorne L, Geradts J, Argani P, Maitra A. Identification of novel cellular targets in biliary tract cancers using global gene expression technology. *Am J Pathol*. 2003 Jul;163(1):217-29. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63645-0. Erratum in: *Am J Pathol*. 2017 Apr;187(4):936. PMID: 12819026; PMCID: PMC1868162.

Hanson IM, Seawright A, Hardman K, Hodgson S, Zaletayev D, Fekete G, van Heyningen V. PAX6 mutations in aniridia. *Hum Mol Genet*. 1993 Jul;2(7):915-20. doi: 10.1093/hmg/2.7.915. PMID: 8364574.

Hantschke M, Palmedo G (2015) Immunhistologische Techniken. In: *Histopathologie der Haut*. Cerroni, L., Garbe, C., Metze, D., Kutzner, H., Kerl, H. (Hrsg.) Springer Reference Medizin. Springer, Berlin, Heidelberg, 1-28.

Hattori Y, Kanamoto N, Kawano K, Iwakura H, Sone M, Miura M, Yasoda A, Tamura N, Arai H, Akamizu T, Nakao K, Maitani Y. Molecular characterization of tumors from a transgenic mouse adrenal tumor model: comparison with human pheochromocytoma. *Int J Oncol*. 2010 Sep;37(3):695-705. doi: 10.3892/ijo_00000719. PMID: 20664939.

Hegge B, Sjøttem E, Mikkola I. Generation of a PAX6 knockout glioblastoma cell line with changes in cell cycle distribution and sensitivity to oxidative stress. *BMC Cancer*. 2018 May 2;18(1):496. doi: 10.1186/s12885-018-4394-6. PMID: 29716531; PMCID: PMC5930953.

Helander KG. Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. *Biotech Histochem*. 1994 May;69(3):177-9. doi: 10.3109/10520299409106282. PMID: 8068812.

Heller RS, Jenny M, Collombat P, Mansouri A, Tomasetto C, Madsen OD, Mellitzer G, Gradwohl G, Serup P. Genetic determinants of pancreatic epsilon-cell development. *Dev Biol*. 2005 Oct 1;286(1):217-24. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.06.041. PMID: 16122727.

Hermann G, Konukiewitz B, Schmitt A, Perren A, Klöppel G. Hormonally defined pancreatic and duodenal neuroendocrine tumors differ in their transcription factor signatures: expression of ISL1, PDX1, NGN3, and CDX2. *Virchows Arch*. 2011 Aug;459(2):147-54. doi: 10.1007/s00428-011-1118-6. Epub 2011 Jul 8. PMID: 21739268.

Hill RE, Favor J, Hogan BL, Ton CC, Saunders GF, Hanson IM, Prosser J, Jordan T, Hastie ND, van Heyningen V. Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature*. 1991 Dec 19;354(6354):522-5. doi: 10.1038/354522a0. Erratum in: *Nature*. 1992 Feb 20;355(6362):750. PMID: 1684639.

Hirota Y, Nakajima K. Control of Neuronal Migration and Aggregation by Reelin Signaling in the Developing Cerebral Cortex. *Front Cell Dev Biol.* 2017 Apr 26;5:40. doi: 10.3389/fcell.2017.00040. PMID: 28507985; PMCID: PMC5410752.

Hooker L, Smoczer C, KhosrowShahian F, Wolanski M, Crawford MJ. Microarray-based identification of Pitx3 targets during *Xenopus* embryogenesis. *Dev Dyn.* 2012 Sep;241(9):1487-505. doi: 10.1002/dvdy.23836. Epub 2012 Aug 9. PMID: 22826267.

Howe JR, Cardona K, Fraker DL, Kebebew E, Untch BR, Wang YZ, Law CH, Liu EH, Kim MK, Menda Y, Morse BG, Bergsland EK, Strosberg JR, Nakakura EK, Pommier RF. The Surgical Management of Small Bowel Neuroendocrine Tumors: Consensus Guidelines of the North American Neuroendocrine Tumor Society. *Pancreas.* 2017 Jul;46(6):715-731. doi: 10.1097/MPA.0000000000000846. PMID: 28609357; PMCID: PMC5502737.

<https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>, aufgerufen am 10.08.2023.

https://www.proteinatlas.org/about/assays+annotation#normalization_rna; aufgerufen am 26.10.23.

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007372-PAX6/pathology>, aufgerufen am 26.10.2023.

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007372-PAX6/single+cell+type>, aufgerufen am 26.10.2023.

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007372-PAX6/summary/rna>; aufgerufen am 23.10.23.

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007372-PAX6/tissue>, aufgerufen am 26.10.2023.

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000016082-ISL1/pathology>, aufgerufen am 26.10.2023.

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000016082-ISL1/single+cell+type>, aufgerufen am 26.10.2023.

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000016082-ISL1/tissue>, aufgerufen am 26.10.2023.

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000082175-PGR/single+cell+type>, aufgerufen am 26.10.2023.

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000082175-PGR/tissue>, aufgerufen am 26.10.2023.

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000136750-GAD2/single+cell+type>, aufgerufen am 26.10.2023.

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000136750-GAD2/summary/rna>, aufgerufen am 26.10.2023.

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000136750-GAD2/tissue>, aufgerufen am 26.10.2023.

Huang J, Rajagopal R, Liu Y, Dattilo LK, Shaham O, Ashery-Padan R, Beebe DC. The mechanism of lens placode formation: a case of matrix-mediated morphogenesis. *Dev Biol.* 2011 Jul 1;355(1):32-42. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.04.008. Epub 2011 Apr 21. PMID: 21540023; PMCID: PMC3104088.

Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:299-311. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_26. PMID: 30539454; PMCID: PMC6918834.

Inoue M, Kamachi Y, Matsunami H, Imada K, Uchikawa M, Kondoh H. PAX6 and SOX2-dependent regulation of the Sox2 enhancer N-3 involved in embryonic visual system development. *Genes Cells.* 2007 Sep;12(9):1049-61. doi: 10.1111/j.1365-2443.2007.01114.x. PMID: 17825048.

Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, Schnitt SJ. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Aug 7;88(15):1054-9. doi: 10.1093/jnci/88.15.1054. PMID: 8683636.

Jain D, Salunke DM. Antibody specificity and promiscuity. *Biochem J*. 2019 Feb 5;476(3):433-447. doi: 10.1042/BCJ20180670. PMID: 30723137.

Jawhar NM. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Ann Saudi Med*. 2009 Mar-Apr;29(2):123-7. doi: 10.4103/0256-4947.51806. PMID: 19318744; PMCID: PMC2813639.

Jaworski C, Sperbeck S, Graham C, Wistow G. Alternative splicing of Pax6 in bovine eye and evolutionary conservation of intron sequences. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Nov 7;240(1):196-202. doi: 10.1006/bbrc.1997.7623. PMID: 9367909.

Johnson A, Wright JP, Zhao Z, Komaya T, Parikh A, Merchant N, Shi C. Cadherin 17 is frequently expressed by 'sclerosing variant' pancreatic neuroendocrine tumour. *Histopathology*. 2015 Jan;66(2):225-33. doi: 10.1111/his.12535. Epub 2014 Oct 28. PMID: 25307987; PMCID: PMC4302003.

Juhlin CC, Zedenius J, Höög A. Clinical Routine Application of the Second-generation Neuroendocrine Markers ISL1, INSM1, and Secretagoin in Neuroendocrine Neoplasia: Staining Outcomes and Potential Clues for Determining Tumor Origin. *Endocr Pathol*. 2020 Dec;31(4):401-410. doi: 10.1007/s12022-020-09645-y. Epub 2020 Aug 19. PMID: 32813226; PMCID: PMC7665972.

Jun S, Desplan C. Cooperative interactions between paired domain and homeodomain. *Development*. 1996 Sep;122(9):2639-50. doi: 10.1242/dev.122.9.2639. PMID: 8787739.

Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*. 2001 Apr;10(7):657-62. doi: 10.1093/hmg/10.7.657. PMID: 11257096.

Kammandel B, Chowdhury K, Stoykova A, Aparicio S, Brenner S, Gruss P. Distinct cis-essential modules direct the time-space pattern of the Pax6 gene activity. *Dev Biol*. 1999 Jan 1;205(1):79-97. doi: 10.1006/dbio.1998.9128. PMID: 9882499.

Kamp K, Feelders RA, van Adrichem RC, de Rijke YB, van Nederveen FH, Kwekkeboom DJ, de Herder WW. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) secretion by gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs): clinical features, diagnosis, management, and follow-up. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Sep;99(9):3060-9. doi: 10.1210/jc.2014-1315. Epub 2014 Jun 6. PMID: 24905065.

Kapur J, Joshi S. Progesterone modulates neuronal excitability bidirectionally. *Neurosci Lett*. 2021 Jan 23;744:135619. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135619. Epub 2021 Jan 6. PMID: 33421486; PMCID: PMC7821816.

Katz LS, Gosmain Y, Marthinet E, Philippe J. Pax6 regulates the proglucagon processing enzyme PC2 and its chaperone 7B2. *Mol Cell Biol*. 2009 Apr;29(8):2322-34. doi: 10.1128/MCB.01543-08. Epub 2009 Feb 17. PMID: 19223471; PMCID: PMC2663301.

Khosrowshahian F, Wolanski M, Chang WY, Fujiki K, Jacobs L, Crawford MJ. Lens and retina formation require expression of Pitx3 in *Xenopus* pre-lens ectoderm. *Dev Dyn*. 2005 Nov;234(3):577-89. doi: 10.1002/dvdy.20540. PMID: 16170783.

Kim J, Lauderdale JD. Analysis of Pax6 expression using a BAC transgene reveals the presence of a paired-less isoform of Pax6 in the eye and olfactory bulb. *Dev Biol*. 2006 Apr 15;292(2):486-505. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.12.041. Epub 2006 Feb 7. PMID: 16464444.

Kim S, Davis M, Sinn E, Patten P, Hood L. Antibody diversity: somatic hypermutation of rearranged VH genes. *Cell*. 1981 Dec;27(3 Pt 2):573-81. doi: 10.1016/0092-8674(81)90399-8. PMID: 6101208.

Kim SJ, An S, Lee JH, Kim JY, Song KB, Hwang DW, Kim SC, Yu E, Hong SM. Loss of Progesterone Receptor Expression Is an Early Tumorigenesis Event Associated with Tumor Progression and Shorter Survival in

Pancreatic Neuroendocrine Tumor Patients. *J Pathol Transl Med*. 2017 Jul;51(4):388-395. doi: 10.4132/jptm.2017.03.19. Epub 2017 Jun 8. PMID: 28597868; PMCID: PMC5525038.

Kiselev Y, Andersen S, Johannessen C, Fjukstad B, Standahl Olsen K, Stenvold H, Al-Saad S, Donnem T, Richardsen E, Bremnes RM, Rasmussen Busund LT. Transcription factor PAX6 as a novel prognostic factor and putative tumour suppressor in non-small cell lung cancer. *Sci Rep*. 2018 Mar 22;8(1):5059. doi: 10.1038/s41598-018-23417-z. PMID: 29568088; PMCID: PMC5864921.

Kleinjan DA, Seawright A, Childs AJ, van Heyningen V. Conserved elements in Pax6 intron 7 involved in (auto)regulation and alternative transcription. *Dev Biol*. 2004 Jan 15;265(2):462-77. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.09.011. PMID: 14732405.

Kleinjan DA, Seawright A, Schedl A, Quinlan RA, Danes S, van Heyningen V. Aniridia-associated translocations, DNase hypersensitivity, sequence comparison and transgenic analysis redefine the functional domain of PAX6. *Hum Mol Genet*. 2001 Sep 15;10(19):2049-59. doi: 10.1093/hmg/10.19.2049. PMID: 11590122.

Kleinrok Z, Matuszek M, Jesipowicz J, Matuszek B, Opolski A, Radzikowski C. GABA content and GAD activity in colon tumors taken from patients with colon cancer or from xenografted human colon cancer cells growing as s.c. tumors in athymic nu/nu mice. *J Physiol Pharmacol*. 1998 Jun;49(2):303-10. PMID: 9670113.

Klimstra DS. Pathologic Classification of Neuroendocrine Neoplasms. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2016 Feb;30(1):1-19. doi: 10.1016/j.hoc.2015.08.005. Epub 2015 Oct 24. PMID: 26614366.

Klöppel G. Neuroendocrine Neoplasms: Dichotomy, Origin and Classifications. *Visc Med*. 2017 Oct;33(5):324-330. doi: 10.1159/000481390. Epub 2017 Oct 16. PMID: 29177160; PMCID: PMC5697503.

Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 Aug 7;256(5517):495-7. doi: 10.1038/256495a0. PMID: 1172191.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärnlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998 Jul;4(7):844-7. doi: 10.1038/nm0798-844. PMID: 9662379.

Konukiewitz B, Jesinghaus M, Kasajima A, Klöppel G. Neuroendocrine neoplasms of the pancreas: diagnosis and pitfalls. *Virchows Arch*. 2022 Feb;480(2):247-257. doi: 10.1007/s00428-021-03211-5. Epub 2021 Oct 13. PMID: 34647171; PMCID: PMC8986719.

Koo J, Mertens RB, Mirocha JM, Wang HL, Dhall D. Value of Islet 1 and PAX8 in identifying metastatic neuroendocrine tumors of pancreatic origin. *Mod Pathol*. 2012 Jun;25(6):893-901. doi: 10.1038/modpathol.2012.34. Epub 2012 Mar 2. PMID: 22388755.

Koo J, Zhou X, Moschiano E, De Peralta-Venturina M, Mertens RB, Dhall D. The immunohistochemical expression of islet 1 and PAX8 by rectal neuroendocrine tumors should be taken into account in the differential diagnosis of metastatic neuroendocrine tumors of unknown primary origin. *Endocr Pathol*. 2013 Dec;24(4):184-90. doi: 10.1007/s12022-013-9264-9. PMID: 24037217.

Koo M, Squires JM, Ying D, Huang J. Making a Tissue Microarray. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:313-323. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_27. PMID: 30539455.

Kozmik Z, Czerny T, Busslinger M. Alternatively spliced insertions in the paired domain restrict the DNA sequence specificity of Pax6 and Pax8. *EMBO J*. 1997 Nov 17;16(22):6793-803. doi: 10.1093/emboj/16.22.6793. PMID: 9362493; PMCID: PMC1170283.

Kozmik Z, Sure U, Rüedi D, Busslinger M, Aguzzi A. Deregulated expression of PAX5 in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 6;92(12):5709-13. doi: 10.1073/pnas.92.12.5709. PMID: 7777574; PMCID: PMC41766.

Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet*. 2010;70:27-56. doi: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2. PMID: 20920744.

Kunz PL, Reidy-Lagunes D, Anthony LB, Bertino EM, Brendtro K, Chan JA, Chen H, Jensen RT, Kim MK, Klimstra DS, Kulke MH, Liu EH, Metz DC, Phan AT, Sippel RS, Strosberg JR, Yao JC; North American Neuroendocrine Tumor Society. Consensus guidelines for the management and treatment of neuroendocrine tumors. *Pancreas*. 2013 May;42(4):557-77. doi: 10.1097/MPA.0b013e31828e34a4. PMID: 23591432; PMCID: PMC4304762.

Laakso M. Not for the eyes only: PAX6 and glucose metabolism. *Diabetologia*. 2009 Mar;52(3):381-4. doi: 10.1007/s00125-008-1251-1. Epub 2009 Jan 8. PMID: 19130035.

Lagali N, Wowra B, Fries FN, Latta L, Moslemani K, Utheim TP, Wylegala E, Seitz B, Käsmann-Kellner B. PAX6 Mutational Status Determines Aniridia-Associated Keratopathy Phenotype. *Ophthalmology*. 2020 Feb;127(2):273-275. doi: 10.1016/j.opthta.2019.09.034. Epub 2019 Sep 28. PMID: 31708273.

Lai JP, Mertens RB, Mirocha J, Koo J, Venturina M, Chung F, Mendez AB, Kahn M, Dhall D. Comparison of PAX6 and PAX8 as immunohistochemical markers for pancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr Pathol*. 2015 Mar;26(1):54-62. doi: 10.1007/s12022-014-9346-3. PMID: 25433656.

Lalitha S, Basu B, Surya S, Meera V, Riya PA, Parvathy S, Das AV, Sivakumar KC, Nelson-Sathi S, James J. Pax6 modulates intra-retinal axon guidance and fasciculation of retinal ganglion cells during retinogenesis. *Sci Rep*. 2020 Sep 30;10(1):16075. doi: 10.1038/s41598-020-72828-4. PMID: 32999322; PMCID: PMC7527980.

Lee H, Fu Z, Koo BH, Sheehan CE, Young GQ, Lin J, Patil DT, Yang Z. The expression of TTF1, CDX2 and ISL1 in 74 poorly differentiated neuroendocrine carcinomas. *Ann Diagn Pathol*. 2018 Dec;37:30-34. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2018.09.005. Epub 2018 Sep 13. PMID: 30236546.

Lee SE, Lee Y, Lee GH. The regulation of glutamic acid decarboxylases in GABA neurotransmission in the brain. *Arch Pharm Res*. 2019 Dec;42(12):1031-1039. doi: 10.1007/s12272-019-01196-z. Epub 2019 Nov 30. PMID: 31786745.

Lennartz M, Benjamin Dünnebier N, Höflmayer D, Dwertmann Rico S, Kind S, Reisch V, Viehweger F, Lutz F, Fraune C, Gorbokov N, Luebke AM, Hube-Magg C, Büschel F, Menz A, Uhlig R, Krech T, Hinsch A, Burandt E, Sauter G, Simon R, Kluth M, Steurer S, Marx AH, Lebok P, Dum D, Minner S, Jacobsen F, Clauditz TS, Bernreuther C. GAD2 Is a Highly Specific Marker for Neuroendocrine Neoplasms of the Pancreas. *Am J Surg Pathol*. 2024 Jan 25. doi: 10.1097/PAS.0000000000002186. Epub ahead of print. PMID: 38271200.

Lim HT, Kim DH, Kim H. PAX6 aniridia syndrome: clinics, genetics, and therapeutics. *Curr Opin Ophthalmol*. 2017 Sep;28(5):436-447. doi: 10.1097/ICU.0000000000000405. PMID: 28598868.

Lima Cunha D, Arno G, Corton M, Moosajee M. The Spectrum of PAX6 Mutations and Genotype-Phenotype Correlations in the Eye. *Genes (Basel)*. 2019 Dec 17;10(12):1050. doi: 10.3390/genes10121050. PMID: 31861090; PMCID: PMC6947179.

Lin F, Liu H. Immunohistochemistry in undifferentiated neoplasm/tumor of uncertain origin. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 Dec;138(12):1583-610. doi: 10.5858/arpa.2014-0061-RA. PMID: 25427040.

- Liu Y, Liang G, Wang H, Liu Z. MicroRNA-129-5p suppresses proliferation, migration and invasion of retinoblastoma cells through PI3K/AKT signaling pathway by targeting PAX6. *Pathol Res Pract*. 2019 Dec;215(12):152641. doi: 10.1016/j.prp.2019.152641. Epub 2019 Oct 4. PMID: 31727502.
- Lizio M, Abugessaisa I, Noguchi S, Kondo A, Hasegawa A, Hon CC, de Hoon M, Severin J, Oki S, Hayashizaki Y, Carninci P, Kasukawa T, Kawaji H. Update of the FANTOM web resource: expansion to provide additional transcriptome atlases. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D752-D758. doi: 10.1093/nar/gky1099. PMID: 30407557; PMCID: PMC6323950.
- Lizio M, Harshbarger J, Shimoji H, Severin J, Kasukawa T, Sahin S, Abugessaisa I, Fukuda S, Hori F, Ishikawa-Kato S, Mungall CJ, Arner E, Baillie JK, Bertin N, Bono H, de Hoon M, Diehl AD, Dimont E, Freeman TC, Fujieda K, Hide W, Kaliyaperumal R, Katayama T, Lassmann T, Meehan TF, Nishikata K, Ono H, Rehli M, Sandelin A, Schultes EA, 't Hoen PA, Tatum Z, Thompson M, Toyoda T, Wright DW, Daub CO, Itoh M, Carninci P, Hayashizaki Y, Forrest AR, Kawaji H; FANTOM consortium. Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas. *Genome Biol*. 2015 Jan 5;16(1):22. doi: 10.1186/s13059-014-0560-6. PMID: 25723102; PMCID: PMC4310165.
- Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA Jr, Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev*. 1995 Sep 15;9(18):2266-78. doi: 10.1101/gad.9.18.2266. PMID: 7557380.
- Machon O, Kreslova J, Ruzickova J, Vacik T, Klimova L, Fujimura N, Lachova J, Kozmik Z. Lens morphogenesis is dependent on Pax6-mediated inhibition of the canonical Wnt/beta-catenin signaling in the lens surface ectoderm. *Genesis*. 2010 Feb;48(2):86-95. doi: 10.1002/dvg.20583. PMID: 20027618.
- Maden M, Blentic A, Reijntjes S, Seguin S, Gale E, Graham A. Retinoic acid is required for specification of the ventral eye field and for Rathke's pouch in the avian embryo. *Int J Dev Biol*. 2007;51(3):191-200. doi: 10.1387/ijdb.062175mm. PMID: 17486539.
- Mark M, Rijli FM, Chambon P. Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatr Res*. 1997 Oct;42(4):421-9. doi: 10.1203/00006450-199710000-00001. PMID: 9380431.
- Mascarenhas JB, Young KP, Littlejohn EL, Yoo BK, Salgia R, Lang D. PAX6 is expressed in pancreatic cancer and actively participates in cancer progression through activation of the MET tyrosine kinase receptor gene. *J Biol Chem*. 2009 Oct 2;284(40):27524-32. doi: 10.1074/jbc.M109.047209. Epub 2009 Aug 3. PMID: 19651775; PMCID: PMC2785681.
- Matuszek M, Jesipowicz M, Kleinrok Z. GABA content and GAD activity in gastric cancer. *Med Sci Monit*. 2001 May-Jun;7(3):377-81. PMID: 11386012.
- Mayes DA, Hu Y, Teng Y, Siegel E, Wu X, Panda K, Tan F, Yung WK, Zhou YH. PAX6 suppresses the invasiveness of glioblastoma cells and the expression of the matrix metalloproteinase-2 gene. *Cancer Res*. 2006 Oct 15;66(20):9809-17. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3877. PMID: 17047041.
- Mengel M, Kreipe H, von Wasielewski R. Rapid and large-scale transition of new tumor biomarkers to clinical biopsy material by innovative tissue microarray systems. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2003 Sep;11(3):261-8. doi: 10.1097/00129039-200309000-00010. PMID: 12966354.
- Mete O, Kefeli M, Çalışkan S, Asa SL. GATA3 immunoreactivity expands the transcription factor profile of pituitary neuroendocrine tumors. *Mod Pathol*. 2019 Apr;32(4):484-489. doi: 10.1038/s41379-018-0167-7. Epub 2018 Nov 2. PMID: 30390035.

Mete O, Wenig BM. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Overview of the 2022 WHO Classification of Head and Neck Neuroendocrine Neoplasms. *Head Neck Pathol.* 2022 Mar;16(1):123-142. doi: 10.1007/s12105-022-01435-8. Epub 2022 Mar 21. PMID: 35312985; PMCID: PMC9018952.

Mirlacher M, Kasper M, Storz M, Knecht Y, Dürmüller U, Simon R, Mihatsch MJ, Sauter G. Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. *Mod Pathol.* 2004 Nov;17(11):1414-20. doi: 10.1038/modpathol.3800208. PMID: 15205686.

Mishra S, Maurya SK, Srivastava K, Shukla S, Mishra R. Pax6 influences expression patterns of genes involved in neuro- degeneration. *Ann Neurosci.* 2015 Oct;22(4):226-31. doi: 10.5214/ans.0972.7531.220407. PMID: 26525840; PMCID: PMC4627194.

Mitchell TN, Free SL, Williamson KA, Stevens JM, Churchill AJ, Hanson IM, Shorvon SD, Moore AT, van Heyningen V, Sisodiya SM. Polymicrogyria and absence of pineal gland due to PAX6 mutation. *Ann Neurol.* 2003 May;53(5):658-63. doi: 10.1002/ana.10576. PMID: 12731001.

Mizuno M, Takabatake T, Takahashi TC, Takeshima K. pax-6 gene expression in newt eye development. *Dev Genes Evol.* 1997 Aug;207(3):167-176. doi: 10.1007/s004270050104. PMID: 27747414.

Moch H, Zimmermann D R, Rohrmann S (2019) Pathologie: Aufgaben und Methoden. In: Lehrbuch Pathologie. Höfler G, Kreipe H, Moch H (Hrsg), 6. Auflage, Elsevier, München, 3-18.

Mohanty SK, Tiwari A, Bhardwaj N, Chuang F, Kim E, Lugo H, Yuan X, Diffalha SA, Peralta-Venturina M, Balzer B, Dhall D. Positivity for SATB2 distinguishes Islet1 positive rectal neuroendocrine tumours from pancreaticoduodenal neuroendocrine tumours. *J Clin Pathol.* 2021 Sep;74(9):582-588. doi: 10.1136/jclinpath-2020-206645. Epub 2020 Sep 15. PMID: 32934105.

Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 2013 Jan;38(1):23-38. doi: 10.1038/npp.2012.112. Epub 2012 Jul 11. PMID: 22781841; PMCID: PMC3521964.

Nishi M, Sasahara M, Shono T, Saika S, Yamamoto Y, Ohkawa K, Furuta H, Nakao T, Sasaki H, Nanjo K. A case of novel de novo paired box gene 6 (PAX6) mutation with early-onset diabetes mellitus and aniridia. *Diabet Med.* 2005 May;22(5):641-4. doi: 10.1111/j.1464-5491.2005.01469.x. PMID: 15842522.

Ohara Y, Oda T, Hashimoto S, Akashi Y, Miyamoto R, Enomoto T, Satomi K, Morishita Y, Ohkohchi N. Pancreatic neuroendocrine tumor and solid-pseudopapillary neoplasm: Key immunohistochemical profiles for differential diagnosis. *World J Gastroenterol.* 2016 Oct 14;22(38):8596-8604. doi: 10.3748/wjg.v22.i38.8596. PMID: 27784972; PMCID: PMC5064041.

Opolski A, Mazurkiewicz M, Wietrzyk J, Kleinrok Z, Radzikowski C. The role of GABA-ergic system in human mammary gland pathology and in growth of transplantable murine mammary cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2000 Sep;19(3):383-90. PMID: 11144533.

Pan L, Deng M, Xie X, Gan L. ISL1 and BRN3B co-regulate the differentiation of murine retinal ganglion cells. *Development.* 2008 Jun;135(11):1981-90. doi: 10.1242/dev.010751. Epub 2008 Apr 23. PMID: 18434421; PMCID: PMC2758274.

Pandit T, Jidigam VK, Gunhaga L. BMP-induced L-Maf regulates subsequent BMP-independent differentiation of primary lens fibre cells. *Dev Dyn.* 2011 Aug;240(8):1917-28. doi: 10.1002/dvdy.22692. PMID: 21761477.

Perren A, Couvelard A, Scoazec JY, Costa F, Borbath I, Delle Fave G, Gorbounova V, Gross D, Grossma A, Jense RT, Kulke M, Oeberg K, Rindi G, Sorbye H, Welin S; Antibes Consensus Conference participants. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Pathology: Diagnosis and

Prognostic Stratification. *Neuroendocrinology*. 2017;105(3):196-200. doi: 10.1159/000457956. Epub 2017 Feb 11. PMID: 28190015.

Pessoa J, Martins M, Casimiro S, Pérez-Plasencia C, Shoshan-Barmatz V. Editorial: Altered Expression of Proteins in Cancer: Function and Potential Therapeutic Targets. *Front Oncol*. 2022 Jun 22;12:949139. doi: 10.3389/fonc.2022.949139. PMID: 35814397; PMCID: PMC9257268.

Pfaff SL, Mendelsohn M, Stewart CL, Edlund T, Jessell TM. Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell*. 1996 Jan 26;84(2):309-20. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80985-x. PMID: 8565076.

Plaza S, Dozier C, Turque N, Saule S. Quail Pax-6 (Pax-QNR) mRNAs are expressed from two promoters used differentially during retina development and neuronal differentiation. *Mol Cell Biol*. 1995 Jun;15(6):3344-53. doi: 10.1128/MCB.15.6.3344. PMID: 7760830; PMCID: PMC230568.

Richardson J, Cvekl A, Wistow G. Pax-6 is essential for lens-specific expression of zeta-crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 May 9;92(10):4676-80. doi: 10.1073/pnas.92.10.4676. PMID: 7753863; PMCID: PMC42007.

Rindi G, Mete O, Uccella S, Basturk O, La Rosa S, Brosens LAA, Ezzat S, de Herder WW, Klimstra DS, Papotti M, Asa SL. Overview of the 2022 WHO Classification of Neuroendocrine Neoplasms. *Endocr Pathol*. 2022 Mar;33(1):115-154. doi: 10.1007/s12022-022-09708-2. Epub 2022 Mar 16. PMID: 35294740.

Rindi G, Wiedenmann B. Neuroendocrine neoplasms of the gut and pancreas: new insights. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Aug 2;8(1):54-64. doi: 10.1038/nrendo.2011.120. Erratum in: *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Feb;8(2):66. PMID: 21808296.

Ritz-Laser B, Estreicher A, Klages N, Saule S, Philippe J. Pax-6 and Cdx-2/3 interact to activate glucagon gene expression on the G1 control element. *J Biol Chem*. 1999 Feb 12;274(7):4124-32. doi: 10.1074/jbc.274.7.4124. PMID: 9933606.

Ro C, Chai W, Yu VE, Yu R. Pancreatic neuroendocrine tumors: biology, diagnosis, and treatment. *Chin J Cancer*. 2013 Jun;32(6):312-24. doi: 10.5732/cjc.012.10295. Epub 2012 Dec 14. PMID: 23237225; PMCID: PMC3845620.

Rønneberg JA, Fleischer T, Solvang HK, Nordgard SH, Edvardsen H, Potapenko I, Nebdal D, Daviaud C, Gut I, Bukholm I, Naume B, Børresen-Dale AL, Tost J, Kristensen V. Methylation profiling with a panel of cancer related genes: association with estrogen receptor, TP53 mutation status and expression subtypes in sporadic breast cancer. *Mol Oncol*. 2011 Feb;5(1):61-76. doi: 10.1016/j.molonc.2010.11.004. Epub 2010 Nov 25. PMID: 21212030; PMCID: PMC5528272.

Sakayori N, Kikkawa T, Osumi N. Reduced proliferation and excess astrogenesis of Pax6 heterozygous neural stem/progenitor cells. *Neurosci Res*. 2012 Oct;74(2):116-21. doi: 10.1016/j.neures.2012.08.004. Epub 2012 Aug 27. PMID: 22944581.

Salaria SN, Shi C. Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Surg Pathol Clin*. 2016 Dec;9(4):595-617. doi: 10.1016/j.path.2016.05.006. Epub 2016 Oct 12. PMID: 27926362.

Sander M, Neubüser A, Kalamaras J, Ee HC, Martin GR, German MS. Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev*. 1997 Jul 1;11(13):1662-73. doi: 10.1101/gad.11.13.1662. PMID: 9224716.

Saper CB. A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *J Histochem Cytochem*. 2009 Jan;57(1):1-5. doi: 10.1369/jhc.2008.952770. Epub 2008 Oct 14. PMID: 18854594; PMCID: PMC2605712.

Saraon P, Pathmanathan S, Snider J, Lyakisheva A, Wong V, Stagljar I. Receptor tyrosine kinases and cancer: oncogenic mechanisms and therapeutic approaches. *Oncogene*. 2021 Jun;40(24):4079-4093. doi: 10.1038/s41388-021-01841-2. Epub 2021 Jun 2. PMID: 34079087.

Sasamoto Y, Hayashi R, Park SJ, Saito-Adachi M, Suzuki Y, Kawasaki S, Quantock AJ, Nakai K, Tsujikawa M, Nishida K. PAX6 Isoforms, along with Reprogramming Factors, Differentially Regulate the Induction of Cornea-specific Genes. *Sci Rep*. 2016 Feb 22;6:20807. doi: 10.1038/srep20807. PMID: 26899008; PMCID: PMC4761963.

Schmitt AM, Riniker F, Anlauf M, Schmid S, Soltermann A, Moch H, Heitz PU, Klöppel G, Komminoth P, Perren A. Islet 1 (Isl1) expression is a reliable marker for pancreatic endocrine tumors and their metastases. *Am J Surg Pathol*. 2008 Mar;32(3):420-5. doi: 10.1097/PAS.0b013e318158a397. PMID: 18300808.

Schwab C, Yu S, Wong W, McGeer EG, McGeer PL. GAD65, GAD67, and GABAT immunostaining in human brain and apparent GAD65 loss in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2013;33(4):1073-88. doi: 10.3233/JAD-2012-121330. PMID: 23114513.

Schwarz M, Cecconi F, Bernier G, Andrejewski N, Kammandel B, Wagner M, Gruss P. Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6. *Development*. 2000 Oct;127(20):4325-34. doi: 10.1242/dev.127.20.4325. PMID: 11003833.

Scott AT, Howe JR. Management of Small Bowel Neuroendocrine Tumors. *Surg Oncol Clin N Am*. 2020 Apr;29(2):223-241. doi: 10.1016/j.soc.2019.11.006. PMID: 32151357.

Selberherr A, Koperek O, Riss P, Scheuba C, Kaderli R, Perren A, Niederle B. Neuroendocrine Liver Metastasis-a Specific Set of Markers to Detect Primary Tumor Sites. *Endocr Pathol*. 2019 Mar;30(1):31-34. doi: 10.1007/s12022-018-9558-z. PMID: 30456697.

Shaham O, Smith AN, Robinson ML, Taketo MM, Lang RA, Ashery-Padan R. Pax6 is essential for lens fiber cell differentiation. *Development*. 2009 Aug;136(15):2567-78. doi: 10.1242/dev.032888. Epub 2009 Jul 1. PMID: 19570848; PMCID: PMC2709063.

Shao R, Egecioglu E, Weijdegård B, Ljungström K, Ling C, Fernandez-Rodriguez J, Billig H. Developmental and hormonal regulation of progesterone receptor A-form expression in female mouse lung in vivo: interaction with glucocorticoid receptors. *J Endocrinol*. 2006 Sep;190(3):857-70. doi: 10.1677/joe.1.06896. PMID: 17003286.

Shi Q, Ni X, Lei M, Xia Q, Dong Y, Zhang Q, Wang W. Phosphorylation of islet-1 serine 269 by CDK1 increases its transcriptional activity and promotes cell proliferation in gastric cancer. *Mol Med*. 2021 May 7;27(1):47. doi: 10.1186/s10020-021-00302-6. PMID: 33962568; PMCID: PMC8106192.

Shin E, Lee Y, Koo JS. Differential expression of the epigenetic methylation-related protein DNMT1 by breast cancer molecular subtype and stromal histology. *J Transl Med*. 2016 Apr 12;14:87. doi: 10.1186/s12967-016-0840-x. PMID: 27071379; PMCID: PMC4830007.

Shukla S, Mishra R. Autoregulation of Pax6 in neuronal cells is mediated by Pax6(5a), Pax6(Δ PD), SPARC, and p53. *Mol Biol Rep*. 2022 Apr;49(4):3271-3279. doi: 10.1007/s11033-022-07164-z. Epub 2022 Feb 1. PMID: 35103896.

Shyr CR, Tsai MY, Yeh S, Kang HY, Chang YC, Wong PL, Huang CC, Huang KE, Chang C. Tumor suppressor PAX6 functions as androgen receptor co-repressor to inhibit prostate cancer growth. *Prostate*. 2010 Feb 1;70(2):190-9. doi: 10.1002/pros.21052. PMID: 19790232; PMCID: PMC3729259.

Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. *Biotechniques*. 2004 Jan;36(1):98-105. doi: 10.2144/04361RV01. PMID: 14740491.

Singh S, Mishra R, Arango NA, Deng JM, Behringer RR, Saunders GF. Iris hypoplasia in mice that lack the alternatively spliced Pax6(5a) isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 May 14;99(10):6812-5. doi: 10.1073/pnas.102691299. Epub 2002 Apr 30. PMID: 11983873; PMCID: PMC124485.

Sisodiya SM, Free SL, Williamson KA, Mitchell TN, Willis C, Stevens JM, Kendall BE, Shorvon SD, Hanson IM, Moore AT, van Heyningen V. PAX6 haploinsufficiency causes cerebral malformation and olfactory dysfunction in humans. *Nat Genet*. 2001 Jul;28(3):214-6. doi: 10.1038/90042. PMID: 11431688.

Smith SB, Ee HC, Connors JR, German MS. Paired-homeodomain transcription factor PAX4 acts as a transcriptional repressor in early pancreatic development. *Mol Cell Biol*. 1999 Dec;19(12):8272-80. doi: 10.1128/MCB.19.12.8272. PMID: 10567552; PMCID: PMC84911.

Soga J, Tazawa K. Pathologic analysis of carcinoids. Histologic reevaluation of 62 cases. *Cancer*. 1971 Oct;28(4):990-8. doi: 10.1002/1097-0142(1971)28:4<990::aid-cnrcr2820280424>3.0.co;2-k. PMID: 4106849.

Song Y, Li S, Wang Z, Zhu J, Gao P, Wang M, Dong Y, Xu H. The role of glutamate decarboxylase 65 in gastric cancer development, progression, and prognosis. *Histopathology*. 2013 Sep;63(3):334-42. doi: 10.1111/his.12164. Epub 2013 Jul 3. PMID: 23822856.

St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature*. 1997 May 22;387(6631):406-9. doi: 10.1038/387406a0. PMID: 9163426.

Stapleton P, Weith A, Urbánek P, Kozmik Z, Busslinger M. Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, PAX-9. *Nat Genet*. 1993 Apr;3(4):292-8. doi: 10.1038/ng0493-292. PMID: 7981748.

Stuart ET, Kioussi C, Gruss P. Mammalian Pax genes. *Annu Rev Genet*. 1994;28:219-36. doi: 10.1146/annurev.ge.28.120194.001251. PMID: 7893124.

Swanson DJ, Tong Y, Goldowitz D. Disruption of cerebellar granule cell development in the Pax6 mutant, Sey mouse. *Brain Res Dev Brain Res*. 2005 Dec 7;160(2):176-93. doi: 10.1016/j.devbrainres.2005.09.005. Epub 2005 Nov 9. PMID: 16289327.

Swisa A, Avrahami D, Eden N, Zhang J, Feleke E, Dahan T, Cohen-Tayar Y, Stolovich-Rain M, Kaestner KH, Glaser B, Ashery-Padan R, Dor Y. PAX6 maintains β cell identity by repressing genes of alternative islet cell types. *J Clin Invest*. 2017 Jan 3;127(1):230-243. doi: 10.1172/JCI88015. Epub 2016 Dec 12. PMID: 27941241; PMCID: PMC5199694.

Tabasaran J, Schuhmann M, Ebinger M, Honegger J, Renovanz M, Schittenhelm J. PAX6 is frequently expressed in ependymal tumours and associated with prognostic relevant subgroups. *J Clin Pathol*. 2022 Nov;75(11):759-765. doi: 10.1136/jclinpath-2021-207526. Epub 2021 Jun 28. PMID: 34183436; PMCID: PMC9606524.

Tang HK, Chao LY, Saunders GF. Functional analysis of paired box missense mutations in the PAX6 gene. *Hum Mol Genet*. 1997 Mar;6(3):381-6. doi: 10.1093/hmg/6.3.381. PMID: 9147640.

Thill M, Berna MJ, Grierson R, Reinhart I, Voelkel T, Piechaczek C, Galambos P, Jager MJ, Richard G, Lange C, Gehling UM. Expression of CD133 and other putative stem cell markers in uveal melanoma. *Melanoma Res.* 2011 Oct;21(5):405-16. doi: 10.1097/CMR.0b013e328348db10. PMID: 21900792.

Thul PJ, Åkesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H, Alm T, Asplund A, Björk L, Breckels LM, Bäckström A, Danielsson F, Fagerberg L, Fall J, Gatto L, Gnann C, Hober S, Hjelmare M, Johansson F, Lee S, Lindskog C, Mulder J, Mulvey CM, Nilsson P, Oksvold P, Rockberg J, Schutten R, Schwenk JM, Sivertsson Å, Sjöstedt E, Skogs M, Stadler C, Sullivan DP, Tegel H, Winsnes C, Zhang C, Zwahlen M, Mardinoglu A, Pontén F, von Feilitzen K, Lilley KS, Uhlén M, Lundberg E. A subcellular map of the human proteome. *Science.* 2017 May 26;356(6340):eaal3321. doi: 10.1126/science.aal3321. Epub 2017 May 11. PMID: 28495876.

Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Köchli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol.* 2001 Dec;159(6):2249-56. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63075-1. PMID: 11733374; PMCID: PMC1850582.

Toriyama A, Mori T, Sekine S, Yoshida A, Hino O, Tsuta K. Utility of PAX8 mouse monoclonal antibody in the diagnosis of thyroid, thymic, pleural and lung tumours: a comparison with polyclonal PAX8 antibody. *Histopathology.* 2014 Oct;65(4):465-72. doi: 10.1111/his.12405. Epub 2014 Apr 26. PMID: 24592933.

Torres M, Gómez-Pardo E, Gruss P. Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development.* 1996 Nov;122(11):3381-91. doi: 10.1242/dev.122.11.3381. PMID: 8951055.

Tsutsumi K, Ohtsuka T, Mori Y, Fujino M, Yasui T, Aishima S, Takahata S, Nakamura M, Ito T, Tanaka M. Analysis of lymph node metastasis in pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs) based on the tumor size and hormonal production. *J Gastroenterol.* 2012 Jun;47(6):678-85. doi: 10.1007/s00535-012-0540-0. Epub 2012 Feb 17. PMID: 22350698.

Turque N, Plaza S, Radvanyi F, Carriere C, Saule S. Pax-QNR/Pax-6, a paired box- and homeobox-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Mol Endocrinol.* 1994 Jul;8(7):929-38. doi: 10.1210/mend.8.7.7984154. PMID: 7984154.

Uccella S, La Rosa S, Metovic J, Marchiori D, Scoazec JY, Volante M, Mete O, Papotti M. Genomics of High-Grade Neuroendocrine Neoplasms: Well-Differentiated Neuroendocrine Tumor with High-Grade Features (G3 NET) and Neuroendocrine Carcinomas (NEC) of Various Anatomic Sites. *Endocr Pathol.* 2021 Mar;32(1):192-210. doi: 10.1007/s12022-020-09660-z. Epub 2021 Jan 12. PMID: 33433884.

Uhr JW. The 1984 Nobel Prize in medicine. *Science.* 1984 Nov 30;226(4678):1025-8. doi: 10.1126/science.6387914. PMID: 6387914

Viale G, Doglioni C, Gambacorta M, Zamboni G, Coggi G, Bordi C. Progesterone receptor immunoreactivity in pancreatic endocrine tumors. An immunocytochemical study of 156 neuroendocrine tumors of the pancreas, gastrointestinal and respiratory tracts, and skin. *Cancer.* 1992 Nov 1;70(9):2268-77. doi: 10.1002/1097-0142(19921101)70:9<2268::aid-cnrcr2820700910>3.0.co;2-x. PMID: 1356613.

Viehweger F, Tinger LM, Dum D, Gorbokon N, Menz A, Uhlig R, Büscheck F, Luebke AM, Hube-Magg C, Hinsch A, Höflmayer D, Fraune C, Lebok P, Weidemann S, Lennartz M, Jacobsen F, Clauditz TS, Krech R, Krech T, Marx AH, Simon R, Burandt E, Steurer S, Sauter G, Minner S, Bernreuther C. Diagnostic and Prognostic Impact of Progesterone Receptor Immunohistochemistry: A Study Evaluating More Than 16,000 Tumors. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2022 Aug 8;2022:6412148. doi: 10.1155/2022/6412148. PMID: 35992051; PMCID: PMC9381849.

Walther C, Gruss P. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development*. 1991 Dec;113(4):1435-49. doi: 10.1242/dev.113.4.1435. PMID: 1687460.

Walther C, Guenet JL, Simon D, Deutsch U, Jostes B, Goulding MD, Plachov D, Balling R, Gruss P. Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes. *Genomics*. 1991 Oct;11(2):424-34. doi: 10.1016/0888-7543(91)90151-4. PMID: 1685142.

Wang F, Zheng TZ, Li W, Qu SY, He DY. Action of progesterone on contractile activity of isolated gastric strips in rats. *World J Gastroenterol*. 2003 Apr;9(4):775-8. doi: 10.3748/wjg.v9.i4.775. PMID: 12679930; PMCID: PMC4611448.

Wang M, Drucker DJ. The LIM domain homeobox gene *isl-1* is a positive regulator of islet cell-specific proglucagon gene transcription. *J Biol Chem*. 1995 May 26;270(21):12646-52. doi: 10.1074/jbc.270.21.12646. PMID: 7759514.

Wen JH, Chen YY, Song SJ, Ding J, Gao Y, Hu QK, Feng RP, Liu YZ, Ren GC, Zhang CY, Hong TP, Gao X, Li LS. Paired box 6 (PAX6) regulates glucose metabolism via proinsulin processing mediated by prohormone convertase 1/3 (PC1/3). *Diabetologia*. 2009 Mar;52(3):504-13. doi: 10.1007/s00125-008-1210-x. Epub 2008 Nov 26. PMID: 19034419.

Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*. 2000 Jul;24(7):1016-9. doi: 10.1097/0000478-200007000-00014. PMID: 10895825.

Werner M, Von Wasielewski R, Komminoth P. Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol*. 1996 Apr;105(4):253-60. doi: 10.1007/BF01463928. PMID: 9072182.

Wiebe S, Nagpal A, Truong VT, Park J, Skalecka A, He AJ, Gamache K, Khoutorsky A, Gantois I, Sonenberg N. Inhibitory interneurons mediate autism-associated behaviors via 4E-BP2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Sep 3;116(36):18060-18067. doi: 10.1073/pnas.1908126116. Epub 2019 Aug 19. PMID: 31427534; PMCID: PMC6731681.

Wine Y, Boutz DR, Lavinder JJ, Miklos AE, Hughes RA, Hoi KH, Jung ST, Horton AP, Murrin EM, Ellington AD, Marcotte EM, Georgiou G. Molecular deconvolution of the monoclonal antibodies that comprise the polyclonal serum response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 19;110(8):2993-8. doi: 10.1073/pnas.1213737110. Epub 2013 Feb 4. PMID: 23382245; PMCID: PMC3581903.

Wu DM, Zhang T, Liu YB, Deng SH, Han R, Liu T, Li J, Xu Y. The PAX6-ZEB2 axis promotes metastasis and cisplatin resistance in non-small cell lung cancer through PI3K/AKT signaling. *Cell Death Dis*. 2019 Apr 25;10(5):349. doi: 10.1038/s41419-019-1591-4. PMID: 31024010; PMCID: PMC6483988.

Xia X, Yin W, Zhang X, Yu X, Wang C, Xu S, Feng W, Yang H. PAX6 overexpression is associated with the poor prognosis of invasive ductal breast cancer. *Oncol Lett*. 2015 Sep;10(3):1501-1506. doi: 10.3892/ol.2015.3434. Epub 2015 Jun 29. PMID: 26622698; PMCID: PMC4533256.

Xiang Y, Malik F, Zhang PJ. Islet-1 Is Differentially Expressed Among Neuroendocrine and Non-Neuroendocrine Tumors and Its Potential Diagnostic Implication. *Int J Surg Pathol*. 2023 Oct;31(7):1294-1301. doi: 10.1177/10668969231157319. Epub 2023 Feb 21. PMID: 37796752.

Xu PX, Zhang X, Heaney S, Yoon A, Michelson AM, Maas RL. Regulation of Pax6 expression is conserved between mice and flies. *Development*. 1999 Jan;126(2):383-95. doi: 10.1242/dev.126.2.383. PMID: 9847251.

Xu W, Rould MA, Jun S, Desplan C, Pabo CO. Crystal structure of a paired domain-DNA complex at 2.5 Å resolution reveals structural basis for Pax developmental mutations. *Cell*. 1995 Feb 24;80(4):639-50. doi: 10.1016/0092-8674(95)90518-9. PMID: 7867071.

Yamashita S. Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry. *Prog Histochem Cytochem*. 2007;41(3):141-200. doi: 10.1016/j.proghi.2006.09.001. Epub 2006 Dec 11. PMID: 17197287.

Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EG, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Öberg K; RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumors, Third Trial (RADIANT-3) Study Group. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 2011 Feb 10;364(6):514-23. doi: 10.1056/NEJMoa1009290. PMID: 21306238; PMCID: PMC4208619.

Yasuda T, Kajimoto Y, Fujitani Y, Watada H, Yamamoto S, Watarai T, Umayahara Y, Matsuhisa M, Gorogawa S, Kuwayama Y, Tano Y, Yamasaki Y, Hori M. PAX6 mutation as a genetic factor common to aniridia and glucose intolerance. *Diabetes*. 2002 Jan;51(1):224-30. doi: 10.2337/diabetes.51.1.224. PMID: 11756345.

Yogarajah M, Matarin M, Vollmar C, Thompson PJ, Duncan JS, Symms M, Moore AT, Liu J, Thom M, van Heyningen V, Sisodiya SM. PAX6, brain structure and function in human adults: advanced MRI in aniridia. *Ann Clin Transl Neurol*. 2016 Apr 12;3(5):314-30. doi: 10.1002/acn3.297. PMID: 27231702; PMCID: PMC4863745.

Zerbi A, Falconi M, Rindi G, Delle Fave G, Tomassetti P, Pasquali C, Capitanio V, Boninsegna L, Di Carlo V; AISP-Network Study Group. Clinicopathological features of pancreatic endocrine tumors: a prospective multicenter study in Italy of 297 sporadic cases. *Am J Gastroenterol*. 2010 Jun;105(6):1421-9. doi: 10.1038/ajg.2009.747. Epub 2010 Jan 19. PMID: 20087335.

Zhang IY, Zhao J, Fernandez-Del Castillo C, Braun Y, Razmdjou S, Warshaw AL, Lillemoe KD, Ferrone CR. Operative Versus Nonoperative Management of Nonfunctioning Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *J Gastrointest Surg*. 2016 Feb;20(2):277-83. doi: 10.1007/s11605-015-3043-5. Epub 2015 Dec 21. PMID: 26691146.

Zhang L, Smyrk TC, Oliveira AM, Lohse CM, Zhang S, Johnson MR, Lloyd RV. KIT is an independent prognostic marker for pancreatic endocrine tumors: a finding derived from analysis of islet cell differentiation markers. *Am J Surg Pathol*. 2009 Oct;33(10):1562-9. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181ac675b. PMID: 19574886.

Zhang Q, Yang Z, Jia Z, Liu C, Guo C, Lu H, Chen P, Ma K, Wang W, Zhou C. ISL-1 is overexpressed in non-Hodgkin lymphoma and promotes lymphoma cell proliferation by forming a p-STAT3/p-c-Jun/ISL-1 complex. *Mol Cancer*. 2014 Jul 29;13:181. doi: 10.1186/1476-4598-13-181. PMID: 25070240; PMCID: PMC4125377.

Zhang W, Cveklova K, Oppermann B, Kantorow M, Cvekl A. Quantitation of PAX6 and PAX6(5a) transcript levels in adult human lens, cornea, and monkey retina. *Mol Vis*. 2001 Jan 2;7:1-5. PMID: 11172136; PMCID: PMC2831401.

Zhang X, Yang X, Wang J, Liang T, Gu Y, Yang D. Down-regulation of PAX6 by promoter methylation is associated with poor prognosis in non small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Sep 1;8(9):11452-7. PMID: 26617874; PMCID: PMC4637690.

Zhao LH, Chen C, Mao CY, Xiao H, Fu P, Xiao HL, Wang G. Value of SATB2, ISL1, and TTF1 to differentiate rectal from other gastrointestinal and lung well-differentiated neuroendocrine tumors. *Pathol Res Pract*. 2019 Jul;215(7):152448. doi: 10.1016/j.prp.2019.152448. Epub 2019 May 18. PMID: 31133441.

Zhao X, Yue W, Zhang L, Ma L, Jia W, Qian Z, Zhang C, Wang Y. Downregulation of PAX6 by shRNA inhibits proliferation and cell cycle progression of human non-small cell lung cancer cell lines. *PLoS One*. 2014 Jan 15;9(1):e85738. doi: 10.1371/journal.pone.0085738. PMID: 24454925; PMCID: PMC3893268.

Zhou YH, Hu Y, Mayes D, Siegel E, Kim JG, Mathews MS, Hsu N, Eskander D, Yu O, Tromberg BJ, Linskey ME. PAX6 suppression of glioma angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor A. *J Neurooncol*. 2010 Jan;96(2):191-200. doi: 10.1007/s11060-009-9963-8. Epub 2009 Jul 19. PMID: 19618119; PMCID: PMC2808537.

Zhou YH, Tan F, Hess KR, Yung WK. The expression of PAX6, PTEN, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in gliomas: relationship to tumor grade and survival. *Clin Cancer Res*. 2003 Aug 15;9(9):3369-75. PMID: 12960124.

Zhou YH, Wu X, Tan F, Shi YX, Glass T, Liu TJ, Wathen K, Hess KR, Gumin J, Lang F, Yung WK. PAX6 suppresses growth of human glioblastoma cells. *J Neurooncol*. 2005 Feb;71(3):223-9. doi: 10.1007/s11060-004-1720-4. PMID: 15735909.

Zhu L, Domenico DR, Howard JM. Metastatic pancreatic neuroendocrine carcinoma causing Cushing's syndrome. ACTH secretion by metastases 3 years after resection of nonfunctioning primary cancer. *Int J Pancreatol*. 1996 Jun;19(3):205-8. doi: 10.1007/BF02787369. PMID: 8807366.

Zimmermann N, Lazar-Karsten P, Keck T, Billmann F, Schmid S, Brabant G, Thorns C. Expression Pattern of CDX2, Estrogen and Progesterone Receptors in Primary Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors and Metastases. *Anticancer Res*. 2016 Mar;36(3):921-4. PMID: 26976979.

9 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Methodik – Avidin-Biotin-Enzymkomplex
ADH – Antidiuretisches Hormon
APAAP-Methodik – Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex
Aqua dest – Destilliertes Wasser
ARX – Aristaless-related homeobox gene
ATRX – Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
BDNF – Brain-derived neurotrophic factor
Cdx-2/3 – Caudal Type Homeobox 2/3
CpG-Dinukleotide – Dinukleotide mit den Basen Cytosin/Guanin
DAB-Chromogen – 3,3'-Diaminobenzidin
DAXX – Death domain-associated protein
DC5 – Delta Crystallin 5
Dkk1 – Dickkopf related protein 1
ELP4 – Elongator Acetyltransferase Complex Subunit 4
EMT – epithelial-mesenchymale Transition
EPOS-Methodik – Enhances Polymer One Step Staining
GABA – Gamma-Aminobuttersäure
GAD1/GAD67 – Glutamat Decarboxylase 1
GAD2/GAD65 – Glutamat Decarboxylase 2
GATA3 – GATA-bindendes Protein 3
GTEx – The Adult Genotype-Tissue Expression project
HD – Homöodomäne
HE-Färbung – Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIER-Verfahren – Heat Induced Epitope Retrieval
HmbKHG – Hamburgisches Krankenhausgesetz
HPA – The Human Protein Atlas
INSM1 – Insulinoma-associated protein 1
Isl-1 – Islet-1
IWGAV – International working group for antibody validation
KRT12 – Keratin 12
KRT3 – Keratin 3
LNK – Linker-Region
LSAB-Methodik – Labeled-(Strept-)Avidin-Biotin-Komplex
MafB – MAF BZIP Transcription Factor B
MEN-1 – Multiple Endokrine Neoplasie, Typ 1
MET – Tyrosine-Protein Kinase Met

MTA – Multitumor-Array
NEC – Neuroendokrines Karzinom
NEN – Neuroendokrine Neoplasie
NET – Neuroendokriner Tumor
NeuroD1 – Neurogenic differentiation 1
NOS – nicht weiter spezifiziert (Sarkome)
NST – nicht-spezifischer Typ (Brustkrebs)
P27 – Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor 1B
PAI – N-terminale Subdomäne von Pax-6
PAP-Methodik – Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex
PAX – Paired Box Proteine
Pax-2 – Paired Box 2
Pax-4 – Paired Box 4
Pax-6 – Paired Box 6
Pax-6(5a) – Isoform von Pax-6, die durch zusätzliche Transkription von Exon 5a entsteht
Pax-8 – Paired Box 8
Pax6(Δ PD) – Isoform von Pax-6, der die Paired-Domäne fehlt
PC1/3 – Proprotein convertase 1/3
PC2 – Proprotein convertase 2
PD – Paired Domäne
PDX1 – Pancreatic and duodenal homeobox 1
Pitx3 – Paired Like Homeodomain 3
PR – Progesteron-Rezeptor
PST – Transaktivierungsdomäne (prolin-, serin-, threoninreich)
R – Residualtumor
Rb – Retinoblastom-Protein
RED – C-terminale Subdomäne von Pax-6
SCB – Santa Cruz Biotechnology
Sfrp1 – Secreted Frizzled Related Protein 1
SNEC – Small-cell neuroendocrine carcinoma
Sox2 – SRY-Box Transcription Factor 2
SSTR2/5 – Somatostatin receptor subtypes 2/5
SV2 – Synaptisches Vesikelprotein 2
TBS-T-Puffer – Tris-buffered saline with Tween20
TCGA – The Cancer Genome Atlas
TMA – Tissue-Microarray
TNM – Tumor, Nodes, Metastasis-Klassifikation

VIPom – Vasoaktive Intestinale Polypeptide (VIP) produzierender Tumor

VMAT – Vesikulärer Monoamintransporter

WAGR-Syndrom – Wilms-Tumor, Aniridie, Anomalien des Urogenitalsystems und geistige Retardierung

WAGRO-Syndrom – Wilms-Tumor, Aniridie, Anomalien des Urogenitalsystems, geistige Retardierung, Übergewicht

WHO – World Health Organization

WT-1 – Wilms-Tumor-Protein

ZNS – Zentrales Nervensystem

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Historische Klassifikation von NEN nach histologischem Aufbau. Abb. modifiziert nach Soga et Tazawa, 1971. A = Typ A. B = Typ B, anastomosierend. C = Typ B, trabekulär. D = Typ D. E = Mischform A+C	6
Abbildung 2: Färbung von NEN gegen verschiedene neuroendokrine Marker. Abbildung aus Rindi et al., 2022.	7
Abbildung 3: Immunhistochemisches Färbeverhalten eines pankreatischen NET mit dem Grading G3. Abbildung aus Rindi et al., 2022	9
Abbildung 4: Struktur von Pax-6. Abbildung aus Dansault et al., 2007	12
Abbildung 5: Interaktion der Paired Box- Domäne von Pax-6 mit DNA; Abbildung aus Xu et al., 1995.	13
Abbildung 6: RNA-Expression von Pax-6 in verschiedenen Gewebstypen; entnommen aus https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007372-PAX6/tissue	15
Abbildung 7: RNA-Expression von Pax-6 auf Zellebene, entnommen aus https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007372-PAX6/single+cell+type	15
Abbildung 8: Verschiedene Wirkungen von Pax-6 auf α -Zelldifferenzierung und Glukagonexpression; modifiziert nach Gosmain et al., 2011.	18
Abbildung 9: Überblick über die RNA-Expression in Tumoren nach dem TCGA-Dataset; entnommen aus https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007372-PAX6/pathology	22
Abbildung 10: Überblick über die aktuelle Studienlage zur Expression von Pax-6 in verschiedenen Tumorentitäten. Legende: $n \leq 10$ (rot); $11 \leq n \leq 25$ (gelb); $n > 25$ (grün). Die Markierung X entspricht dem jeweiligen Durchschnitt der vorliegenden Studienergebnisse zu dieser Tumorentität.	25
Abbildung 11: RNA-Expression von Isl-1 in verschiedenen Gewebstypen; entnommen aus https://www.proteinatlas.org/ENSG00000016082-ISL1/tissue	27
Abbildung 12: RNA-Expression von Isl-1 nach dem TCGA-Dataset; entnommen aus https://www.proteinatlas.org/ENSG00000016082-ISL1/pathology	28
Abbildung 13: Überblick über die aussagekräftigsten aktuellen Studien zur Expression von Isl-1 in verschiedenen Tumorentitäten.	29
Abbildung 14: RNA-Expression von PR in verschiedenen Gewebstypen; entnommen aus https://www.proteinatlas.org/ENSG00000082175-PGR/tissue	30

Abbildung 15: RNA-Expression von GAD2 in verschiedenen Gewebstypen; entnommen aus https://www.proteinatlas.org/ENSG00000136750-GAD2/tissue	31
Abbildung 16: Foto eines Gewebblocks mit zugehörigem histologischen Schnitt, in dem der später zu stanzende Bereich des Tumors markiert wurde.	34
Abbildung 17: Schematischer Aufbau eines standardmäßigen TMAs am UKE	35
Abbildung 18: Übersicht über den Aufbau eines UKE-Arrayers und einzelne Schritte der TMA-Herstellung.....	36
Abbildung 19: Schematische Darstellung der direkten (a) und indirekten (b) Immunhistochemie. Grafik modifiziert nach Hantschke et Palmedo, 2015.	45
Abbildung 20: Schematische Darstellung der (a) und (b) EPOS-, (c) PAP- und (d) APAAP-Methodik. Modifiziert nach Hantschke et Palmedo, 2015.....	47
Abbildung 21: Schematische Darstellung der (a) ABC- und (b) LSAB-Methode. Modifiziert nach Hantschke et Palmedo, 2015.....	48
Abbildung 22: Pankreas mit starker nukleärer und diskreter zytoplasmatischer Pax-6-Anfärbung von Zellen in Langerhans'schen Inseln.	54
Abbildung 23: Magen-Mukosa mit Pax-6-Anfärbung einzelner (endokriner) Zellen.	54
Abbildung 24: Duodenum mit Pax-6-Anfärbung einzelner endokriner Zellen.....	55
Abbildung 25: Brunner'sche Drüse mit kräftiger nukleärer Anfärbung einzelner endokriner Zellen.	55
Abbildung 26: Respiratorisches Epithel eines Bronchus mit nukleärer Pax-6-Anfärbung einzelner respiratorischer Epithelzellen.....	56
Abbildung 27: Cerebrum mit kräftiger nukleärer Pax-6-Anfärbung von Granularzellen. ...	56
Abbildung 28: Cerebrum mit mäßig starker Pax-6-Anfärbung einzelner Gliazellen.	57
Abbildung 29: Hypophyse mit geringgradiger nukleärer Pax-6-Anfärbung einzelner Epithelzellen (Adenohypophyse).	57
Abbildung 30: Pankreas mit kräftiger nukleärer Anfärbung von Inselzellen mit den Antikörpern MSVA-706M (A) und [EPR15858] (B).....	58
Abbildung 31: Magen mit kräftiger nukleärer Positivität von endokrinen Zellen, nachgewiesen mit MSVA-706M (A) und [EPR15858] (B).	59
Abbildung 32: Rektum-Mukosa mit kräftiger nukleärer Pax-6-Positivität in einzelnen endokrinen Zellen, dargestellt mit MSVA-706M (A) und [EPR15858] (B).	60

Abbildung 33: Brunner'sche Drüsen des Duodenums mit starker Pax-6-Anfärbung einzelner endokriner Zellen, dargestellt mit Antikörpern MSVA-706M (A) und [EPR15858] (B).....	61
Abbildung 34: Respiratorisches Epithel des Bronchus mit kräftiger nukleärer Färbung einzelner respiratorischer Zellen, nachgewiesen mit Antikörpern MSVA-706M (A) und [EPR15858] (B).	62
Abbildung 35: Adenohypophyse mit mäßiggradiger nukleärer Positivität einzelner epithelialer Zellen, dargestellt mit MSVA-706M (A) und [EPR15858] (B).....	63
Abbildung 36: Cerebrum mit kräftiger nukleärer Positivität von Granularzellen, dargestellt mit MSVA-706M (A) und [EPR15858] (B).	64
Abbildung 37: Cerebrum mit mäßig starker bis starker nukleärer Pax-6-Anfärbung von Gliazellen, dargestellt mit Antikörper MSVA-706M (A) und [EPR15858] (B).....	65
Abbildung 38: Neuroendokriner Tumor (NET) des Pankreas mit kräftiger nukleärer Pax-6-Färbung.	76
Abbildung 39: Neuroendokrines Karzinom (NEC) des Pankreas mit kräftiger nukleärer Pax-6-Positivität in allen Tumorzellen.	76
Abbildung 40: Spermatozytischer Tumor des Hodens mit gering- bis mäßiggradiger nukleärer Pax-6-Positivität in der Mehrzahl der Tumorzellen.....	77
Abbildung 41: Seröses high-grade-Karzinom des Ovars mit nukleärer Pax-6-Positivität der meisten Tumorzellen.	77
Abbildung 42: Merkelzellkarzinom der Haut mit inhomogener (geringgradiger bis stark ausgeprägter) nukleärer Anfärbung von Tumorzellen.	78
Abbildung 43: Kleinzelliges NEC der Harnblase mit kräftiger nukleärer Pax-6-Positivität von > 90% der Tumorzellen.....	78
Abbildung 44: Mamma-Karzinom von keinem speziellen Typ (NST) mit kräftiger nukleärer Pax-6-Färbung von zahlreichen Tumorzellen.....	79
Abbildung 45: Hodgkin-Lymphom mit distinkter Pax-6-Färbung von Reed-Sternberg- und Hodgkin-Zellen.	79
Abbildung 46: Grafische Darstellung der individuellen Ergebnisse für die Marker Pax-6, GAD2 und PR (A).	81
Abbildung 47: Grafische Darstellung der Kombinationen von Pax-6 und PR (B), Pax-6 und GAD2 (C) und Pax-6, GAD2 und PR (D).....	82

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikation neuroendokriner Neoplasien von 2022. Tabelle übersetzt aus Rindi et al., 2022	8
Tabelle 2: Kriterien zum Grading von pankreatischen NET und NEC. Tabelle aus Konukiewicz et al., 2022	8
Tabelle 3: Überblick über die aktuelle Studienlage zur Pax-6-Expression in verschiedenen neuroendokrinen Tumoren.	23
Tabelle 4: Überblick über verschiedene Kriterien der untersuchten Studien zu NET. SCB = Santa Cruz Biotechnology (Hersteller). Z. T. keine Angaben zu Hersteller, Klon-ID, Ursprungstier, Rekombinanz vorhanden.	26
Tabelle 5: Vergleich verschiedener Studienergebnisse zur Sensitivität und Spezifität von Isl-1	29
Tabelle 6: Anonymisierter TMA-Datenfile (Lungenkarzinom, LUN 5.2) zur besseren Darstellung des Aufbaus.	37
Tabelle 7: Zusammensetzung des Normalgewebs-Arrays am UKE.	38
Tabelle 8: Genaue Zusammensetzung des für die Pax-6-Studie verwendeten Multitumor-Arrays.	39
Tabelle 9: Detaillierte Darstellung des Färbeprotokolls für Pax-6	50
Tabelle 10: Kriterien für die statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbung	52
Tabelle 11: Übersicht über die Auswertungsergebnisse der Pax-6-Immunhistochemie-Färbung.	66
Tabelle 12: Vergleich der Sensitivität und Spezifität der Marker Pax-6, GAD2 und PR allein und in verschiedenen Kombinationen für die Erkennung pankreatischen Tumorursprungs.	80
Tabelle 13: Übersicht über die bisherige immunhistochemische Studienlage zur Expression von Pax-6 in Tumoren. Die Tabelle gibt einen Überblick über die im Rahmen der jeweiligen Studie untersuchten Tumorentitäten sowie die zugehörigen Fallzahlen. ...	86

12 Erklärung des Eigenanteils

Im Rahmen der Erstellung von Tissue Microarrays (TMAs) identifizierte ich zunächst für die Verwendung in TMAs geeignete Tumorpräparate durch Recherche in der klinisch-pathologischen Datenbank Nexus. Hieraus erstellte ich Datenbanken mit geeigneten Präparaten, in denen ich unter anderem Korrelationen zwischen klinischen und pathologischen Merkmalen ausarbeitete. Auf Basis hiervon stellte ich Stanz-Layouts für die anzufertigenden TMAs her, sammelte die nötigen Block- und Schnittpräparate von Tumoren und Normalgewebe aus dem Befund- und Gewebearchiv, prüfte diese auf generelle Eignung und bereitete sie für die ausführliche Befundung durch einen Pathologen vor. Außerdem erlernte ich die technischen Grundlagen der TMA-Herstellung.

Weiterhin nahm ich regelmäßig an Seminaren des Institutes teil, in denen ich unter anderem grundlegende Kenntnisse in den Bereichen Strukturierte Literaturrecherche, TMA-Erstellung, Antikörperherstellung und -validierung, DNA-Nachweismethoden, Proteinnachweismethoden erlernte. Auf Basis dieses Wissens führte ich eine umfangreiche Literaturrecherche zu den Themen TMAs, Immunhistochemie, Antikörper-Validierung, Pax-6, NEN insbesondere des Pankreas und ihre mögliche Relation zur Pax-6-Expression sowie zu Islet-1, Progesteron-Rezeptor und GAD-2 durch. Ich erstellte Datenbanken auf Grundlage der aktuellen Literatur zur Expression von Pax-6, Islet-1 und Progesteron-Rezeptor in Tumoren sowie zu möglichen klinisch-pathologischen Korrelationen. Diese Literaturdatenbanken wertete ich bezüglich verwendeter Schnittmethodik, Immunhistochemie, Reagenzien und Auswertungskriterien aus und beurteilte basierend darauf die Objektivierbarkeit besagter Studien. Weiterhin wertete ich die Expression der genannten Proteine in verschiedenen Tumortypen – insbesondere in NEN des Pankreas – aus, um die prognostische Relevanz der Expression beurteilen zu können. Ich war beteiligt an der Erstellung und immunhistochemischen Auswertung der TMAs der Pax-6-Studie und arbeitete an der statistischen Aufbereitung und Validierung der Daten sowie der Untersuchung der klinisch-pathologischen Korrelation mit. Ich war ebenfalls an der Publikation der Ergebnisse in Form einer Studie beteiligt.

13 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

Unterschrift

14 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, ohne die die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Insbesondere möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Sauter bedanken, der mir die Möglichkeit zur Promotion und der damit verbundenen Weiterentwicklung auf meinem Weg in die Medizin gab und mir immer wieder konstruktives Feedback lieferte, anhand dessen ich stetig dazulernen und meine Dissertation ausbauen und verbessern konnte.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Zweitbetreuer Herrn Prof. Dr. Simon für seine – egal, ob Tag oder Nacht – überaus tatkräftige Unterstützung bedanken.

Einen besonderen Dank möchte ich auch an Frau Dr. Kluth richten, die nicht nur regelmäßig interessante und hilfreiche Seminare für uns alle gehalten, sondern auch geduldig und umfassend meine vielen Nachfragen beantwortet und mich unterstützt hat.

Herzlichen Dank auch an Frau Breitmeyer für die technische Unterstützung bei meinen Präsentationen, die Herausgabe meiner Unterlagen und die Beantwortung meiner vielen Mails.

Außerdem danke ich Frau Behm, Frau Steurer, Frau Brandt, Frau Eisenberg und Frau Seekamp dafür, durch ihre hervorragende technische Arbeit über Jahre hinweg mein Projekt überhaupt erst möglich gemacht zu haben – und insbesondere Frau Behm für ihre Geduld mit uns, die netten Gespräche zwischendurch und die vielen Erklärungen!

Weiterhin danke ich den vielen Pathologinnen und Pathologen des Instituts, deren namentliche Nennung diesen Rahmen sprengen würde, für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Vielen Dank an meine Mitdoktorandinnen und -doktoranden Lars, Samer und Tayyaba, mit denen selbst der längste Tag Spaß gemacht hat – ich freue mich, euch kennengelernt haben zu dürfen und werde mich noch lange an unsere gemeinsame Zeit erinnern!

Von ganzem Herzen bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie: Bei meinen Eltern Conny und Markus, ohne deren Liebe und Unterstützung ich es niemals so weit geschafft hätte und die mir die Stärke mitgegeben haben, die ich jetzt brauche – und bei meiner Schwester Emma-Louise, die immer meine beste Freundin bleiben wird.

Vielen Dank an Olinka und Werner, die mich vom ersten Tag an wie einen Teil der Familie behandelt haben. Ich bin glücklich darüber, dich kennengelernt haben zu dürfen, Werner, auch wenn es leider viel zu kurz war.

Und schließlich bedanke ich mich bei meinem wundervollen Verlobten Dominik, der immer für mich da ist, mich unterstützt und motiviert, mir zuhört, mich zum Lachen bringt und bis spät nachts mit mir zum Reden aufbleibt, auch wenn er am nächsten Tag ans DESY muss: Vielen Dank, dass du bei mir bist, ich liebe dich bis ans Ende des Multiversums und zurück.