

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. Guido Sauter

**Diagnostische und prognostische Bedeutung der Expression von
Arginase-1 in menschlichen Tumoren und Normalgeweben:
Eine Tissue-Microarray-Studie an 12 047 Tumoren**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Eva Sophie Gehrig
aus Stuttgart

Hamburg 2021

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 30.03.2022**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Stefan Schneider

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Guido Sauter

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	4
1.1 Arginase	4
1.2 Arginase-1	6
1.2.1 Struktur und Funktion.....	6
1.2.2 Bedeutung in Normalgeweben	8
1.2.3 Bedeutung in Tumorgeweben.....	12
1.3 Klinische Bedeutung in der Tumorthherapie	15
1.4 Klinische Bedeutung in der Diagnostik (Pathologie)	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Tissue-Microarray Technik	18
2.2 Für die Studie verwendete TMA-Blöcke.....	22
2.3 Immunhistochemie.....	28
2.4 Arginase-1 Immunhistochemie	31
2.5 Auswertung der Immunhistochemie	33
2.6 Statistik	33
3. Ergebnisse	33
3.1 Technische Aspekte	33
3.2 Arginase-1 in Normalgeweben	34
3.3 Arginase-1 in Tumoren	40
3.4 Arginase-1 Expression und klinisch-pathologische Parameter	57
4. Diskussion	59
5. Zusammenfassung	69
6. English Summary	70
7. Abkürzungsverzeichnis	71
8. Literaturverzeichnis.....	72
9. Danksagung.....	82
10. Lebenslauf.....	83
11. Eidesstattliche Erklärung	84

1. Einleitung

1.1 Arginase

Die in eukaryotischen Zellen ubiquitär exprimierte Arginase gehört zur Enzymfamilie der Hydrolasen. Sie kommt in humanem Gewebe in zwei Isoformen vor, welche sich insbesondere bezüglich ihrer intrazellulären Lokalisation sowie ihrer Gewebespezifität unterscheiden (Jenkinson et al., 1996). Neben der mitochondrialen Arginase-2, die unter anderem von Bakterien, Hefen, Pflanzen exprimiert wird, exprimieren Wirbeltiere und andere höhere Lebensformen zusätzlich auch die Isoform Arginase-1, welche sich im Zytosol findet (Samson, 2000, Jenkinson et al., 1996). Es wird angenommen, dass es sich bei der mitochondrialen Arginase-2 um eine rudimentäre Form der ursprünglichen Arginase handelt und es nach der Trennung in Wirbeltiere und Wirbellose zur Duplikation des Enzyms kam (Jenkinson et al., 1996). Aufgrund ihrer mehrheitlichen Expression im jeweiligen Gewebe wird die Arginase-1 synonym als „Leberarginase“, die Arginase-2 als „Nierenarginase“ bezeichnet (Ash, 2004). Obwohl die beiden Isoformen von unterschiedlichen Genen codiert werden, weisen sie eine 60%ige Homologie der Primärstrukturen sowie eine 100%ige Homologie des aktiven Zentrums auf (Vockley et al., 1996b).

Beide Enzyme katalysieren – unter Zuhilfenahme ihres Kofaktors Mangan – die Hydrolyse von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff. Diese beiden Produkte, Harnstoff und L-Ornithin, erfüllen unterschiedliche Funktionen im Körper: Harnstoff ermöglicht die Elimination stickstoffhaltiger Abbauprodukte des Körpers, die Bereitstellung von L-Ornithin ermöglicht über weitere enzymatische Reaktionen den Aufbau von Polyaminen und Prolin (Munder, 2009). Obwohl beide Isoformen dieselbe Reaktion katalysieren, wird der Arginase-1 durch ihr überwiegendes Vorkommen in der Leber primär eine katabole Funktion im Sinne der Harnstoffbildung, der Arginase-2 durch ihr Vorkommen im Mitochondrium eine anabole Funktion durch die Bereitstellung von L-Ornithin als wichtigstes Produkt zugeschrieben (Iyer et al., 1998). Eine schematische Darstellung der von der Arginase katalysierten Reaktion ist in Abbildung 1 dargestellt.

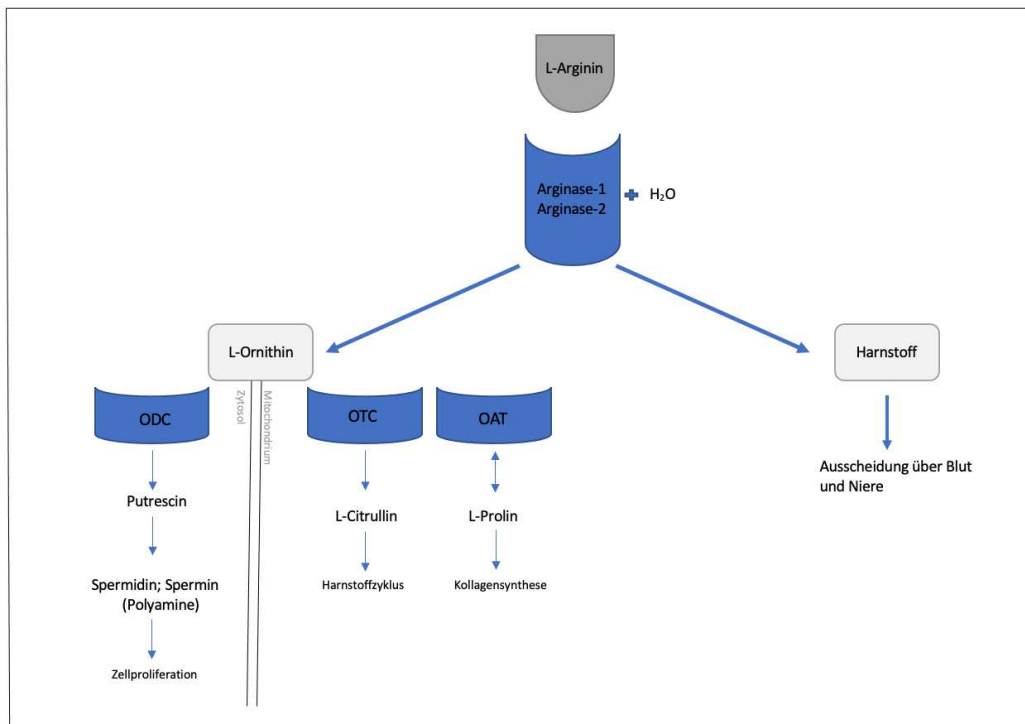


Abbildung 1: Schematische Übersicht der durch die Arginase katalysierten Reaktion sowie mögliche weitere Wege der Produkte. Verwendete Abkürzungen: *ODC* Ornithindecarboxylase, *OTC* Ornithin-Transcarbamylase, *OAT* Ornithin-Aminotransferase. Zu beachten ist, dass die abgebildeten Reaktionen nicht alle in ein und derselben Zelle, wie hier zur Vereinfachung dargestellt, ablaufen. Modifiziert nach (Caldwell et al., 2018, Wu et al., 2009).

Der Harnstoffzyklus läuft in den Hepatozyten ab und wird durch die dort exprimierte Arginase-1 als eines der Schlüsselenzyme in seinem vollen Ablauf ermöglicht. In den Leberzellen wird Arginase-1, nicht aber Arginase-2 exprimiert (Yang und Ming, 2014). Bei der Verdauung von Proteinen im menschlichen Körper fallen stickstoffhaltige Verbindungen wie Ammoniak an, welche in hohen Konzentrationen neurotoxisch sind und deshalb in den weniger giftigen Harnstoff umgewandelt und letztlich renal ausgeschieden werden (Dimski, 1994). Bei unvollständigem Ablauf des Harnstoffzyklus, bei dem zwar Arginase vorhanden ist, aber ein oder mehrere weitere zyklusermöglichende Enzyme oder Transportproteine im Gewebe fehlen, ist der überwiegende physiologische Nutzen der Arginase Reaktion die Bereitstellung der nicht-proteinogenen Aminosäure L-Ornithin (Wang et al., 2014). Wie in Abbildung 1 dargestellt wird L-Ornithin von der Ornithindecarboxylase (ODC) sowie der Ornithin-Aminotransferase (OAT) benötigt, um Polyamine und Prolin aufzubauen. Im menschlichen Körper sind Polyamine an der Angiogenese, der Wundheilung, aber auch der Stimulation des Zellwachstums, sowohl in Normal- als auch in Tumorgewebe, beteiligt (Pegg, 1986, Lenis et al., 2017). Prolin wird zur Kollagensynthese benötigt (Durante et al., 2001). Der Aufbau von Polyaminen und Prolin spielt vor allem bei der extrahepatischen Arginase Reaktion eine Rolle, da L-Ornithin, welches aus dem Harnstoffzyklus stammt, in der Regel kein Substrat der OAT oder der ODC wird (Caldwell et al., 2018).

1.2 Arginase-1

1.2.1 Struktur und Funktion

Das für Arginase-1 codierende Gen ARG1 ist auf Chromosom 6q23 des humanen Genoms lokalisiert (Sparkes et al., 1986). Es ist zehn bis zwölf kb lang und beinhaltet acht Exons sowie sieben Introns (Takiguchi et al., 1988). Das Genprodukt besteht aus 322 Aminosäuren und codiert für je eine Untereinheit von ca. 35 kDa Molekularmasse (Dizikes et al., 1986, Ash, 2004). Drei identische Untereinheiten, die in ihrer Tertiärstruktur in α -Helix und β -Faltblattstruktur gefaltet vorliegen, setzen sich zum vollständigen Apoenzym zusammen (Ash, 2004). Das aktive Zentrum befindet sich in der unteren Hälfte jeder Untereinheit und hat jeweils zwei Mangan Moleküle, welche für die enzymatische Aktivität obligat sind, gebunden (Abbildung 3) (Kanyo et al., 1996). Das pH Optimum der Arginase liegt bei 9 (Beruter et al., 1978).

Transkriptionsfaktoren, welche die Expression der Arginase-1 im Mausmodell beeinflussen, sind STAT3 (signal transducer and activator of transcription3), Foxhead box transcription factor (FOX) O4, hypoxia inducible factor (HIF)-1, CCAAT/ enhancer binding protein (C/EBP) β und der activator of transcription factor (ATF)2 (Shatanawi et al., 2015, Sheldon et al., 2013, Zhu et al., 2015). Ein möglicher Inhibitor der Enzymaktivität ist neben der Aminosäure L-Lysin (Beruter et al., 1978) auch das endogene N-omega-hydroxy-L-Arginin, welches als Intermediat in der Stickstoffmonoxidsynthese entsteht (Boucher et al., 1994).

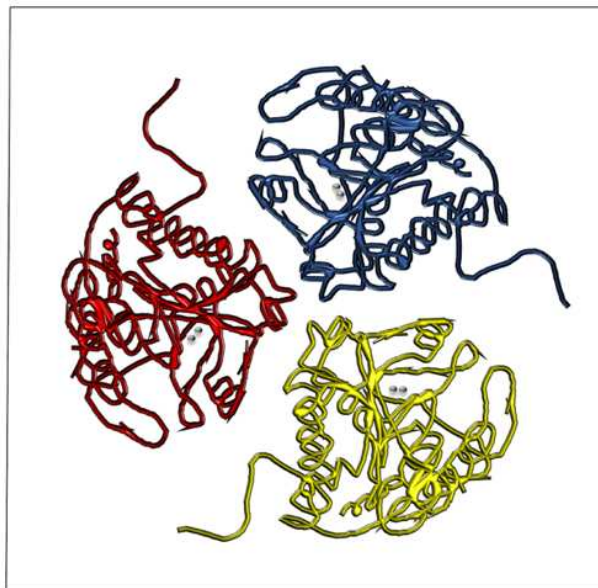


Abbildung 2: **Struktur der Arginase-1.** Drei identische Untereinheiten (Homotrimer), die jeweils zwei Mangan Moleküle gebunden haben, setzen sich zum vollständigen Holoenzym zusammen. Modifiziert nach (Kanyo et al., 1996).

Ihre übergeordnete Funktion erfüllt die Arginase-1 im Harnstoffzyklus, welcher essenziell für den Ammoniakstoffwechsel von Säugetieren ist (Dimski, 1994). Ammoniak, welches bei der Metabolisierung von Proteinen anfällt, ist eine wichtige Stickstoffquelle für die Aminosäuresynthese im Organismus. Kommt es allerdings zur Akkumulation von Ammoniak im Blut, wirkt dieses zytotoxisch und löst geistige Verwirrung, Spasmen bis hin zu schweren Erscheinungsbildern wie der hepatischen Enzephalopathie oder dem hyperammonischen Koma aus (Auron und Brophy, 2012). In fünf enzymatisch kontrollierten Reaktionen, von denen die ersten beiden im Mitochondrium und die restlichen drei im Zytosol der Hepatozyten ablaufen, wird im Katabolismus angefallenes überschüssiges Ammoniak zum wasserlöslichen Harnstoff metabolisiert, damit dieser über die Niere ausgeschieden werden kann (Abbildung 3). Täglich werden annähernd 30 g Harnstoff mit dem Urin ausgeschieden (Yang und Bankir, 2005). Bei einer proteinreichen Ernährung kann die Harnstoffproduktion, gegenüber einer längeren Nahrungsabstinenz, um 300 % ansteigen (Schimke, 1962).

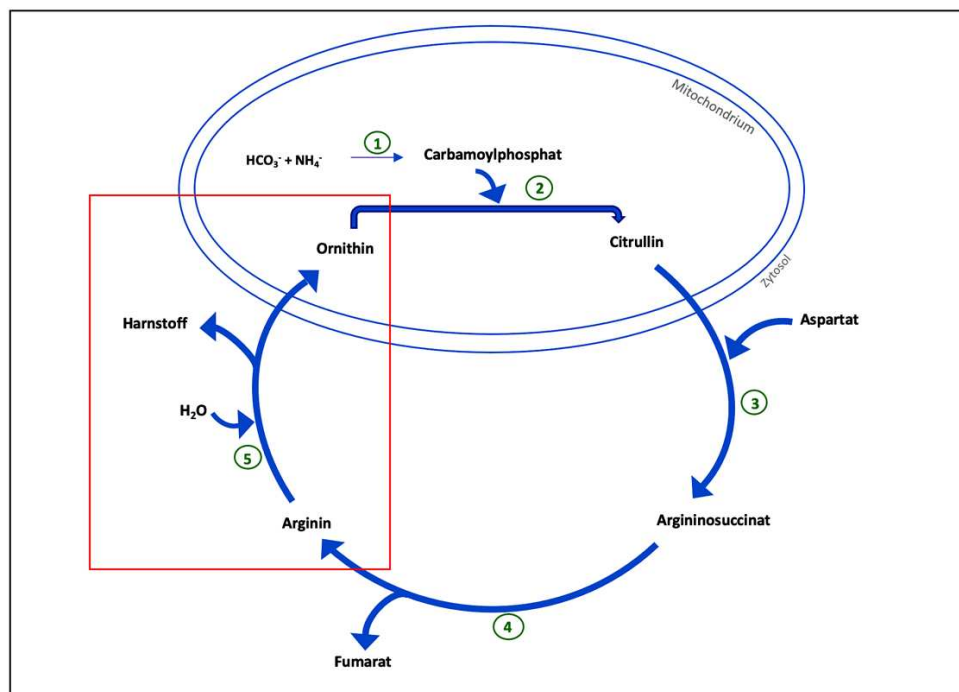


Abbildung 3: **Harnstoffzyklus.** Vereinfachte Darstellung des Harnstoffzyklus. ①Carbamoylphosphat-Synthetase1 ②Ornithin Carbamoyl-Transferase ③Argininosuccinat-Synthetase ④Argininosuccinat-Lyase ⑤Arginase-1. Der Transport von Citrullin/Ornithin über die mitochondriale Membran erfolgt via Ornithin/Citrullin Transporter die der Anschaulichkeit halber nicht abgebildet sind. Modifiziert nach (Wang et al., 2014).

Neben ihrer Funktion im Harnstoffzyklus ist die Arginase-1 auch an immunologischen Abläufen beteiligt. Besonders durch ihre Einflussnahme auf den L-Arginin Haushalt wird der Arginase-1 in immunologischen Abläufen wie Entzündung, Immunevasion von Tumorgewebe, Immunsuppression oder Infektionskrankheiten eine zunehmende Bedeutung zugeschrieben (Bronte und Zanovello, 2005).

1.2.2 Bedeutung in Normalgeweben

Obwohl der Begriff Arginase-1 unter anderem synonym mit dem Begriff Leberarginase verwendet wird, wird Arginase-1 nicht ausschließlich in den Hepatozyten exprimiert (Yang und Ming, 2014). In polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs) wird Arginase-1 konstitutiv exprimiert, allerdings im Gegensatz zu den Hepatozyten in Granula und nicht im Zytosol gespeichert (Munder et al., 2005). Zusätzlich gibt der Human Protein Atlas (HPA) eine Proteinexpression in pre-leptotänen Spermatozyten sowie den Spermato gonien des Hodens an (Abbildung 4). Die Bedeutung der Arginase-1 in letzteren Geweben ist bis dato unklar. Neben ihrer konstitutiven Expression ist die Arginase-1 zusätzlich induzierbar, zum Beispiel im Endothel, glatten Muskelzellen oder manchen Epithelien (Borregaard et al., 2007, Munder, 2009).

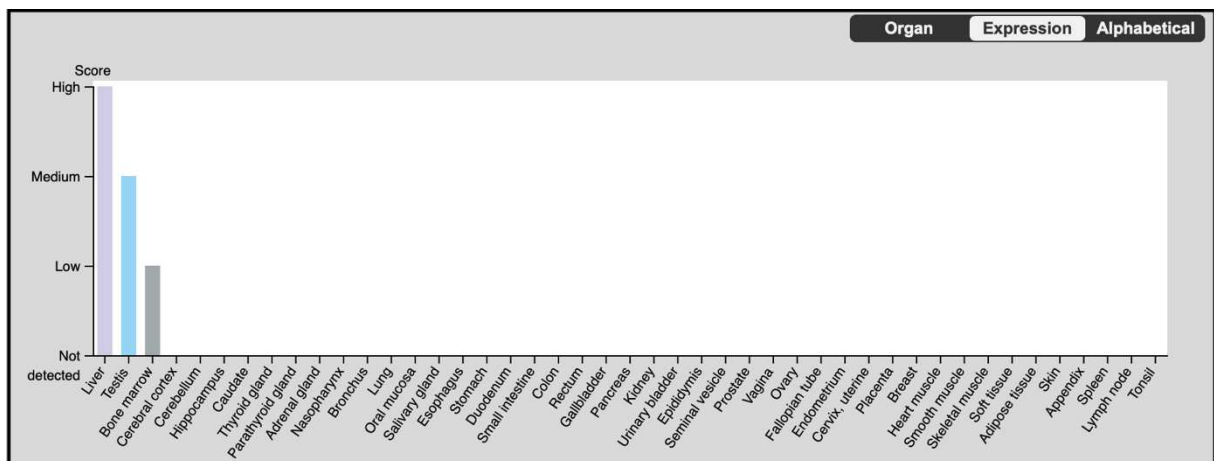


Abbildung 4: Protein Expression der Arginase-1 in humanem Gewebe.

Stand 24.09.2021. (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000118520-ARG1/tissue>).

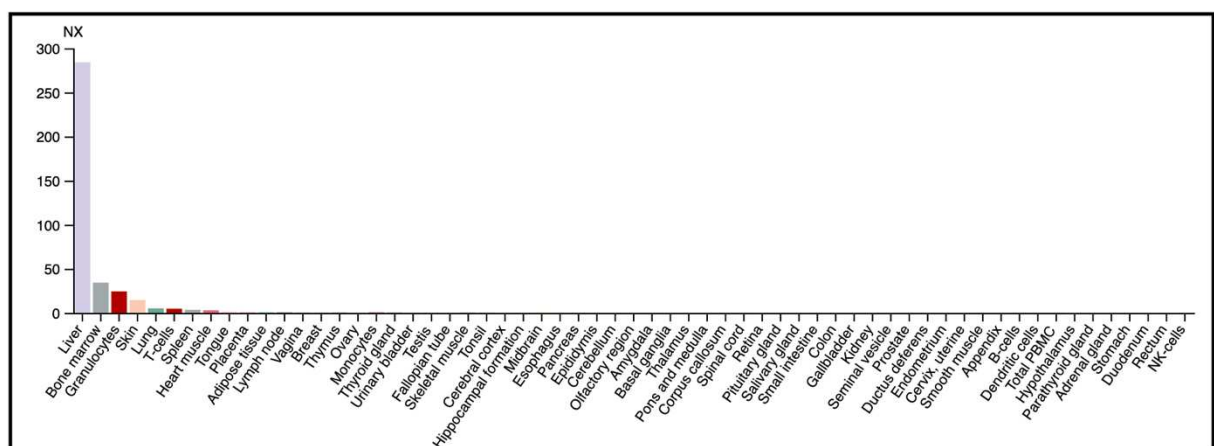


Abbildung 5: mRNA Expression der Arginase-1 in humanem Gewebe.

Stand 24.09.2021. Verwendete Abkürzung: NX Normalized eXpression.

(<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000118520-ARG1/tissue>).

Das Vorliegen von Diskrepanzen zwischen mRNA-Expressionsdaten und Protein-Expressionsdaten wurde vielfach beschrieben (Maier et al., 2009). Sowohl genetische Ursachen als auch differente Datenerhebungen führen zu diesem Phänomen. Viele posttranskriptionelle Faktoren, wie unter anderem die Stabilität der mRNA im Zytoplasma, können die effiziente Translation transkribierter mRNA beeinflussen (Preiss und Hentze, 1998, Schwartz und Parker, 1999, Lackner et al., 2007). Dies könnte eine inadäquate Translation und somit das Verbleiben des Genproduktes im mRNA Zustand erklären. Nach dem zentralen Dogma der molekularen Biologie geht der Bildung eines Proteins die Transkription einer RNA voraus (Crick, 1970). Das Vorliegen einer alleinigen Proteinexpression ohne nachgewiesene mRNA Expression könnte man auf inhärente Ungenauigkeiten der erhobenen Daten zurückführen. Die Erhebung der Proteinexpression fand mittels Immunhistochemie (IHC) statt. Falsch positive Ergebnisse können beispielsweise durch unspezifische Antigenbindungen entstehen (Yaziji und Barry, 2006). Zu hohe Antikörperkonzentration, zu dicke Gewebeschnitte oder auch Trockenartefakte gehören zu den häufigsten anwendungsbedingten Ursachen für falsch positive Färbeergebnisse. Falsch negative Ergebnisse können auf mangelhafte Gewebefixierung oder auch eine nicht auf den individuellen Antikörper abgestimmte Antigendemaskierung zurückgeführt werden (Gown, 2016).

In polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs) wird Arginase-1 in Granula gespeichert, welche bei der Phagozytose von Pathogenen mit dem Phagosom verschmelzen und dabei Arginase-1 freisetzen. Dem intraphagosomalen Milieu wird dann durch die katalytische Reaktion der Arginase-1 L-Arginin entzogen, was in der Abwehr, besonders L-Arginin auxotropher Mikroorganismen wie beispielsweise bestimmte *Candida albicans* Stämme, zur deren Untergang beiträgt (Munder et al., 2005). Im Rahmen von Entzündungen kommt es zu einer entzündungsinduzierten Immunsuppression, die exzessive Gewebedestruktion verhindern soll (Baniyash, 2004). PMNs, die bei entzündlichen Prozessen zugrunde gehen, geben Arginase-1 in das entzündliche Milieu frei und könnten damit an der durch L-Arginin Depletion ausgelösten Stilllegung der T-Lymphozyten beteiligt sein (Munder, 2009). T-Zellen benötigen L-Arginin für die Synthese des CD3 ζ (zeta) Komplex, der Teil des T-Zell Rezeptors ist (Rodriguez et al., 2003). Ohne T-Zell Rezeptor können T-Zellen keine Antigendiskriminierung durchführen und folglich keine T-Zellen aktivieren, die Sekretion von Zytokinen sowie die Differenzierung zu Effektorzellen bleibt aus (Rodriguez et al., 2003). Die Beteiligung der Arginase-1 bei der Limitation eitriger Entzündungen durch T-Zell Inhibition wurde bereits 2006 durch Munder et al. dokumentiert (Munder et al., 2006).

Neben der Bedeutung der Arginase-1 bei regulärer Expression im Normalgewebe werden bei diversen Krankheitsbildern Abweichungen der Normalexpression beobachtet (Caldwell et al., 2018). Bei Arginase-1 Mangel, einer seltenen autosomal rezessiven Erkrankung, kommt es durch Mutationen im ARG1 Gen zu Einschränkungen oder Funktionsverlust des Enzyms (loss of function mutation) (Vockley et al., 1996a). In der Folge leiden betroffenen Kinder an pathognomischen spastischen Paraparesen, Wachstumshemmung, geistiger Retardation und anderen primär der Hyperargininämie geschuldeten Symptomen (Cederbaum et al., 1977, Iyer et al., 1998). Erst sekundär kommt es zur Hyperammonämie, da eine Teilkompensation des Enzymdefekts durch die Arginase-2 stattfindet (Iyer et al., 1998). Betroffene haben unter Proteinrestriktion und medikamentöser Therapie keine verkürzte Lebenserwartung und zeigen je nach Diagnosezeitpunkt persistierende individuelle kognitive Einschränkungen (Sun et al., 1993).

Folgen einer Überexpression der Arginase-1 beziehungsweise einer gesteigerten Arginase Aktivität (gain of function mutation) sind seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung und lassen sich bei Betrachtung des L-Arginin Stoffwechsel im Mausmodell näher erklären. Außerhalb des Harnstoffzyklus konkurriert die Arginase unter anderem mit den Stickstoffsynthasen um ihr Substrat L-Arginin (Modolell et al., 1995).

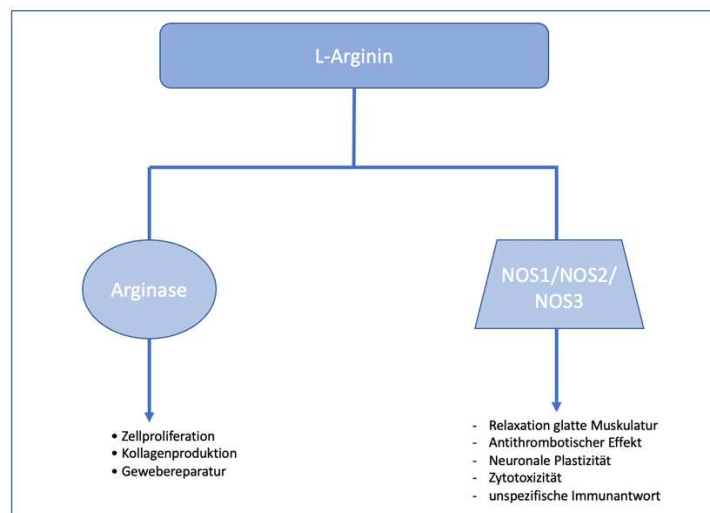


Abbildung 6: Vereinfachte Übersicht des kompetitiven L-Arginin Metabolismus außerhalb des Harnstoffzyklus. Verwendete Abkürzungen: NOS Stickstoffsynthase. Modifiziert nach (G et al., 2020).

Es existieren drei Isoformen der Stickstoffsynthase (NOS), von denen zwei, die neuronale NOS1 sowie die endotheliale NOS3 konstitutiv exprimiert werden (Rath et al., 2014). Die dritte Isoform, die induzierbare NOS2, wird unter anderem im Zuge der Immunantwort aktiviert (Daff, 2010). Die Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) setzen L-Arginin zu Stickstoffmonoxid (auch EDRF, endothelium derived relaxing factor) um, welches bei Freisetzung sowohl zum Erschlaffen der glatten Muskulatur führt (Wu et al., 2009) als auch

die Thrombozytenaggregation im Herz-Kreislauf-System hemmt (G et al., 2020, Liu und Huang, 2008). Neben seiner Funktion im kardiovaskulären System erfüllt das Stickstoffmonoxid weitere Funktionen im Rahmen der angeborenen Immunantwort bei der primären Pathogenelimination (Robbins und Grisham, 1997). Durch experimentelle Mausmodelle wurde bereits gezeigt, dass aktivierte Makrophagen L-Arginin über ihre NOS2 zu Stickstoffmonoxid (NO) verstoffwechseln, um die Zytotoxizität des NO im primären Angriff gegen Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen und Tumorzellen zu nutzen (MacMicking et al., 1997). Besonders bei gleichzeitiger Expression der Stickstoffsynthasen und der Arginase im selben Kompartiment kommt es durch die Konkurrenz um ihr Substrat L-Arginin zu Wechselwirkungen (Modolell et al., 1995).

In der Folge wird angenommen, dass eine Überexpression der Arginase-1 im Normalgewebe zum einen die Produktion von NO verringert, und damit das Persistieren von Pathogenen begünstigt, zum anderen zusätzlich auch durch vermehrte Bereitstellung von L-Ornithin zu Fibrosen und gesteigerter Zellproliferation führt (Minemura et al., 2009, Berkowitz et al., 2003). Tabelle 1 zeigt eine Auswahl an Pathologien, bei welchen eine erhöhte Arginase-1 Aktivität festgestellt wurde.

Tabelle 1: Auswahl an mit einem erhöhten Arginase-1 Level assoziierten Pathologien beim Menschen

Pathologie	Angenommener Zusammenhang	Referenz
Erektile Dysfunktion	Endotheliale Dysfunktion durch L-Arginin Entzug	(Lacchini et al., 2015)
COPD	Durch Tabakkonsum induzierte endotheliale Dysfunktion	(Henno et al., 2015)
Zystische Fibrose	Herabgesetzte Erschlaffung der glatten Muskulatur, Bronchodilatation und Pathogenabwehr	(Ingersoll et al., 2015)
Tuberkulose	Kollagenablagerung führen zu Entzündung, Inhibition der Typ1 T-Zellen	(Monin et al., 2015)
Chorea Huntington	Pathologische Harnstofflevel im Hirn führen zu Neurodegeneration	(Patassini et al., 2015)

Quelle : (G et al., 2020). Verwendete Abkürzungen: *COPD* chronisch obstruktive Lungenerkrankung. Gezeigt wird lediglich eine Auswahl, kein Anspruch auf Vollständigkeit.

1.2.3 Bedeutung in Tumorgeweben

Die Arginase-1 Expression der Leberzellen bleibt auch in hepatozellulären Karzinomen erhalten und wird bereits seit über zehn Jahren in der Immunhistochemie zur Differenzierung von hepatozellulären Karzinomen und Lebermetastasen als Tumormarker verwendet (Yan et al., 2010). In der Literatur werden auch andere Arginase-1 positive Tumorgewebe beschrieben: Neben Cholangiokarzinomen (Iida et al., 2011, Zhao et al., 2018, Yan et al., 2010) und Ampulla Vateri Karzinomen (Lagana et al., 2015a, Lagana et al., 2015b) werden auch kolorektale Adenokarzinome (Ren et al., 2019, Ma et al., 2019) sowie Mammakarzinome (Ming et al., 2020) mit teils uneinheitlichen Ergebnissen bezüglich ihrer Arginase-1 Expression beschrieben. Einzelne Veröffentlichungen geben außerdem eine Expression in oralen Plattenepithel- und Larynxkarzinomen (Srivastava und Ghosh, 2015), Hypophysenadenomen (Zhao et al., 2020), Ovarialkarzinomen (Czystowska-Kuzmicz et al., 2019) sowie Angiosarkomen und anderen Weichteiltumoren (Yan et al., 2011) an. Abbildung 6 zeigt eine Übersicht der mRNA Expression in verschiedenen Tumorentitäten aus dem Human Protein Atlas.

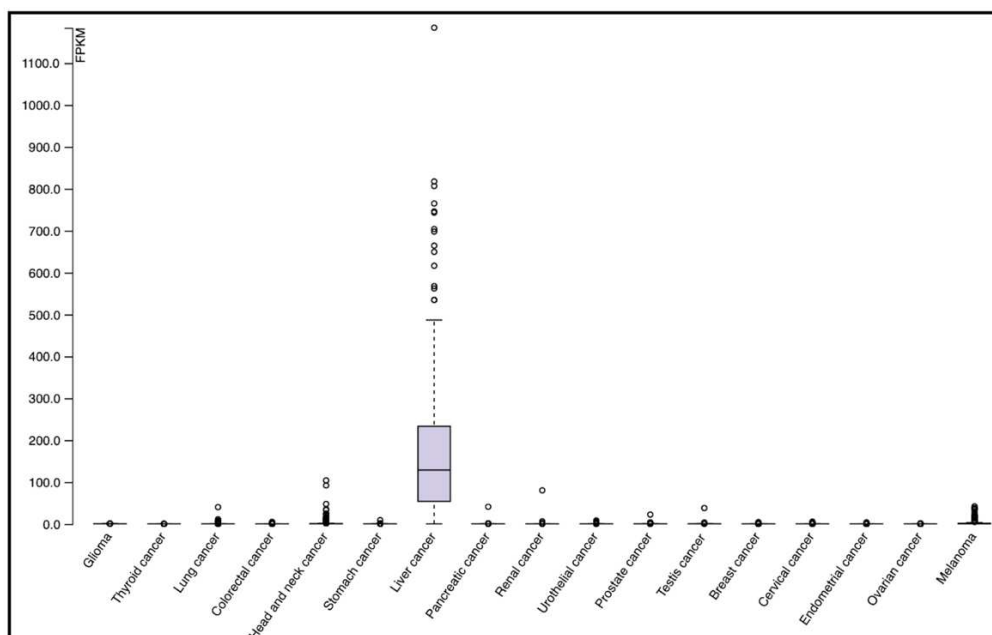


Abbildung 7: mRNA Expression der Arginase-1 in verschiedenen Tumorentitäten. Verwendete Abkürzung: FPKM Fragments per Kilobase of exon per million reads. Generiert aus dem Datensatz des The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network (<https://www.cancer.gov/tcga>). Abbildung entnommen aus The Human Protein Atlas, Stand 24.09.2021 (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000118520-ARG1/pathology>).

Arginase-1 dürfte auch eine Rolle im Tumormikroenvironment (TME) spielen, da granulozytäre myeloide Suppressorzellen (MDSC) ebenfalls Arginase-1 exprimieren (Bronte et al., 2016, Vonwirth et al., 2020). MDSCs stellen eine heterogene Gruppe unreifer myeloischer Zellen dar (Abbildung 8), die im Kontext von Tumorerkrankungen ins TME rekrutiert werden und maßgeblich an der Immunevasion von Tumoren beteiligt sind (Dysthe und Parihar, 2020).

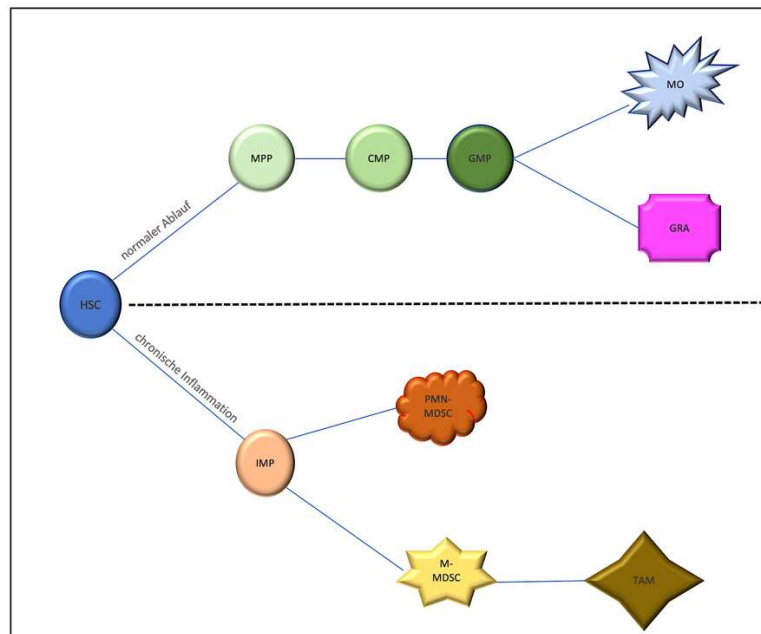


Abbildung 8: **Myelopoese Übersicht.** Normaler Ablauf der Myelopoese unter Bildung der Zellen des angeborenen Immunsystems (oben) versus Ablauf der Myelopoese unter chronischer Inflammation bei Tumorpatienten unter Einwirkung des löslichen Tumornekrosefaktors sTNF (unten). Verwendete Abkürzungen: *HSC* Hämatopoetische Stammzelle; *MPP* Multipotente Vorläuferzelle; *CMP* myeloische Stammzelle; *GMP* Granulozyten-Monozyten Vorläufer; *MO* Monozyt; *GRA* Granulozyt; *IMP* unreife myeloische Vorläuferzelle; *PMN-MDSC* polymorphkernige myeloide Suppressorzelle; *M-MDSC* monozytische myeloide Suppressorzelle; *TAM* Tumorassoziierte Makrophage. Modifiziert nach (Tesi, 2019).

Auch wenn die genaue Funktion der Arginase-1 in MDSC bis dato noch nicht vollständig geklärt ist, gilt die Arginin-Depletion durch das Enzym als wichtiger Weichensteller in der MDSC vermittelten Immunevasion (Steggerda et al., 2017, Grzywa et al., 2020). Im Mausmodell sind MDSC essenziell für die Aufrechterhaltung des TME. Nur in ihrer Abwesenheit kann eine immunologische Antwort auf das Tumorgewebe stattfinden (Blidner et al., 2015, Waigel et al., 2016). Eine hohe Frequenz an MDSC im peripheren Blut von Krebspatienten¹ wurde bereits mit einer schlechteren Prognose für Kopf-Hals-Tumoren (Lang et al., 2018) sowie bei der Progression von multiplen Myelomen (Romano et al., 2018) beschrieben.

¹ zur Vereinfachung des Leseflusses wird im Folgenden das generische Maskulinum bei personenbezogenen Substantiven und Pronomen verwendet. Dies soll als geschlechterneutral aufgefasst werden und keinesfalls die Benachteiligung eines anderen Geschlechtes implizieren.

Für Patienten mit kolorektalen Tumoren konnten Ma et al. 2019 eine positive Korrelation der Arginase-1 Expression mit fortgeschrittenen klinischen Stadien (UICC III-IV) sowie dem Auftreten lymphatischer Metastasen feststellen (Ma et al., 2019). Romano et al. postulierten 2016, dass die Immunsuppression bei Hodgkin Lymphomen durch erhöhte Arginase-1 Aktivität zustande kommt und diese darüber hinaus als spezifischer Marker verwendet werden kann, um den Status der T-Zell Suppression und damit die aktuelle Tumoraktivität prognostisch einzustufen: Ein hohes Arginase-1 Level wurde hier signifikant mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben korreliert (Romano et al., 2016). Auch bei Ovarialkarzinomen konnte eine hohe Arginase-1 Expression in den Zusammenhang mit einem vermindertem Gesamtüberleben gestellt werden (Czystowska-Kuzmicz et al., 2019). In Mammakarzinomzellen hingegen wird eine tumorsuppressive Funktion für Arginase-1 angenommen, ihre Expression wurde mit einer besseren Prognose verbunden (Ming et al., 2020).

1.3 Klinische Bedeutung in der Tumorthherapie

Die dargestellte Bedeutung der Arginase-1 in Tumorgeweben legt nahe, diese als pharmakologischen Ansatzpunkt in der Tumorthherapie zu nutzen. Verschiedene Pharmaka mit Einwirkungen auf den L-Arginin Metabolismus wurden bereits im präklinischen Rahmen und teilweise auch in klinischen Studien erprobt (Caldwell et al., 2018). Hier zeigt sich, dass in Abhängigkeit des untersuchten Tumorgewebes sowohl eine Inhibition als auch eine Förderung der Arginase-1 Aktivität von therapeutischem Nutzen sein kann (Albaugh et al., 2017). Eine Auswahl ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Auswahl an Pharmaka zur Beeinflussung der Arginase-1 Aktivität in Tumorgeweben

A: Reduktion der MDSC und Inhibition der Arginase-1 Aktivität
<ul style="list-style-type: none">• <i>Arginase Inhibitoren</i><ul style="list-style-type: none">- INCB001158 verhindert die Unterdrückung der T-Zell Proliferation und das Tumorwachstum im Mausmodell (Steggerda et al., 2017) und befindet sich aktuell in der klinischen Phase II einer Studie zu Einzel- sowie auch Kombinationstherapie mit dem PD-1 Inhibitor (Keytruda) bei fortgeschrittenen soliden Tumoren (ClinicalTrials.gov, 2021).• <i>Phosphodiesterase-5 Hemmer</i><ul style="list-style-type: none">- Sildenafil fördert die intratumorale T-Zell Infiltration und Aktivierung der T-Zellen und reduziert das Tumorwachstum im Mausmodell (Serafini et al., 2006).- Tadalafil verbessert die Antitumor Immunität bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals Bereich in einer klinischen Phase II Studie (Califano et al., 2015).
B : Reduktion der L-Arginin Verfügbarkeit durch Supplementation von Arginase-1
<ul style="list-style-type: none">• <i>Pegylierte Arginase-1</i><ul style="list-style-type: none">- humane Adenokarzinomzellen des Ovars, Gabe von pegylierter humaner rekombinanter Arginase-1 (HuArgI(co)-PEG5000) stimuliert die Autophagie der Tumorzellen in Zelllinien (El-Mais et al., 2021).- humane Kolorektalkarzinom Zelllinien, Gabe von pegylierter humaner rekombinanter Arginase-1 (HuArgI(co)-PEG5000), welche sich zytotoxisch auf die Zellen auswirkte und deren Autophagie aktiviert (Swayden et al., 2021).- humane Pankreaszellkarzinom Zelllinien, Gabe von pegylierter humaner rekombinanter Arginase-1 (HuArgI(co)-PEG5000) führt zu Autophagie (Khalil und Abi-Habib, 2020).

Quellen : Modifiziert und ergänzt nach (Caldwell et al., 2018), (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02903914?term=NCT02903914&draw=2&rank=1>).
Kein Anspruch auf Vollständigkeit.

Die Analyse der Genetik sowie die Typisierung von Tumorgeweben in der Tumorthherapie wird immer gebräuchlicher (Albaugh et al., 2017). Das Einwirken auf die Arginase im Zuge der Tumorthherapie scheint eine spezifische, effiziente Therapieoption mit einem minimierten Nebeneffektprofil darzustellen, welcher jedoch primär ein mRNA Expressionsprüfung im Tumorgewebe auf das entsprechende Enzym vorausgehen sollte (Kumari und Bansal, 2021).

1.4 Klinische Bedeutung in der Diagnostik (Pathologie)

Ungefähr zehn Prozent aller malignen Tumoren äußern sich erstmals als Metastasen, welche in der Regel biopsiert und dann von einem Pathologen untersucht werden (Elsheikh und Silverman, 2019, Haskell et al., 1988). Die histologischen Charakteristika von Tumoren erlauben per se nur selten eine eindeutige Organzuordnung, sodass die Pathologen häufig immunhistochemische Sonderverfahren in Anspruch nehmen zum Nachweis gewebebeziehungsweise tumorspezifischer Proteine (Lin und Liu, 2014). Arginase-1 ist in dieser Hinsicht von Bedeutung, da das Protein ganz überwiegend im Lebergewebe exprimiert wird. Der Nachweis einer Arginase-1 Expression in einem Tumor spricht somit am ehesten für ein hepatozelluläres Karzinom. Insbesondere bei Lebertumoren, bei welchen differentialdiagnostisch aufgrund der hohen Häufigkeit immer auch Lebermetastasen zur Diskussion stehen, hilft die Arginase-1 Immunhistochemie bei der Abgrenzung von hepatozellulären Karzinomen versus cholangiozellulären Karzinomen oder Metastasen (Yan et al., 2010). Zahlreiche Untersuchungen haben die Arginase-1 Expression in verschiedenen Tumortypen immunhistochemisch untersucht. Die Ergebnisse der 29 aussagekräftigsten Studien, welche insgesamt 36 verschiedenen Tumortypen untersucht haben, sind in Abbildung 9 dargestellt.

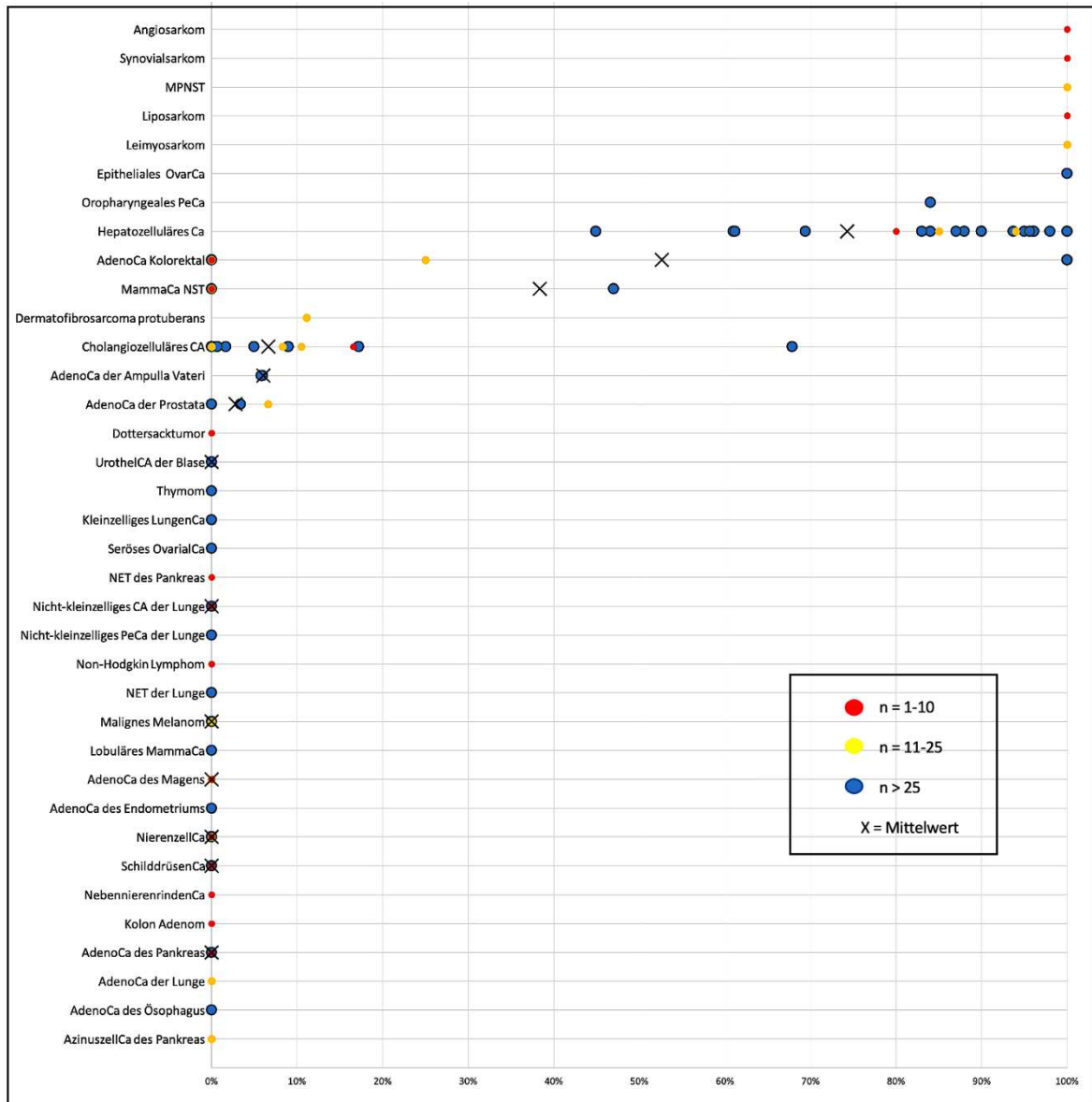


Abbildung 9: Übersicht aktueller Studienergebnisse zur Arginase-1 Immunhistochemie. Auf der Y-Achse finden sich Tumorentitäten nach absteigender Positivität, auf der X-Achse die prozentuale Positivität von 0-100%. Rote Punkte zeigen Veröffentlichungen mit unter zehn Fallzahlen, gelbe Punkte 11-25 Fallzahlen und blaue Punkte Fallzahlen von über 25. Bei Entitäten die in mehr als einer Veröffentlichung untersucht wurden zeigen die Kreuze die durchschnittliche Positivität aller Ergebnisse an. Verwendete Abkürzungen: Ca Karzinom; PeCa Plattenepithelkarzinom; NET neuroendokriner Tumor; NST nicht-speziieller Typ. Literaturverweise zu den Daten siehe Tabelle 12. Kein Anspruch auf Vollständigkeit.

Die Darstellung bestätigt das besonders häufige Auftreten einer Arginase-1 Positivität bei Leberzellkarzinomen. Sie zeigt aber auch, dass die Literaturdaten teilweise außerordentlich diskrepanz sind. So finden sich beispielsweise für invasive Mammakarzinome Positivitäten von 0 % bis 47 % (Obiorah et al., 2019, Sang et al., 2015, Yan et al., 2010, Ming et al., 2020), für cholangiozelluläre Karzinome von 0 % bis 67,9 % (Obiorah et al., 2019, Lagana et al., 2015b, Radwan und Ahmed, 2012, Timek et al., 2012, Yan et al., 2010, Iida et al., 2011), für kolorektale Adenokarzinomen 0 % bis 100 % (Obiorah et al., 2019, Yan et al., 2010, Ma et al., 2019, Ren et al., 2019) und selbst für hepatozelluläre Karzinome finden sich Angaben von 44,9 % bis 100 % (Lu et al., 2021, Obiorah et al., 2019, Labib et al., 2020, Zhao et al., 2018, Clark et al., 2017, Ye et al., 2013, Yan et al., 2010). Diese Diskrepanzen sind sehr wahrscheinlich bedingt durch die Verwendung unterschiedlicher Antikörper, Färbeprotokolle und Auswertekriterien in den verschiedenen zitierten Studien. Zur besseren Einordnung der diagnostischen Bedeutung einer Arginase-1 Positivität in verschiedenen Tumorarten wäre es also sinnvoll, eine große Zahl von Tumoren aller möglichen Tumorentitäten unter standardisierten Bedingungen mit einem validierten Antikörper zu untersuchen.

Um diese Forderung zu erfüllen wurden in der vorliegenden Studie insgesamt 12 047 verschiedene Tumoren von 117 verschiedenen Tumortypen und Subtypen sowie 608 Normalgewebe von 76 verschiedenen Normalgewebekategorien in einem Tissue-Microarray Format auf die Expression von Arginase-1 untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Tissue-Microarray Technik

Das Tissue-Microarray (TMA) Verfahren erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von hunderten von Gewebeproben auf einem Objektträger (Kononen et al., 1998). Dies ermöglicht nicht nur eine massive Beschleunigung von Studien, sondern führt auch zu einer enormen Kostenreduzierung (Mengel et al., 2003). Allein die Reagenzien für die immunhistochemische Untersuchung eines Gewebeschnittes kosten mindestens fünf Euro. Können 600 Tumoren auf einem Schnitt immunhistochemisch untersucht werden, reduzieren sich somit die Reagenzien Kosten von 3 000 Euro ($600 \cdot 5$) auf fünf Euro. Auch die für eine Tissue-Microarray Studie notwendige Manpower ist im Vergleich zu traditionellen Studien deutlich reduziert. Eine Studie, die 15 000 Tumoren umfasst, benötigt die Untersuchung von lediglich 30–40 Schnitten. Diese TMA Schnitte können an einem Tag hergestellt werden, am anderen Tag gefärbt und danach innerhalb von zwei Tagen von einem Pathologen ausgewertet werden.

Dazu kommt als weiterer Vorteil eine einzigartige Standardisierung, welche weit über die theoretisch auch durch Färbeautomaten zu erreichenden identischen Färbebedingungen der einzelnen Schnitte hinausgeht (Simon et al., 2004). Standardisiert sind auch Parameter wie das Schnittalter und die pro Patient untersuchte Tumormenge. Studien haben gezeigt, dass die Zahl der positiv gefärbten Fälle mit dem Schnittalter (Zeit zwischen dem Herstellen eines Gewebeschnittes und Durchführung der immunhistochemischen Färbung) oft deutlich abnimmt (Mirlacher et al., 2004) und mit der Menge des untersuchten Gewebes zunimmt (Torhorst et al., 2001).

Die Vorteile der Tissue-Microarray Technik werden durch einen erheblichen Aufwand bei der Herstellung der TMA Blöcke „erkaufte“ (Bubendorf et al., 2001). Die TMA Herstellung beginnt mit der Identifizierung potenziell geeigneter Fälle, was beispielsweise durch eine Volltextsuche im Pathologie-Informationssystem erfolgt. Die primär identifizierten Fälle eines bestimmten Tumortyps werden dann zunächst händisch vorgescreent, um bereits eindeutig nicht brauchbare Fälle auszuschließen. Dies sind Fälle mit unklarer Diagnose, eindeutig geringer Tumormenge im Präparat oder ausgedehnten regressiven Veränderungen beziehungsweise Nekrosen. Von den verbliebenen geeigneten Fällen werden dann alle vorhandenen Schnitte herausgesucht und von einem Pathologen beurteilt. Falls die Tumormenge für die TMA Herstellung groß genug erscheint ($\geq 1 \text{ cm}^2$) wird der Tumor am Hämatoxylin-Eosin (HE) Schnitt mit Filzstift markiert und es werden in der Folge die entsprechenden Paraffinblöcke der markierten Schnitte herausgesucht. Auch die Paraffinblöcke werden auf ihre Eignung für die TMA Herstellung untersucht. Ausgeschlossen werden beschädigte oder zu „dünne“ Blöcke, welche beispielsweise weniger als zwei Millimeter tief sind. Zu dünne Blöcke sind für die TMA Herstellung wenig geeignet, da nur kurze Gewebestangen aus ihnen entnommen werden können.

Zum Abschluss des Tumor-Identifikationsprozesses werden alle geeigneten Tumoren in eine Liste eingetragen, in der gleichzeitig auch die Positionen im herzustellenden TMA festgelegt werden. Die Organisation der UKE TMAs ist standardisiert. Die TMA Blöcke bestehen aus sechs Sektoren, welche asymmetrisch und ungleich groß sind um immer eine eindeutige Orientierung der Sektoren zu ermöglichen. Die sechs Sektoren werden mit Großbuchstaben (A-F) definiert. In jedem Sektor werden die Zeilen mit Zahlen und die Spalten mit Kleinbuchstaben von a bis maximal r gekennzeichnet. Eine schematische Darstellung des TMA Aufbaus ist in Abbildung 10 dargestellt.

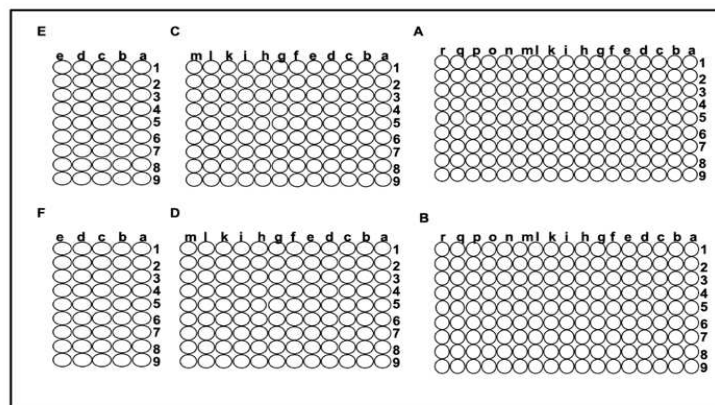


Abbildung 10: TMA Aufbau UKE

Die bisher so nicht dagewesene Konformität mit Datenschutzrichtlinien ist ein weiterer Vorteil der TMA Methode. Die bereits einer Pseudonymisierung entsprechenden Biopsienummern aus dem Pathologie-Informationssystem, welche bei der Herstellung der TMA Blöcke verwendet werden, könnten, wenn es einem Hacker gelänge in das Pathologie-Informationssystem einzubrechen, theoretisch zur Identifikation von Klarnamen führen. Diese Biopsienummern werden nach dem Abschluss des Herstellungsprozesses entweder ausgeblendet (Pseudonymisierung), oder aber permanent gelöscht (Anonymisierung). In beiden Fällen entsteht ein TMA Datenfile, in dem die einzelnen Gewebefragmente und die daran erhobenen molekularen Befunde über eine definierte Koordinate einem klinisch pathologischen Datensatz zugeordnet werden. Ein Beispiel eines TMA Datensatzes ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: TMA Datenfile

Array-Block	Koordinate	Entität	LIV-TMA					
			pT	pN	Grading	L-Status	V-Status	R-Status
...
B	D1a	Hepatozelluläres Karzinom	pT1	pN0	G2	L0	V0	R0
B	D1b	Hepatozelluläres Karzinom	pT1	pN0	G2	L0	V0	R0
B	D1c	Hepatozelluläres Karzinom	pT1	pN0	G2	L0	V0	R0
B	D1d	Hepatozelluläres Karzinom	pT1	pN0	G2	L0	V0	R0
B	D1e	Hepatozelluläres Karzinom	pT1	pN0	G2	L0	V0	R0
B	D1f	Hepatozelluläres Karzinom	pT1	pN0	G2	L0	V0	R0
B	D1g	Hepatozelluläres Karzinom	pT1	pN0	G2	L0	V0	R0
B	D1h	Hepatozelluläres Karzinom	pT1	pN0	G2	L0	V0	R0
...

Die Herstellung der TMAs erfolgt mit einem durch Mitarbeiter des Institutes für Pathologie entwickelten semi-automatischen Tissue-Microarrayer, dessen Kernelement eine mechanische Vorrichtung darstellt, welche es erlaubt, an einer genau definierten Position wahlweise einen Bohrer oder aber eine Hohlzahn zum Einsatz zu bringen. Zudem verfügt die Einrichtung über speziell entwickelte Blockhalter, die es ermöglichen bis zu sechs Empfänger-Paraffinblöcke einzulegen. Die Vorrichtung erlaubt das Wechseln der Blöcke auf eine Art, die sicherstellt, dass alle Blöcke immer in identischer Position unter dem Hohlzahn/Bohrer System zu liegen kommen. Ein TMA-Herstellungsgesetz ist in Abbildung 11 dargestellt.

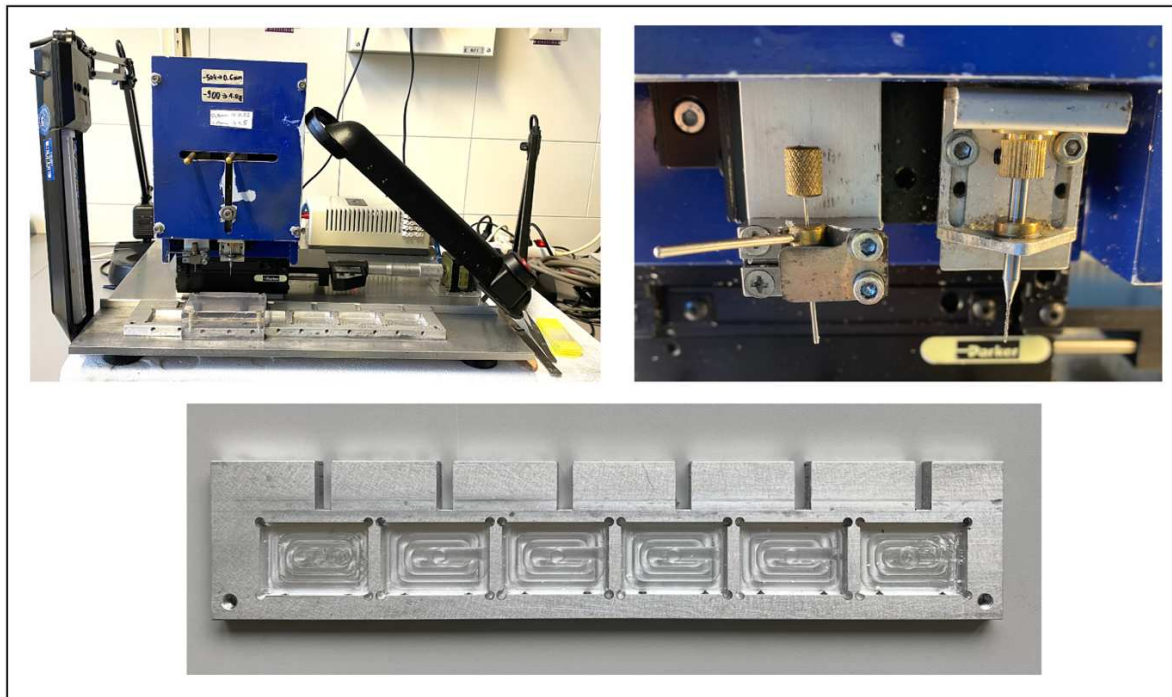


Abbildung 11: **TMA Arrayer.** Oben links ist ein TMA Herstellungsgesetz, oben rechts sind Hohlzahn und Bohrer abgebildet. Das untere Bild zeigt einen leeren Blockhalter, welcher sechs Empfängerblöcke aufnehmen kann.

Der Herstellungsprozess beginnt mit dem Bohren eines Loches mit einem äußeren Durchmesser von 0,6 mm. Danach wird ein „Abdeckpodest“ über den Empfängerblock gelegt, welches den Zweck hat eine Beschädigung des Blockes beim nächsten Arbeitsschritt zu verhindern. Auf das Abdeckpodest wird der zu stanzende Spender-Tumorblock gelegt und unter Abgleich der Blockoberfläche und des eingezeichneten HE Schnittes mit der Hohlzahn ein zylindrisches Gewebefragment aus dem tumorhaltigen Blockbereich entnommen. Der innere Durchmesser der Hohlzahn beträgt 0,6 mm, sodass das Gewebefragment exakt in das vorgefertigte Loch im Empfänger-Paraffinblock passt. Nach Entfernung von Block und Podest wird das zylindrische Gewebefragment in das vorgefertigte Loch eingebracht, wobei das Gewebefragment mit einem Draht aus der Nadel gestoßen wird.

Der Prozess wird für alle geplanten Replikatblöcke des TMAs wiederholt, wobei immer aus demselben Tumor eine weitere Stanze entnommen wird und in einen anderen Empfängerblock eingebracht wird. Sind alle Empfängerblöcke mit einem bestimmten Tumor befüllt, wird die Position der Hohnadel-/Bohrvorrichtung durch einen elektrischen Schrittmotor automatisch auf die nächste Koordinatenposition gebracht und der Prozess beginnt von vorne. Die einzelnen Prozessschritte der TMA Herstellung sind in Abbildung 12 dargestellt.

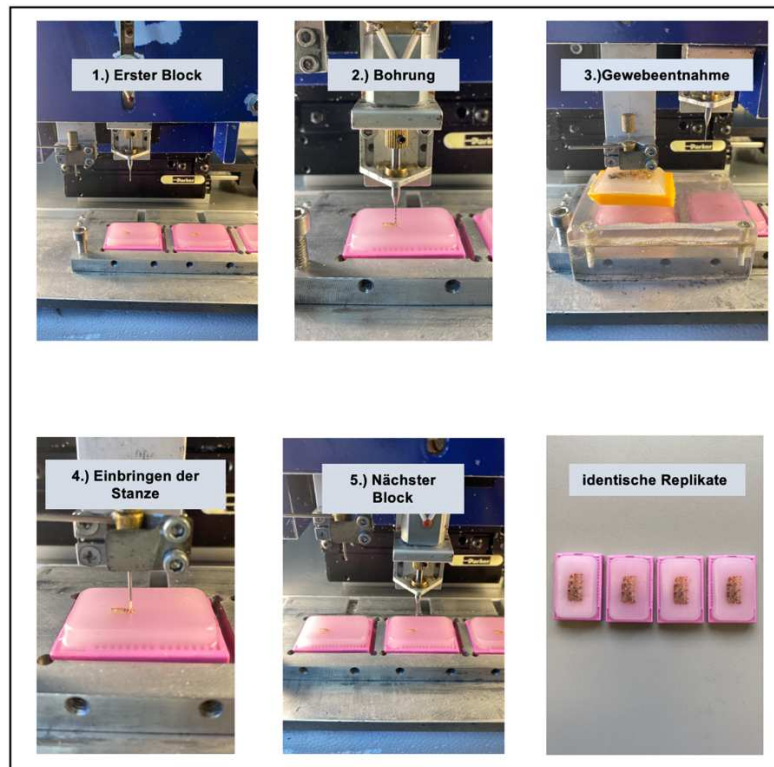


Abbildung 12: Prozessschritte der TMA Herstellung.

2.2 Für die Studie verwendete TMA-Blöcke

Für das vorliegende Projekt wurden zwei Typen von TMAs verwendet. Der Normalgewebe TMA beinhaltet jeweils acht Proben von acht verschiedenen Patienten von 76 verschiedenen Organkategorien. Die Anzahl von acht wurde aus verschiedenen Gründen gewählt. 1) Es ist möglich, dass einzelne Gewebe wegen Fixations- oder anderen Verarbeitungsproblemen geschädigt sind und deswegen eine abnormale Immunreaktivität aufweisen. 2) Es gibt Strukturen, die auf einer einzelnen 0,6 mm Stanze nicht immer abgebildet sind. Dazu gehören Langerhans-Inseln im Pankreas oder Glomeruli in der Niere. 3) Es gibt Proteine, welche interindividuelle Expressionsschwankungen aufweisen. Dazu gehören beispielsweise Blutgruppenproteine (Jacoby et al., 2012). Die genaue Zusammensetzung des Normalgewebe-Arrays ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Normalgewebe-Array

Zusammensetzung des Normalgewebe TMAs: Organ, Gewebe			
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 parotidea
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, Brunnerdrüse
10.	Ileum, muskuläre Wand	48.	Niere, Kortex
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.	Nebenhoden
15.	Ovar, Stroma	53.	Hoden
16.	Fettgewebe	54.	Bronchus, Mukosa
17.	Haut	55.	Bronchialdrüse
18.	Haut, Haarfollikel, Talgdrüse	56.	Sinus paranasales
19.	Lippe, Mundschleimhaut	57.	Lunge
20.	Mundhöhle	58.	Mamma
21.	Tonsille, Oberflächenepithel	59.	Endozervix
22.	Analkanal, Zona cutanea	60.	Endometrium, Proliferationsphase
23.	Analkanal, Zona transitionalis	61.	Endometrium, Sekretionsphase
24.	Ektozervix	62.	Tuba uterina, Mukosa
25.	Ösophagus, Plattenepithel	63.	Unreife Plazenta, Dezidua
26.	Nierenbecken, Urothel	64.	Ovar, Corpus luteum
27.	Harnblase, Urothel	65.	Ovar, folliculäre Zyste
28.	Ausgereifte Plazenta mit Amnion und Chorion	66.	Unreife Plazenta
29.	Lymphknoten	67.	Reife Plazenta
30.	Milz	68.	Nebennierenrinde
31.	Thymus	69.	Nebenschilddrüse
32.	Tonsille	70.	Schilddrüse
33.	Magen, Antrum	71.	Kleinhirn, Stratum moleculare
34.	Magen, Corpus	72.	Kleinhirn, Stratum neuronorum
35.	Duodenum, Mukosa	73.	Großhirn, Rinde
36.	Ileum, Mukosa	74.	Großhirn, Mark
37.	Appendix, Mukosa	75.	Hypophyse, Hinterlappen und Infundibulum
38.	Colon descendens, Mukosa	76.	Hypophyse, Vorderlappen

Der Multitumor-TMA besteht aus 14 912 Tumoren von insgesamt 117 verschiedenen Tumortypen und Subtypen. Die genaue Zusammensetzung des Tumor TMAs ist in Tabelle 5 dargestellt. Von 454 Plattenepithelkarzinomen standen aus früheren Studien Daten zum Humanen Papillomvirus (HPV) Status zu Verfügung. Von 594 Plattenepithelkarzinomen waren Daten zum histologischen Grad, von 469 Plattenepithelkarzinomen zum pN Stadium und von 635 Plattenepithelkarzinomen zum pT Stadium vorhanden. Die Verwendung von archiviertem diagnostischem Restgewebe für die TMA-Herstellung, ihre Analyse für Forschungszwecke und die Patientendaten entsprachen den örtlichen Gesetzen (HmbKHG, §12) und die Analyse wurde von der örtlichen Ethikkommission genehmigt (Ethikkommission Hamburg, WF-049/09). Alle Arbeiten wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

Tabelle 5: Zusammensetzung Multitumor-Array

Organsystem	Entitäten/Subentitäten	Fallzahl
Tumoren der Haut	Pilomatrixom	35
	Basalzellkarzinom	88
	Nävuszellnävus	29
	Plattenepithelkarzinom der Haut	90
	Malignes Melanom	48
	Merkelzellkarzinom	46
Kopf-Hals-Tumoren	Plattenepithelkarzinom des Larynx	110
	Plattenepithelkarzinom des Pharynx	60
	Orales Plattenepithelkarzinom (Mundboden)	130
	Pleomorphes Adenom der Parotis	50
	Warthin-Tumor der Parotis	49
	Basalzelladenom der Speicheldrüsen	15
Tumoren der Lunge, Pleura und des Thymus	Adenokarzinom der Lunge	196
	Plattenepithelkarzinom der Lunge	80
	Kleinzelliges Lungenkarzinom	16
	Epitheloides Mesencheliom	39
	Andere Mesencheliome	76
	Thymom	29

Tumoren des weiblichen Genitaltrakts	Plattenepithelkarzinom der Vagina	78
	Plattenepithelkarzinom der Vulva	130
	Plattenepithelkarzinom der Zervix	129
	Endometrioides Endometriumkarzinom	236
	Seröses Endometriumkarzinom	82
	Karzinoid des Uterus	48
	Endometriumkarzinom, high grade G3	13
	Klarzelliges Endometriumkarzinom	8
	Endometrioides Ovarialkarzinom	110
	Seröses Ovarialkarzinom	559
	Muzinöses Ovarialkarzinom	96
	Klarzelliges Ovarialkarzinom	50
	Karzinoid des Ovars	47
	Brenner Tumor	9
Tumoren der Mamma	Mammakarzinom NST	1345
	Lobuläres Mammakarzinom	293
	Medulläres Mammakarzinom	26
	Tubuläres Mammakarzinom	27
	Muzinöses Mammakarzinom	58
	Phylloides Tumor	50
Tumoren des Verdauungstraktes	Kolonadenom, niedriger Dysplasiegrad	50
	Kolonadenom, hoher Dysplasiegrad	50
	Adenokarzinom des Kolon	1882
	Magenadenokarzinom, diffuser Typ	176
	Magenadenokarzinom, intestinaler Typ	174
	Magenadenokarzinom, gemischter Typ	62
	Adenokarzinom des Ösophagus	83
	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	75
	Plattenepithelkarzinom des Analkanals	89
	Cholangiozelluläres Karzinom	113
	Hepatozelluläres Karzinom	50
	Duktales Pankreas Adenokarzinom	612
	Pankreas/Ampulla Vateri Adenokarzinom	89
	Azinuszellkarzinom des Pankreas	16
Gastrointestinale Stromatumoren (GIST)	50	

Fortsetzung Tabelle 5: Zusammensetzung Multitumor-Array

Tumoren der Harnwege	Urothelkarzinom, pT2-4 G3	1206
	Kleinzelliges neuroendokrines Blasenkarzinom	20
	Sarkomatoides Urothelkarzinom	25
	Klarzelliges Nierenkarzinom	857
	Papilläres Nierenzellkarzinom	255
	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	21
	Chromophobes Nierenzellkarzinom	131
	Onkozytom	177
	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 Pankreaskarzinom	19
	Seminom	621
	Keimzelltumor des Hodens	50
	Dottersacktumor	50
	Teratom	50
Plattenepithelkarzinom des Penis	80	
Endokrine Tumoren	Adenom der Schilddrüse	114
	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	392
	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	154
	Medulläres Schilddrüsenkarzinom	111
	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	45
	Nebennierenrindenadenom	50
	Nebennierenrindenkarzinom	26
	Phäochromozytom	50
	Neuroendokriner Tumor des Appendix	22
	Kolorektaler Neuroendokriner Tumor	12
	Neuroendokriner Tumor des Ileum	49
	Neuroendokriner Tumor der Lunge	19
	Neuroendokriner Tumor des Pankreas	97
	Kolorektales Neuroendokrines Karzinom	12
	Neuroendokrines Karzinom der Gallenblase	4
	Neuroendokrines Karzinom des Pankreas	14

Fortsetzung Tabelle 5: Zusammensetzung Multitumor-Array

Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes	Hodgkin Lymphom	103
	Kleinzelliges lymphozytisches B-Zell Lymphom	50
	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom	114
	Folikuläres Lymphom	88
	T-Zell Non Hodgkin Lymphom	24
	Mantelzell-Lymphom	18
	Marginalzonenlymphom	16
	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom des Hoden	16
	Burkitt Lymphom	5
Weichteil- und Knochentumoren	Tenosynovialer Riesenzelltumor	45
	Granularzelltumor	53
	Leiomyom	50
	Leiomyosarkom	87
	Liposarkom	132
	Maligner peripherer Nervenscheidentumor	13
	Myofibrosarkom	26
	Angiosarkom	73
	Angiomyolipom	91
	Dermatofibrosarcoma protuberans	21
	Ganglioneurom	14
	Kaposi Sarkom	8
	Neurofibrom	117
	Undifferenzierte Sarkome	74
	Paragangliom	41
	Primitiver neuroektodermaler Tumor	23
	Rhabdomyosarkom	6
	Schwannom	121
	Synovialsarkom	12
	Osteosarkom	43
Chondrosarkom	38	

Fortsetzung Tabelle 5: Zusammensetzung Multitumor-Array

2.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren zur Visualisierung von individuellen Proteinen an Gewebeschnitten. Sie ist ein in allen Pathologie Instituten der westlichen Welt täglich angewendetes Routineverfahren, welches für die genaue Klassifizierung von Tumoren und anderen Erkrankungen einen zentralen Bestandteil darstellt. Etwas vereinfacht beinhaltet das Verfahren zunächst eine Inkubation des Gewebes mit einem Antikörper gegen das Zielprotein, wobei sich der Antikörper an das Zielprotein bindet. Überschüssiger, nicht gebundener Antikörper wird danach gewaschen. Da der Antikörper an sich farblos ist, muss für die Visualisierung der Bindung ein zweiter Schritt angewendet werden. Hierzu werden in den meisten Fällen Sekundärantikörper verwendet, welche gekoppelt sind an ein Detektionssystem. Die Sekundärantikörper richten sich gegen den Fc-Teil der Primärantikörper. Damit dies möglich wird, müssen Primär- und Sekundärantikörper in unterschiedlichen Spezies erzeugt worden sein. Das Prinzip der immunhistochemischen Darstellung von Proteinen ist in Abbildung 13 schematisch dargestellt.

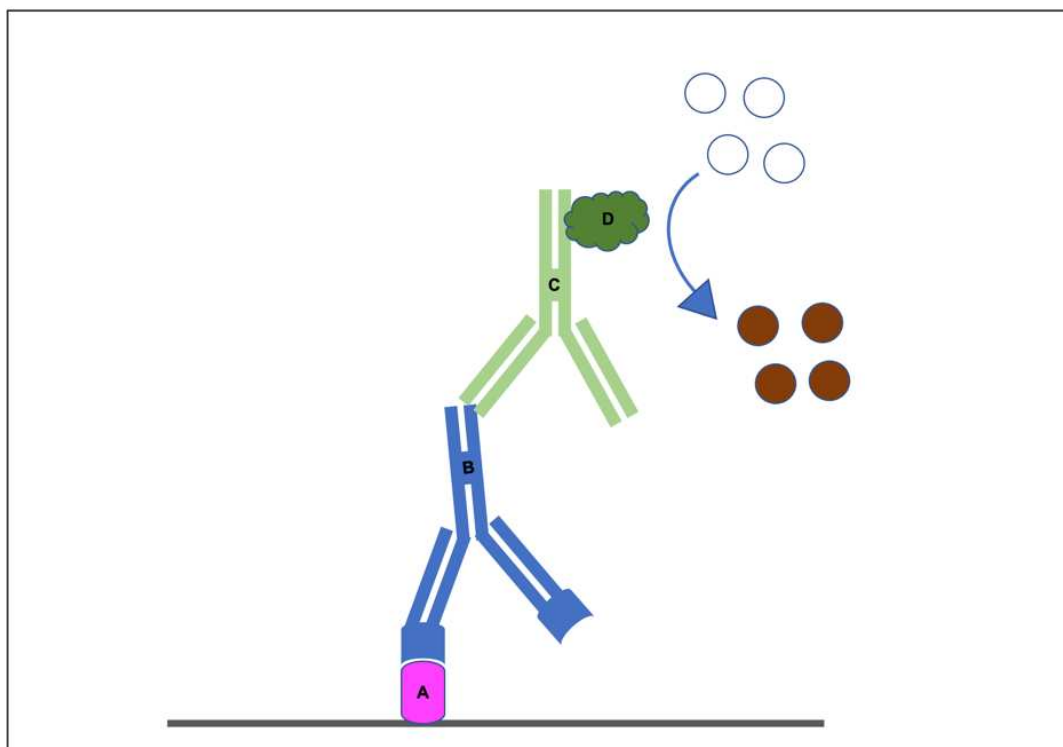


Abbildung 13: **Immunhistochemische Proteindetektion.** A Zielantigen, B Primärantikörper mit spezifischer Antigenbindungsstelle, C Sekundärantikörper mit gebundenem D Detektionssystem.

Aus praktischer Sicht bestehen für die Durchführung immunhistochemischer Untersuchungen mehrere relevante Probleme.

1) Antikörper. Auch kommerziell erhältliche und IVD (in vitro Diagnostika) zertifizierte Antikörper unterliegen einer erheblichen Variabilität. Dies hängt mit ihrer Herstellung zusammen. Die klassische Antikörperherstellung beginnt mit der Beimpfung eines Labortiers (Maus, Ratte, Kaninchen, Hamster) mit dem entsprechenden Zielprotein oder eines Teiles davon (Peptid). Das Versuchstier reagiert mit einer Antikörperbildung, wobei eine große Zahl von verschiedenen Antikörpern gebildet wird. Die Zahl der zu erwartenden verschiedenen Antikörper unterscheidet sich zwischen den Spezies und dem verwendeten Zielprotein. Sie kann bei Mäusen zwischen 30 und 77 (Eyer et al., 2020, Gerard et al., 2020), bei Kaninchen zwischen 12 und 30 (Wine et al., 2013, Cheung et al., 2012) und beim Menschen zwischen 50 und 400 liegen (Wine et al., 2015). Bei großen Versuchstieren (Kaninchen) kann in regelmäßigen Abständen Serum gewonnen werden und bezüglich der gewünschten Antikörper aufgereinigt werden. Das Produkt ist ein polyklonaler Antikörper. Nachteil der polyklonalen Antikörper ist die Tierspezifität des Produktes. Ein bestimmtes Tier produziert eine bestimmte Mischung polyklonaler Antikörper (Saper, 2009). Wenn das Tier verloren geht, kann der Antikörper nicht mehr produziert werden. Zudem weiß niemand, welche Antikörper genau von dem Tier gebildet werden und für die immunhistochemische Färbereaktion verantwortlich wären. Es ist deswegen prinzipiell vorteilhaft monoklonale Antikörper zu verwenden. Diese werden aus Antikörper produzierenden Zellen des Tiers gewonnen, welche aus dem Tier entnommen und durch eine Fusion mit einer Tumor Zelllinie immortalisiert werden. Für die Beschreibung der Methode zur Herstellung monoklonaler Antikörper erhielt Köhler et al 1984 den Nobelpreis für Medizin (Uhr, 1984). Problematisch ist, dass aus einem Versuchstier in einem Experiment viele verschiedene monoklonale Antikörper gewonnen werden, welche sich zumindest geringfügig, häufig aber auch erheblich in ihren Bindungseigenschaften unterscheiden. Dementsprechend reagieren verschiedene Antikörper für ein bestimmtes Protein grundsätzlich nicht identisch. Auch kommerzielle Antikörper für ein spezielles Zielprotein können sich erheblich in ihrer Sensitivität, Spezifität und Affinität unterscheiden (Saper, 2009, Jain und Salunke, 2019).

2) Fixationsbedingte Proteinveränderungen. Die in der Pathologie übliche Formalinfixation von Geweben hat den Zweck, die Autolyse/Nekrose von Geweben zu verhindern, welche sich unweigerlich einstellen, nachdem ein entnommenes Gewebefragment von der Blutversorgung abgekoppelt wird. Ein Nebeneffekt der Fixation ist die unweigerlich damit verbundene Veränderung der Proteinstruktur, wobei die Proteine ein sogenanntes Crosslinking (Vernetzung) durchlaufen (Helander, 1994). Durch diesen Prozess werden zahlreiche Epitope entweder direkt oder in ihrer Zugänglichkeit verändert (Werner et al., 2000). Dies übt einen massiven Einfluss auf die Bindungsmöglichkeiten von Antikörpern aus. Zwar kann die Gewebereaktivität durch die sogenannte hitzeinduzierte Epitop Demaskierung (Heat induced epitope retrieval, HIER) teilweise reversibel gestaltet werden, doch muss immer davon ausgegangen werden, dass formalinfixiertes Gewebe anders auf Antikörper reagiert als unfixiertes Gewebe (Yamashita, 2007). Erschwerend kommt hinzu, dass im Verarbeitungsprozess der Pathologie das Gewebe auch Alkohol exponiert wird. Bis zu diesem Schritt nicht ausreichend fixierte Gewebeanteile würden dann nachträglich alkoholfixiert, was eine andersartige Proteinveränderung hervorruft (Koagulation) und wieder andere Einflüsse auf die Antikörperbindung erzeugt (Werner et al., 1996). Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung von Geweben und der nicht-standardisierbaren Fixationsdauer ergeben sich signifikante interindividuelle Fixationsunterschiede von Geweben, welche auch zu interindividuellen Unterschieden der Immunfärbung führen.

3) Validierung von Antikörpern. Die Punkte 1) und 2) machen deutlich, dass es für die Anwendung an formalinfixiertem Gewebe nicht ausreicht, Antikörper zu verwenden, welche in Westernblot, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder anderen an unfixiertem Material durchgeführten Validierungsexperimenten eine spezifische Reaktion gezeigt haben. Vielmehr ist es nötig, Antikörper, welche an formalinfixierten Gewebe eingesetzt werden sollen, auch an formalinfixierten Geweben zu validieren (Uhlen et al., 2016). Wegen der genannten interindividuellen Unterschiede zwischen Gewebeproben ist es hierbei notwendig, eine solche Validierung an einer großen Zahl von Geweben durchzuführen (Hoff et al., 2019).

2.4 Arginase-1 Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Untersuchungen zur Arginase-1 wurde das Gewebe am Vortag geschnitten und über Nacht bei 60 °C im Brutschrank verwahrt, um die Schnitte zu entparaffinieren. Von jedem verwendeten TMA Block wurde ein circa 2,5 µm dicker Schnitt entnommen und auf einen Glas-Objektträger aufgebracht. Am Folgetag wurden alle Schnitte mit ein und demselben Reagenziensatz versetzt und gefärbt. Als erster Schritt erfolgte die finale Entparaffinierung der Schnitte mittels Xylol, sowie eine anschließende Rehydrierung mit einer absteigenden Alkoholreihe und Spülung in destilliertem Wasser. Durch die Paraffinfixierung kommt es zur Vernetzung verschiedener Proteine (Crosslinking). Um die Proteine wieder freizulegen, folgte die Demaskierung der Epitope durch 5 Minuten bei 121 °C im Autoklav (HIER) unter Zugabe eines Tris-EDTA-Citrat Puffers mit einem pH von 7,8 (Target Retrieval Solution Buffer DAKO). Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, folgte der essenzielle Zwischenschritt des Peroxidasenblocks durch Zugabe einer H₂O₂ Lösung. Nach Inkubation und Spülung mit TBS-T-Puffer, was ebenfalls eine unspezifische Hintergrundfärbung vermindern soll, waren die Schnitte bestmöglich vorbereitet, um eine Antigen-Antikörperreaktion zu ermöglichen. Der spezifische Antikörper gegen Arginase-1 (rabbit recombinant, MSVA-511R, MS Validated Antibodies, GmbH, Hamburg, Germany) wurde als Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:450 aufgebracht und die Schnitte anschließend bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Danach erfolgte eine erneute Spülung mit TBS-T Puffer. Der Sekundärantikörper (Dako real EnVision Detection System) wurde aufgebracht und die Schnitte erneut für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Auch nach diesem Schritt folgte eine Spülung mit TBS-T Puffer, um unspezifische Antigenbindungen zu eliminieren. Schließlich folgte der Chromogenprozess durch Zugabe von DAB-Chromogen (DAKO) und 10 Minuten Einwirkzeit. Nach einem letzten Spülschritt mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt, in Leitungswasser gebläut, schließlich mit aufsteigender Alkoholreihe (bis Xylol) dehydriert und dann im Eindeckautomaten mit einer Folie abgedeckt, um eine Beschädigung der Schnitte zu vermeiden.

Zur Antikörpervalidierung wurde der Normalgewebe TMA ebenfalls mit einem weiteren Antikörper gegen Arginase-1 (Cell Marque clone SP156, Cat.# 380R-18) in einer Verdünnung von 1: 6,25 im Färbeautomat (DAKO Link48 autostainer) gefärbt. Eine Übersicht der Schritte ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Immunhistochemie Färbeprotokoll

Handfärbung	Automatenfärbung (DAKO Link48 autostainer)
<p>1.) <i>Vorbereitung Objektträger</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - 2,5 µm Schnitte über Nacht bei 60°C. - Schnitte in Xylol (3 mal 5 Minuten). - Absteigende Alkoholreihe bis Aqua Dest. 	<p>1.) <i>Vorbehandlung der Schnitte</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - „Kochen“ im PT-Link von DAKO bei pH 9 für 15 Minuten bei 95 °C.
<p>2.) <i>Vorbehandlung</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Autoklavieren der Schnitte bei 121°C für 5 Minuten unter Zugabe von TEC Puffer (pH 7,8). - Spülung in Aqua Dest, 2 mal. - Spülung für 5 Minuten mit TBST Puffer. 	<p>2.) <i>Färbung der Schnitte im DAKO Stainer</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Unter Verwendung des Primärantikörper anti-Arginase-1 in 1 : 6,25 Verdünnung (Cell Marque clone SP156, Cat.# 380R-18).
<p>3.) <i>Peroxidase Block</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Auslegen der Schnitte in feuchter Kammer. - Peroxidase Blocking Solution (#S2023) RTU für 10 Minuten. - Spülung mit TBST Puffer (3 mal 5 Minuten). 	
<p>4.) <i>Antikörper Inkubation</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Inkubation mit 1 : 450 anti-Arginase1 Primärantikörper (MSVA-511R) für 1 Stunde bei 37 °C. - Spülung mit TBST Puffer (3 mal 5 Minuten). - Inkubation mit Sekundärantikörper EnVision (mouse/rabbit) # K5007 für 30 Minuten bei 37 °C. - Spülung mit TBST Puffer (3 mal 5 Minuten). 	
<p>5.) <i>Visualisierung durch Chromogenprozess</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - DAB Chromogen #K5007 für 10 Minuten bei Raumtemperatur. - Spülen in Aqua Dest. - Hämatoxylin Gegenfärbung (DAKO Hämalun) für 2 Minuten. - Bläuen in Leitungswasser für 5 min. - Aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol. - Eindecken in Eindeckautomaten. 	

Verwendete Abkürzungen: *Aqua Dest* destilliertes Laborwasser, *TEC* Tris-EDTA-Citrat, *TBST* Tris-buffered-saline-with-Tween, *RTU* ready-to-use.

2.5 Auswertung der Immunhistochemie

Alle Gewebeproben wurden von einer Pathologin ausgewertet (Natalia Gorbokon) wobei der prozentuale Anteil der Arginase-1 positiven Tumorzellen und die Färbeintensität auf einer Skala von 0 bis 3 registriert wurden. Anschließend wurden die Tumoren entsprechend der Ergebnisse in die Kategorien negativ, schwach, moderat und stark positiv eingeteilt. Die hierfür verwendeten Kriterien sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Auswertungskriterien

Kategorie	Anteil gefärbter Tumorzellen	Intensität der Färbung
Negativ	0 %	0
Schwach positiv	≤ 70 %	1
	≤ 30 %	2
	>70 %	1
Moderat positiv	31% bis 70%	2
	≤ 30%	3
Stark positiv	>70%	2
	>30%	3

2.6 Statistik

Statistische Berechnungen wurden mit der Software JMP 14 (SAS Institute Inc., NC, USA) durchgeführt. Der chi²-Test wurde durchgeführt, um nach Zusammenhängen zwischen der Arginase-1 Färbung und dem Tumorphänotyp bei Plattenepithelkarzinomen zu suchen.

3. Ergebnisse

3.1 Technische Aspekte

Von den 14 912 untersuchten Tumoren waren 12 047 (81 %) auf dem Tissue-Microarray auswertbar. Nicht Auswertbarkeit bei 2 865 (19 %) der Tumorgewebeproben war entweder durch Fehlen der entsprechenden Proben an den vorgesehenen Koordinatenpunkten oder dem Fehlen von eindeutigen Tumorzellen im Gewebe bedingt. Von allen Normalgeweben war immer eine ausreichende Zahl von Proben auswertbar, um eine Einschätzung der Gewebereaktivität vorzunehmen.

3.2 Arginase-1 in Normalgeweben

Die durch Arginase-1 hervorgerufene Färbung zeigte sich in der Regel zytoplasmatisch und nukleär. Die stärkste Färbung zeigte sich im Lebergewebe in den Hepatozyten. Moderate bis starke Färbungen waren auch in keratinisiertem Plattenepithel der Haut in der Körnerzellschicht zu sehen. Granulozyten und Vorläuferzellen im Knochenmark wiesen eine moderate Färbung, ein Teil der Deziduazellen moderate bis schwache Färbung auf. Keinerlei Färbung zeigte sich im Gastrointestinaltrakt, Urothel, nicht-verhornenden Plattenepithelien, Pankreas, Speicheldrüsen, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Adenohypophyse, Nebennierenrinde, Prostata, Nebenhoden, Hoden, Samenblase, Endometrium, Endozervix, Eileiter, Niere, respiratorisches Epithel, Lunge, Plazenta, Muskelzellen (verschiedene Typen), Myometrium, lymphatischen Organen, Endothel, Hirn oder Neurohypophyse. Durch die Verwendung eines zweiten unabhängigen Antikörpers (Cell Marque clone SP156) wurden alle von uns gefundenen positiven Färbungen bestätigt (Abbildung 14). Eine repräsentative Auswahl an Normalgewebe unserer Studie zeigen Abbildungen 15–24.

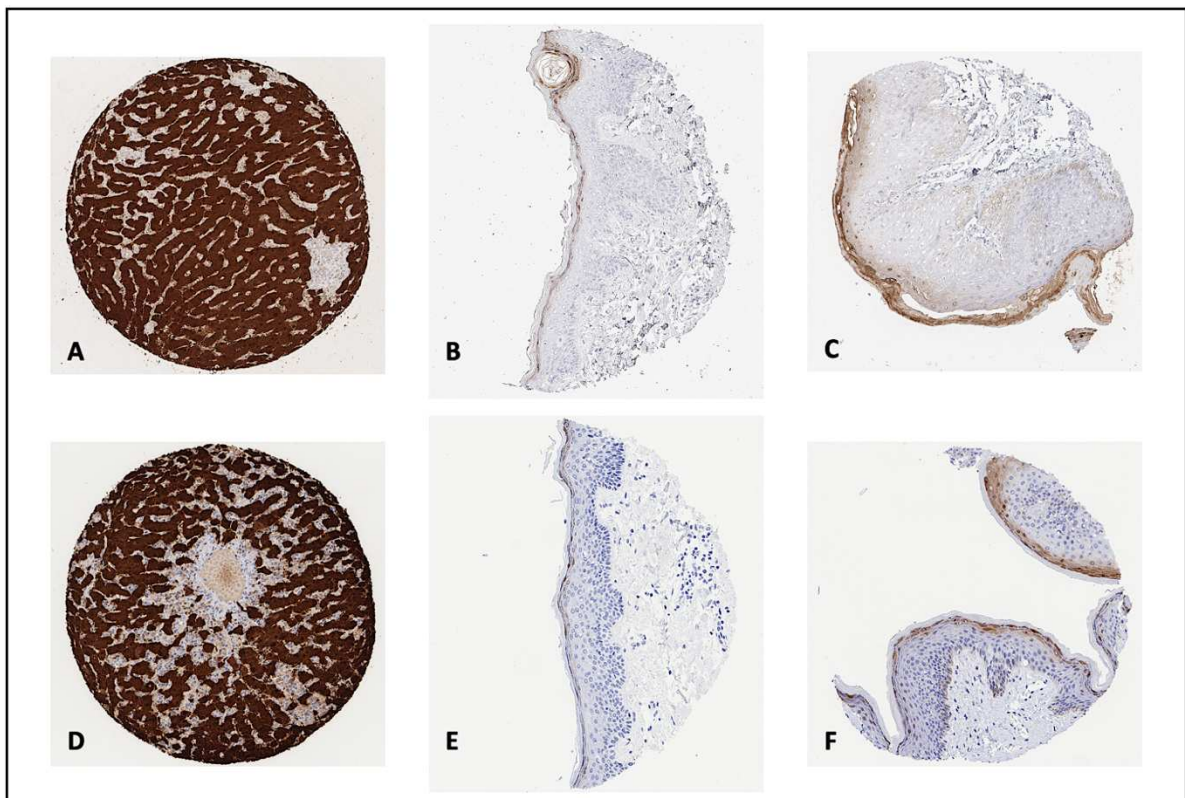


Abbildung 14: Antikörpervergleich. Die Abbildung zeigt Lebergewebe (links), Haut (mitte) und Plattenepithel des Analkanals (rechts). Die Gewebe in den Abbildungen A und D, B und E sowie C und F wurden jeweils vom selben Spenderblock entnommen. Abbildungen A–C wurden mit MSVA-511 R gefärbt, Abbildungen D–F mit Cell Marque clone SP156. Es zeigen sich für die beiden unabhängigen Antikörper nahezu identische Färbemuster in den Geweben.

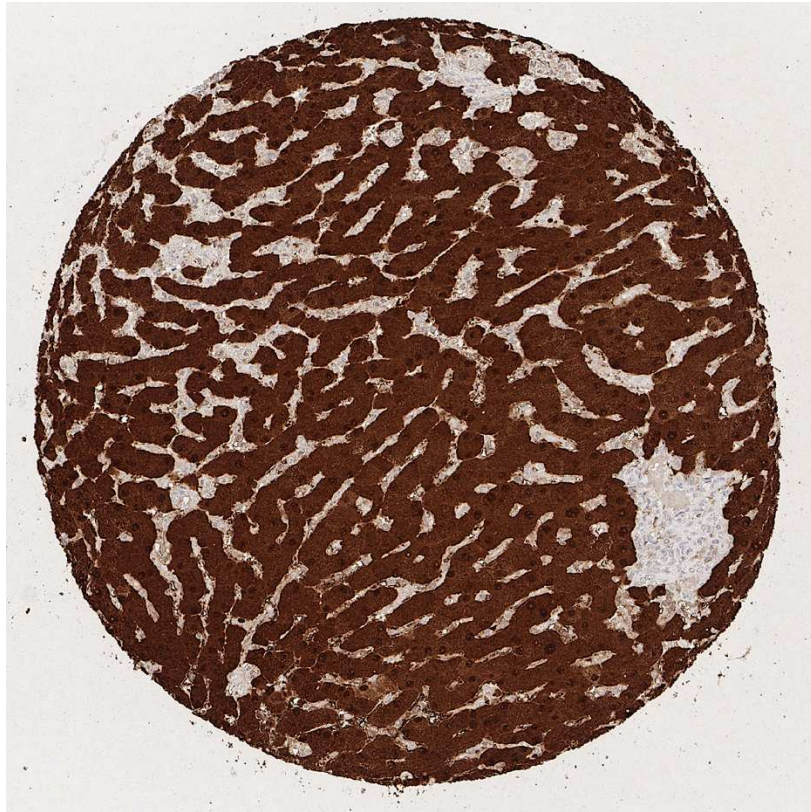


Abbildung 15: Lebergewebe. Starke Arginase-1 Färbung.

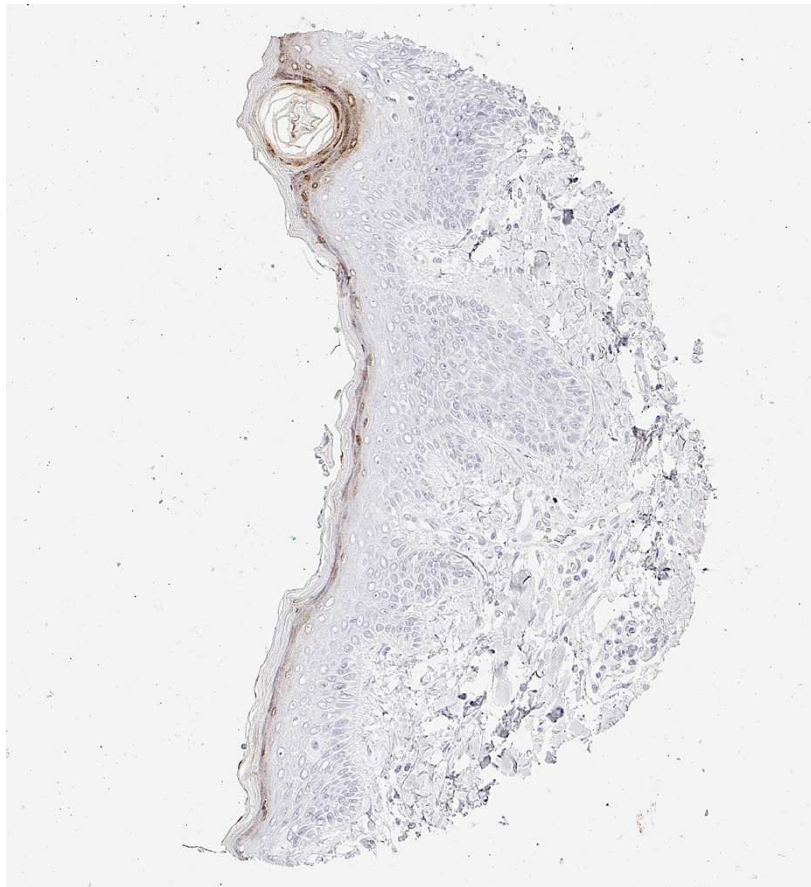


Abbildung 16: Haut (verhornendes Plattenepithel) Granularzellschicht. Moderate Arginase-1 Färbung.

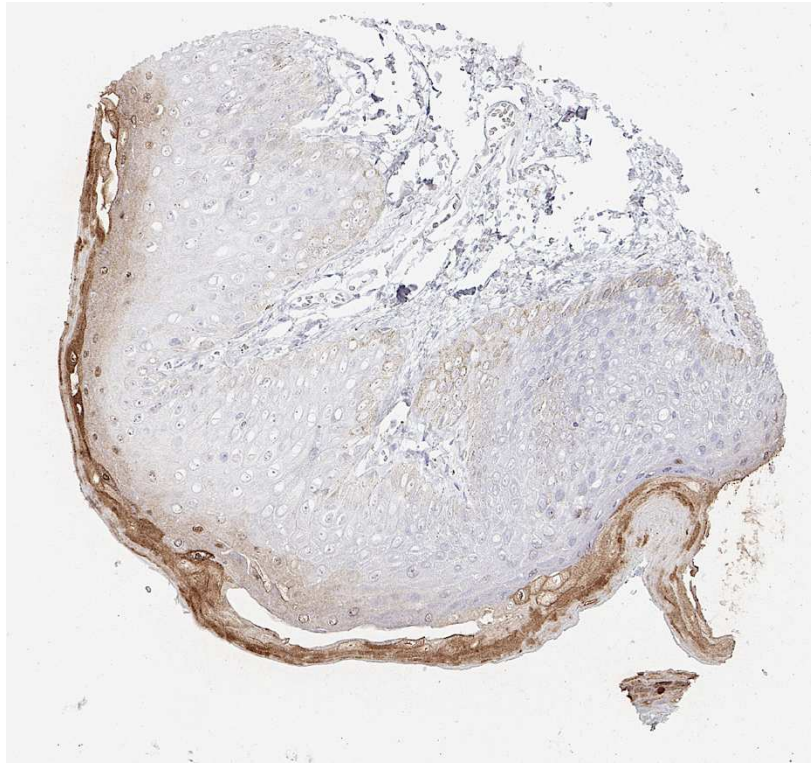


Abbildung 17: Haut des Analkanals (verhornendes Plattenepithel), Granularzellschicht. Moderate Arginase-1 Färbung.

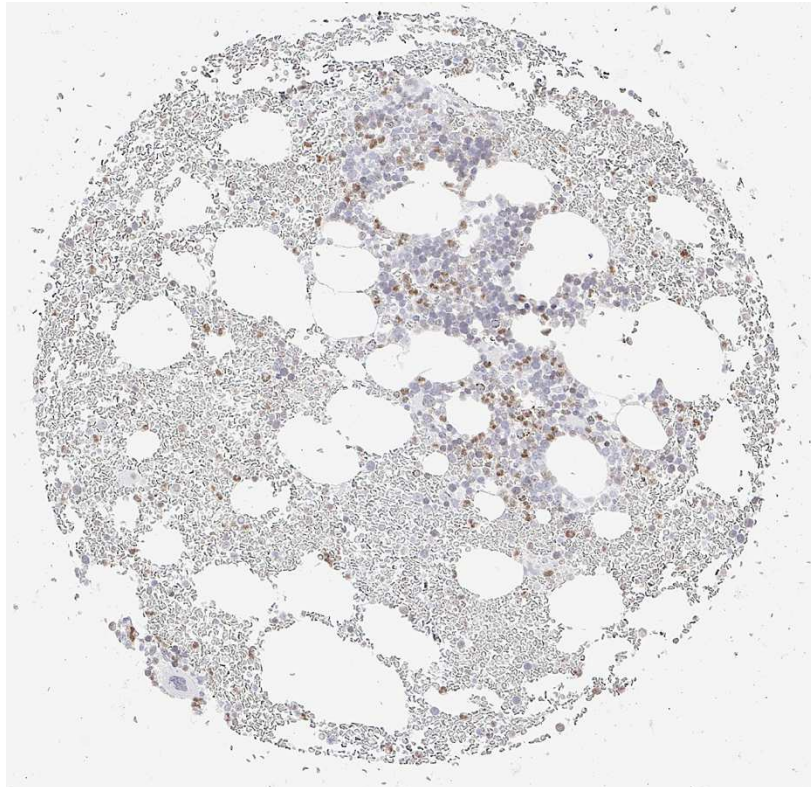


Abbildung 18: Knochenmark. Schwach bis moderate Arginase-1 Färbung in Granulozyten und deren Vorläuferzellen.

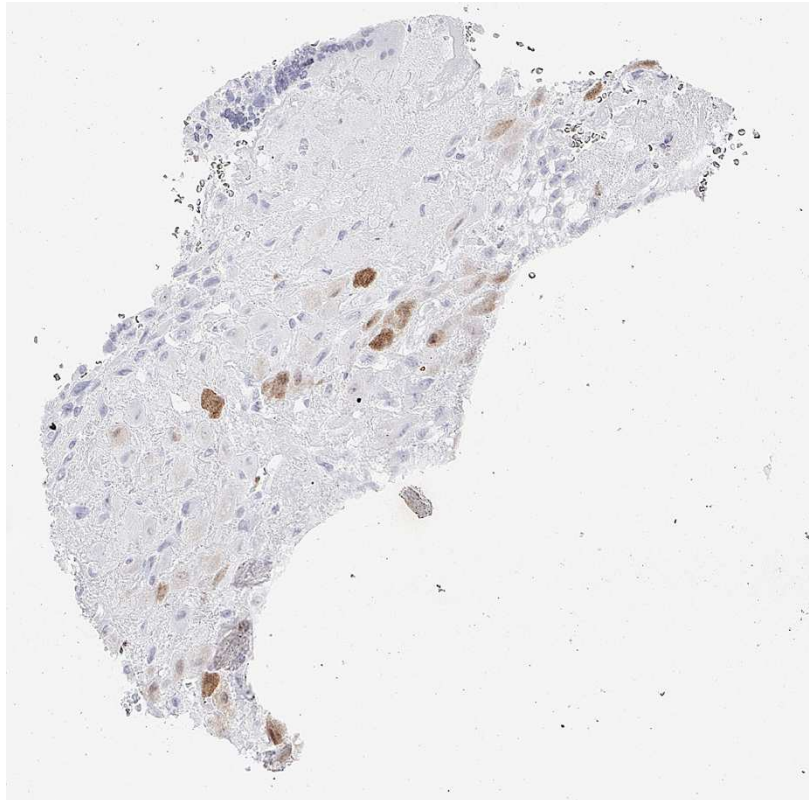


Abbildung 19: Frühe Plazenta, Deziduazellen. Moderate Arginase-1 Färbung.



Abbildung 20: Ösophagus Plattenepithel (nicht-verhornendes Plattenepithel). Negative Arginase-1 Färbung.

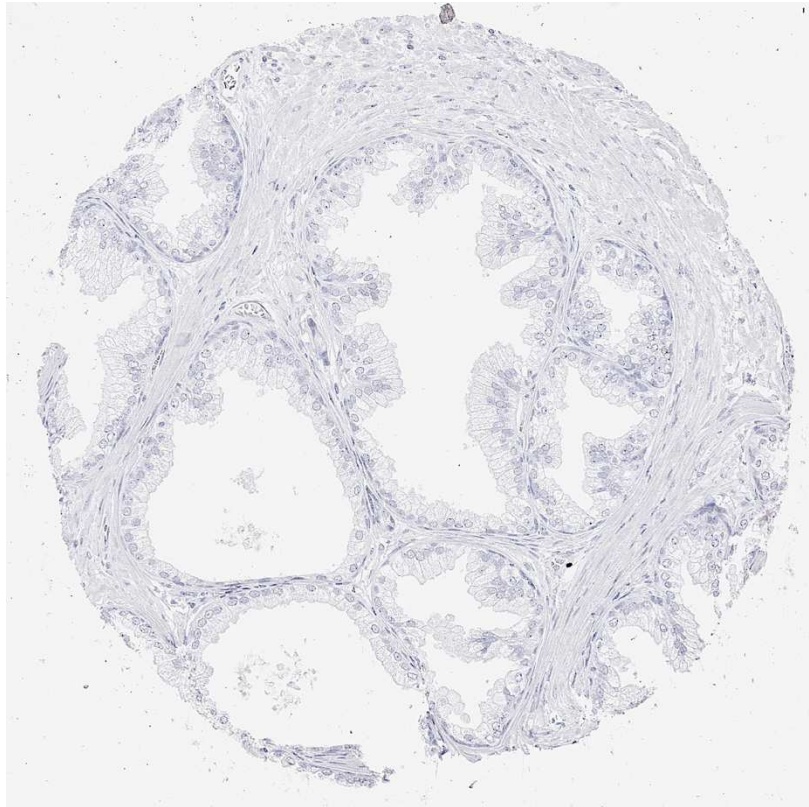


Abbildung 21: **Prostata**. Negative Arginase-1 Färbung.

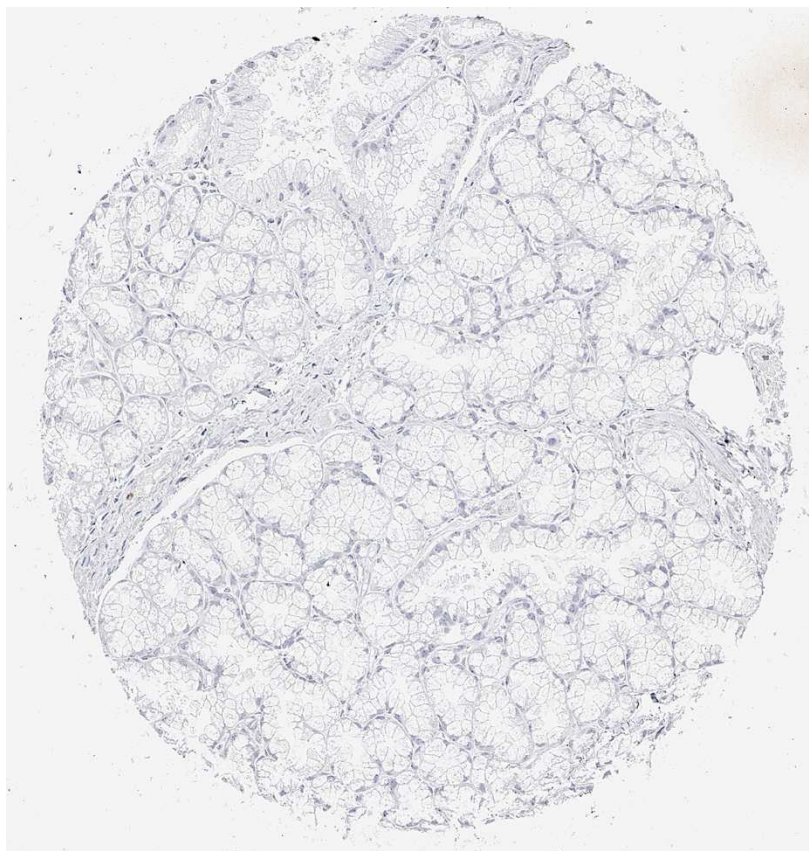


Abbildung 22: **Brunner-Drüsen (Duodenum)**. Negative Arginase-1 Färbung.

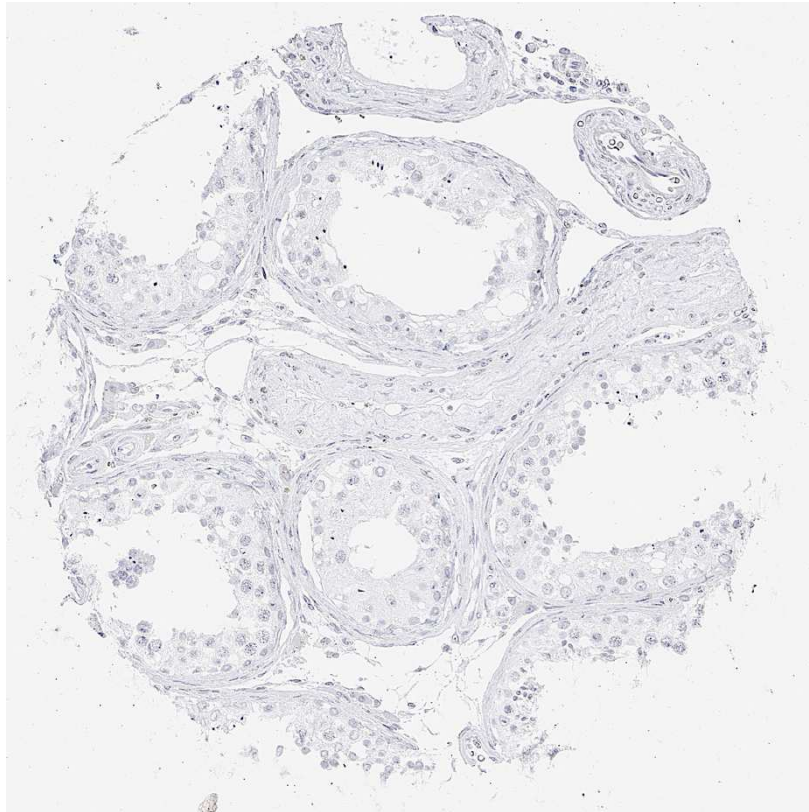


Abbildung 23: Hoden. Negative Arginase-1 Färbung.

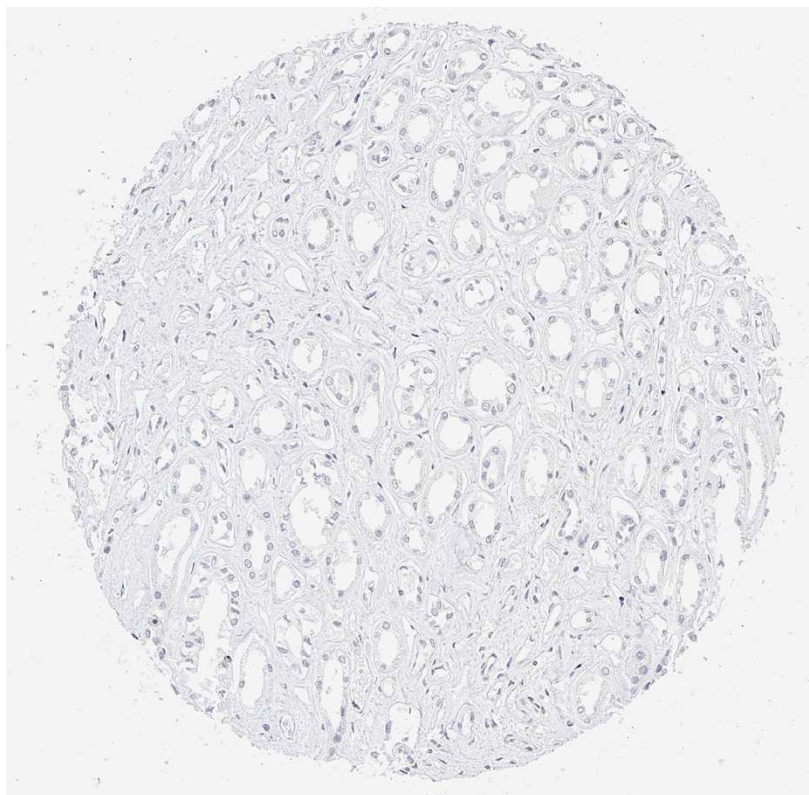


Abbildung 24: Nierenmark. Negative Arginase-1 Färbung.

3.3 Arginase-1 in Tumoren

Eine charakteristische nukleäre und zytoplasmatische Arginase-1 Färbung war vor allem im hepatozellulären Karzinom zu sehen, wobei von 49 Tumoren 87,8 % eine starke und 95,9 % eine mindestens moderate Arginase-1 Positivität aufwiesen. Obwohl eine Arginase-1 Expression in 22 zusätzlichen Tumorkategorien zumindest in Einzelfällen nachweisbar war, erwies sich diese Färbung häufig als deutlich weniger kräftig als in hepatozellulären Karzinomen und auch die Zahl der positiven Tumorzellen war typischerweise geringer als beim hepatozellulären Karzinom. Eine fokale Anfärbung von wenigen Tumorzellen fand sich besonders häufig in Plattenepithelkarzinomen verschiedener Ursprungsorgane. In Analogie zur Arginase-1 Expression in normalem Plattenepithel fand sich eine Arginase-1 Positivität insbesondere in ausreifenden Plattenepithelzellen, welche sich in einem spezifischen Reifungsschritt, vergleichbar mit der beginnenden Keratinisierung der Zellen, befanden. Seltene positive Einzelfälle bei Teratomen, Urothelkarzinomen und pleomorphen Adenomen zeigten ebenfalls eine Arginase-1 Expression in Arealen mit plattenepithelialer Differenzierung. Andere Tumorentitäten mit gelegentlicher und meist geringgradiger Arginase-1 Anfärbung beinhalteten Klarzellkarzinome des Ovar, Neuroendokrine Tumoren des Pankreas, muzinöse und lobuläre Mammakarzinome, Cholangiokarzinome und kolorektale Adenokarzinome. In den seltenen Fällen Arginase-1 positiver kolorektaler Karzinome und muzinöser Mammakarzinome war die Arginase-1 Positivität insbesondere in intratumoralem Schleim oder muzinproduzierenden Becherzellen zu sehen. Eine systematische Darstellung der Arginase-1 Färbung nach Organsystemen geordnet ist in Tabelle 8 dargestellt. Tabelle 9 und Abbildung 25 zeigen eine Rangliste der untersuchten Tumorentitäten nach dem prozentualen Anteil positiver und stark positiver Tumoren. Repräsentative Bilder von Arginase-1 positiven und negativen Tumoren unserer Studie sind in Abbildung 26–47 gezeigt.

Tabelle 8: Arginase-1 Färbung der analysierbaren Fälle auf dem MTA

Organsystem	Entitäten/Subentitäten	Analysierbare Fallzahl (n)	negativ%	schwach%	moderat%	stark%
Tumoren der Haut	Pilomatrixom	33	97,0	3,0	0,0	0,0
	Basalzellkarzinom	50	100,0	0,0	0,0	0,0
	Nävuszellnävus	26	100,0	0,0	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom der Haut	77	85,7	13,0	1,3	0,0
	Malignes Melanom	43	100,0	0,0	0,0	0,0
	Merkelzellkarzinom	41	100,0	0,0	0,0	0,0
Kopf Hals Tumoren	Plattenepithelkarzinom des Larynx	93	90,3	5,4	4,3	0,0
	Plattenepithelkarzinom des Pharynx	44	90,9	9,1	0,0	0,0
	Orales Plattenepithelkarzinom (Mundboden)	115	92,2	7,0	0,9	0,0
	Pleomorphes Adenom der Parotis	45	97,8	2,2	0,0	0,0
	Warthin-Tumor der Parotis	49	100,0	0,0	0,0	0,0
	Basalzelladenom der Speicheldrüsen	14	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren der Lunge, Pleura und des Thymus	Adenokarzinom der Lunge	169	100,0	0,0	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom der Lunge	68	98,5	1,5	0,0	0,0
	Kleinzelliges Lungenkarzinom	16	100,0	0,0	0,0	0,0
	Epitheloides Mesencheliom	33	100,0	0,0	0,0	0,0
	Andere Mesencheliome	63	100,0	0,0	0,0	0,0
	Thymom	29	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren des weiblichen Genitaltrakts	Plattenepithelkarzinom der Vagina	63	95,2	4,8	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom der Vulva	114	86,0	13,2	0,9	0,0
	Plattenepithelkarzinom der Zervix	119	99,2	0,8	0,0	0,0
	Endometrioides Endometriumkarzinom	222	100,0	0,0	0,0	0,0
	Seröses Endometriumkarzinom	73	100,0	0,0	0,0	0,0
	Karzinom des Uterus	41	100,0	0,0	0,0	0,0
	Endometriumkarzinom, high grade G3	13	100,0	0,0	0,0	0,0
	Klarzelliges Endometriumkarzinom	7	100,0	0,0	0,0	0,0
	Endometrioides Ovarialkarzinom	90	100,0	0,0	0,0	0,0
	Seröses Ovarialkarzinom	455	100,0	0,0	0,0	0,0
	Muzinöses Ovarialkarzinom	74	100,0	0,0	0,0	0,0
	Klarzelliges Ovarialkarzinom	40	92,5	7,5	0,0	0,0
	Karzinom des Ovars	39	100,0	0,0	0,0	0,0
Brenner Tumor	9	100,0	0,0	0,0	0,0	

Tumoren der Mamma	Mammakarzinom NST	1208	100,0	0,0	0,0	0,0
	Lobuläres Mammakarzinom	252	99,6	0,4	0,0	0,0
	Medulläres Mammakarzinom	26	100,0	0,0	0,0	0,0
	Tubuläres Mammakarzinom	26	100,0	0,0	0,0	0,0
	Muzinöses Mammakarzinom	49	98,0	2,0	0,0	0,0
	Phylloides tumor	50	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren des Verdauungstraktes	Kolonadenom, niedriger Dysplasiegrad	48	100,0	0,0	0,0	0,0
	Kolonadenom, hoher Dysplasiegrad	48	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenokarzinom des Kolon	1 610	99,5	0,3	0,1	0,1
	Magenadenokarzinom, diffuser Typ	142	100,0	0,0	0,0	0,0
	Magenadenokarzinom, intestinaler Typ	132	100,0	0,0	0,0	0,0
	Magenadenokarzinom, gemischter Typ	52	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenokarzinom des Ösophagus	61	100,0	0,0	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	38	97,4	2,6	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom des Analkanals	73	94,5	4,1	1,4	0,0
	Cholangiozelluläres Karzinom	103	99,0	1,0	0,0	0,0
	Hepatozelluläres Karzinom	49	4,1	0,0	8,2	87,8
	Duktales Pankreas Adenokarzinom	470	100,0	0,0	0,0	0,0
	Pankreas/Ampulla Vateri Adenokarzinom	77	100,0	0,0	0,0	0,0
	Azinuszellkarzinom des Pankreas	14	100,0	0,0	0,0	0,0
	Gastrointestinale Stromatumoren (GIST)	49	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren der Harnwege	Urothelkarzinom, pT2-4 G3	588	99,8	0,2	0,0	0,0
	Kleinzelliges neuroendokrines Blasenkarzinom	19	100,0	0,0	0,0	0,0
	Sarkomatoides Urothelkarzinom	24	100,0	0,0	0,0	0,0
	Klarzelliges Nierenkarzinom	644	100,0	0,0	0,0	0,0
	Papilläres Nierenzellkarzinom	185	100,0	0,0	0,0	0,0
	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	16	100,0	0,0	0,0	0,0
	Chromophobes Nierenzellkarzinom	107	100,0	0,0	0,0	0,0
	Onkozytom	130	100,0	0,0	0,0	0,0

	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 3+3	80	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 4+4	72	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 5+5	78	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenokarzinom der Prostata, Rezidiv	211	98,1	1,4	0,5	0,0
	Kleinzelliges neuroendokrines Pankreaskarzinom	17	100,0	0,0	0,0	0,0
	Seminom	446	100,0	0,0	0,0	0,0
	Keimzelltumor des Hodens	35	100,0	0,0	0,0	0,0
	Dottersacktumor	31	100,0	0,0	0,0	0,0
	Teratom	46	95,7	4,3	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom des Penis	63	92,1	7,9	0,0	0,0
Endokrine Tumoren	Adenom der Schilddrüse	104	100,0	0,0	0,0	0,0
	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	351	100,0	0,0	0,0	0,0
	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	136	100,0	0,0	0,0	0,0
	Medulläres Schilddrüsenkarzinom	100	100,0	0,0	0,0	0,0
	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	43	100,0	0,0	0,0	0,0
	Nebennierenrinden Adenom	21	100,0	0,0	0,0	0,0
	Nebennierenrinden Karzinom	26	100,0	0,0	0,0	0,0
	Phäochromozytom	50	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokriner Tumor des Appendix	13	100,0	0,0	0,0	0,0
	Kolorektaler Neuroendokriner Tumor	11	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokriner Tumor des Ileum	45	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokriner Tumor der Lunge	17	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokriner Tumor des Pankreas	93	95,7	2,2	2,2	0,0
	Kolorektales Neuroendokrines Karzinom	10	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokrines Karzinom der Gallenblase	4	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokrines Karzinom des Pankreas	14	100,0	0,0	0,0	0,0

Fortsetzung Tabelle 8: Arginase-1 Färbung der analysierbaren Fälle auf dem MTA.

Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes	Hodgkin Lymphom	72	100,0	0,0	0,0	0,0
	Kleinzelliges lymphozytisches B-Zell Lymphom	29	100,0	0,0	0,0	0,0
	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom	95	100,0	0,0	0,0	0,0
	Folikuläres Lymphom	63	100,0	0,0	0,0	0,0
	T-Zell Non Hodgkin Lymphom	14	100,0	0,0	0,0	0,0
	Mantelzell-Lymphom	14	100,0	0,0	0,0	0,0
	Marginalzonenlymphom	10	100,0	0,0	0,0	0,0
	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom des Hoden	13	100,0	0,0	0,0	0,0
	Burkitt Lymphom	1	100,0	0,0	0,0	0,0
Weichteil- und Knochentumoren	Tendosynovialer Riesenzelltumor	43	100,0	0,0	0,0	0,0
	Granularzelltumor	42	100,0	0,0	0,0	0,0
	Leiomyom	48	100,0	0,0	0,0	0,0
	Meiomyosarkom	81	100,0	0,0	0,0	0,0
	Liposarkom	123	100,0	0,0	0,0	0,0
	Maligner peripherer Nervenscheidentumor	12	100,0	0,0	0,0	0,0
	Myofibrosarkom	26	100,0	0,0	0,0	0,0
	Angiosarkom	61	100,0	0,0	0,0	0,0
	Angiomyolipom	91	100,0	0,0	0,0	0,0
	Dermatofibrosarcoma protuberans	18	100,0	0,0	0,0	0,0
	Ganglioneurom	13	100,0	0,0	0,0	0,0
	Kaposi Sarkom	6	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neurofibrom	93	100,0	0,0	0,0	0,0
	Undifferenzierte Sarkome	71	100,0	0,0	0,0	0,0
	Paragangliom	37	100,0	0,0	0,0	0,0
	Primitiver neuroektodermaler Tumor	18	100,0	0,0	0,0	0,0
	Rhabdomyosarkom	6	100,0	0,0	0,0	0,0
	Schwannom	103	100,0	0,0	0,0	0,0
	Synovialsarkom	11	100,0	0,0	0,0	0,0
	Osteosarkom	35	100,0	0,0	0,0	0,0
Chondrosarkom	24	100,0	0,0	0,0	0,0	

Fortsetzung Tabelle 8: Arginase-1 Färbung der analysierbaren Fälle auf dem MTA.

Tabelle 9: Rangliste der positiv gefärbten Tumorgewebe nach absteigender Positivität

Tumortyp	≥ schwach (%)	≥ moderat(%)	stark (%)
Hepatozelluläres Karzinom	95,9	95,9	87,8
Plattenepithelkarzinom der Haut	14,3	1,3	0,0
Plattenepithelkarzinom der Vulva	14,0	0,9	0,0
Plattenepithelkarzinom des Larynx	9,7	4,3	0,0
Plattenepithelkarzinom des Pharynx	9,1	0,0	0,0
Plattenepithelkarzinom des Penis	7,9	0,0	0,0
Orales Plattenepithelkarzinom (Mundboden)	7,8	0,9	0,0
Klarzelliges Ovarialkarzinom	7,5	0,0	0,0
Plattenepithelkarzinom des Analkanals	5,5	1,4	0,0
Plattenepithelkarzinom der Vagina	4,8	0,0	0,0
Teratom	4,3	0,0	0,0
Neuroendokriner Tumor des Pankreas	4,3	2,2	0,0
Pilomatrixom	3,0	0,0	0,0
Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	2,6	0,0	0,0
Pleomorphes Adenom der Parotis	2,2	0,0	0,0
Muzinöses Mammakarzinom	2,0	0,0	0,0
Adenokarzinom der Prostata (Rezidiv)	1,9	0,5	0,0
Plattenepithelkarzinom der Lunge	1,5	0,0	0,0
Cholangiozelluläres Karzinom	1,0	0,0	0,0
Plattenepithelkarzinom der Zervix	0,8	0,0	0,0
Adenokarzinom des Kolon	0,5	0,2	0,1
Lobuläres Mammakarzinom	0,4	0,0	0,0
Urothelkarzinom, pT2-4 G3	0,2	0,0	0,0

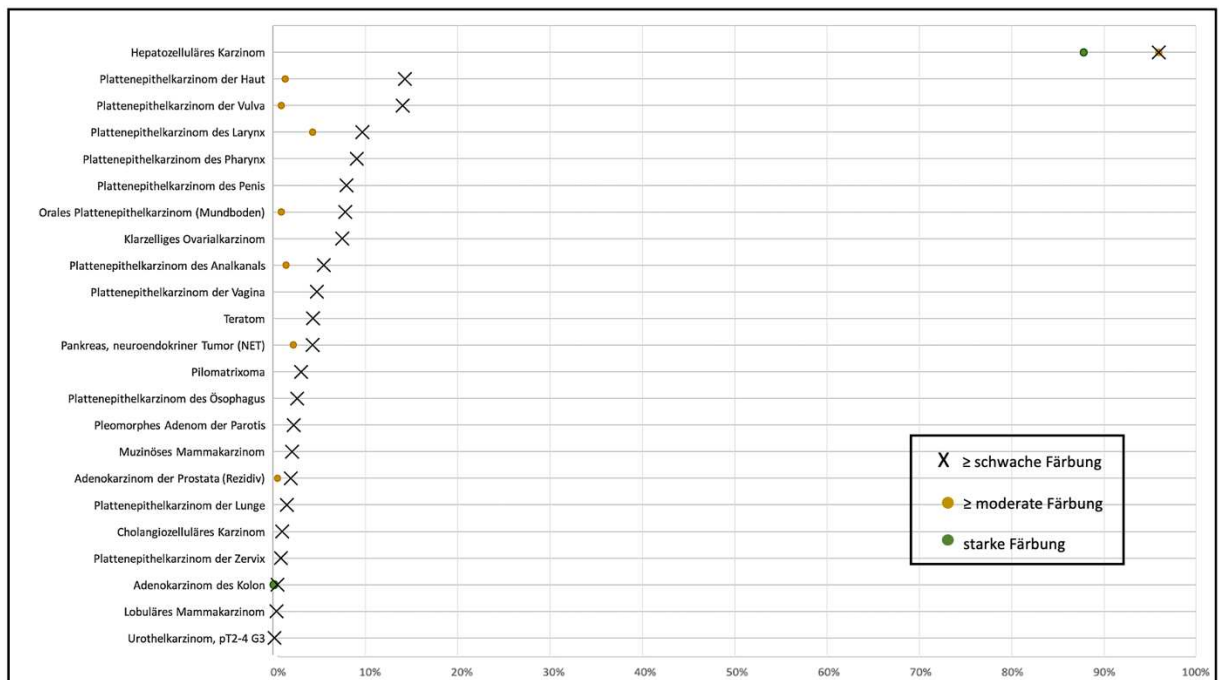


Abbildung 25: Positivitäten der gefärbten Tumortypen und Subtypen in unserer Studie. Dargestellt in absteigender Reihenfolge, alle nicht aufgeführten Tumortypen und Subtypen zeigten keine Positivität.

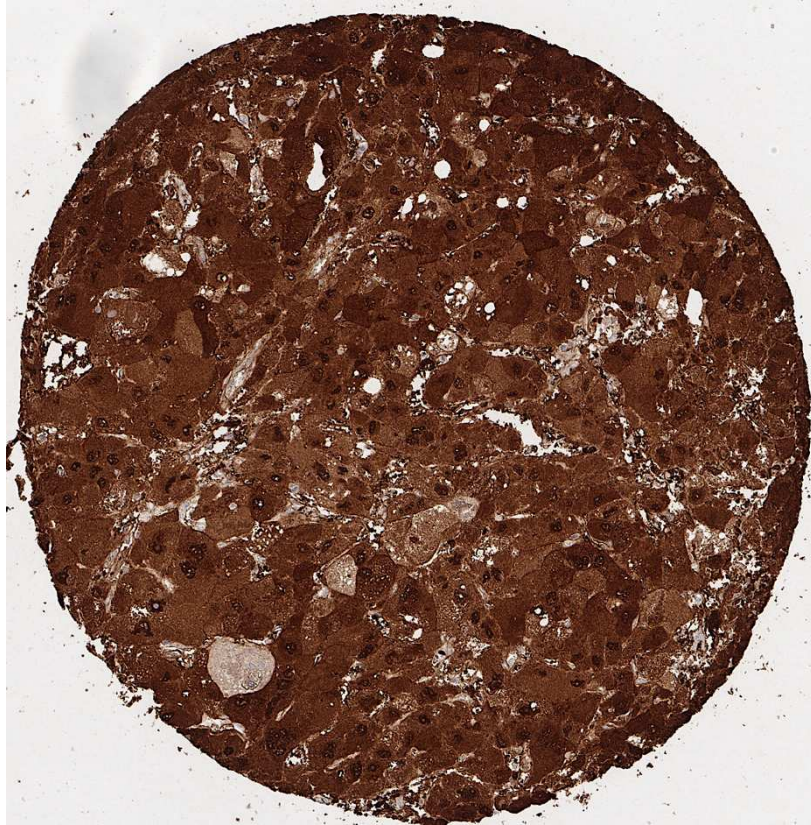


Abbildung 26: **Hepatozelluläres Karzinom.** Starke zytoplasmatische und nukleäre Arginase-1 Färbung im gesamten Gewebe.

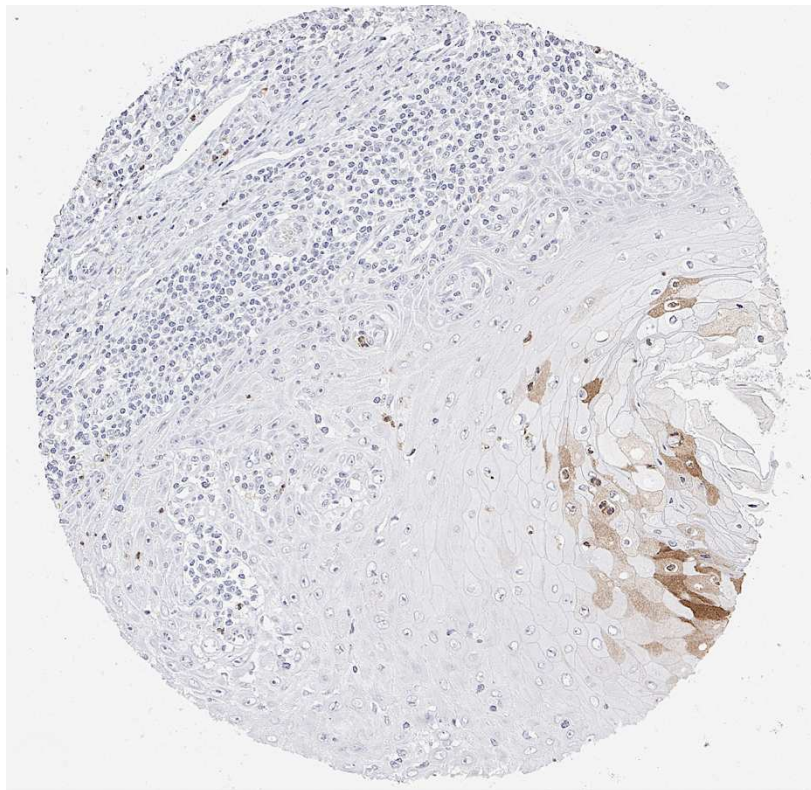


Abbildung 27: **Plattenepithelkarzinom der Haut.** Fokal moderate zytoplasmatische Arginase-1 Färbung.

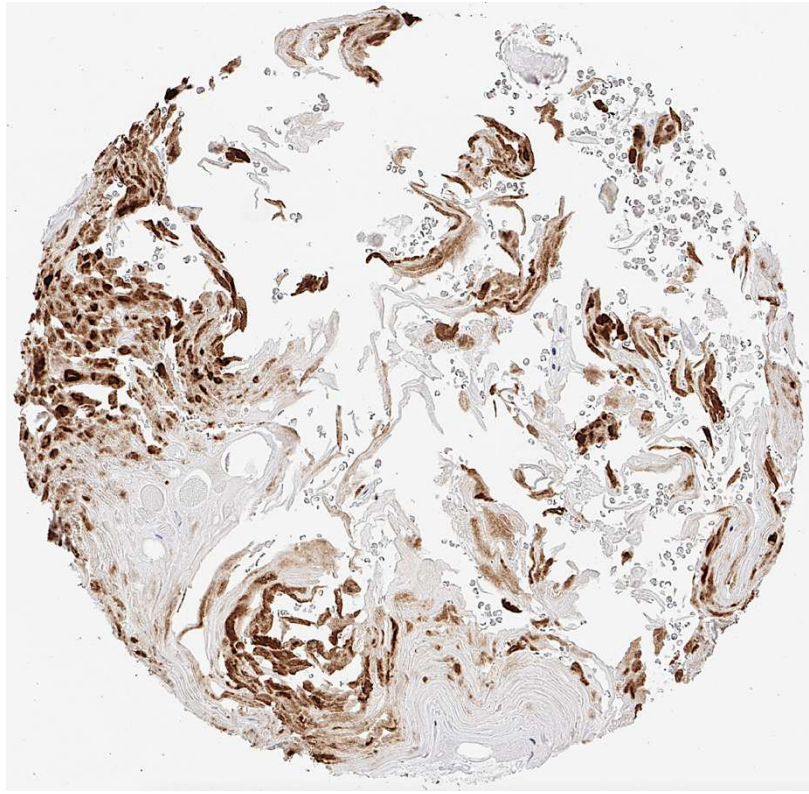


Abbildung 28: **Plattenepithelkarzinom der Vulva.** Moderate Arginase-1 Färbung, vor allem um Verhornungszonen.

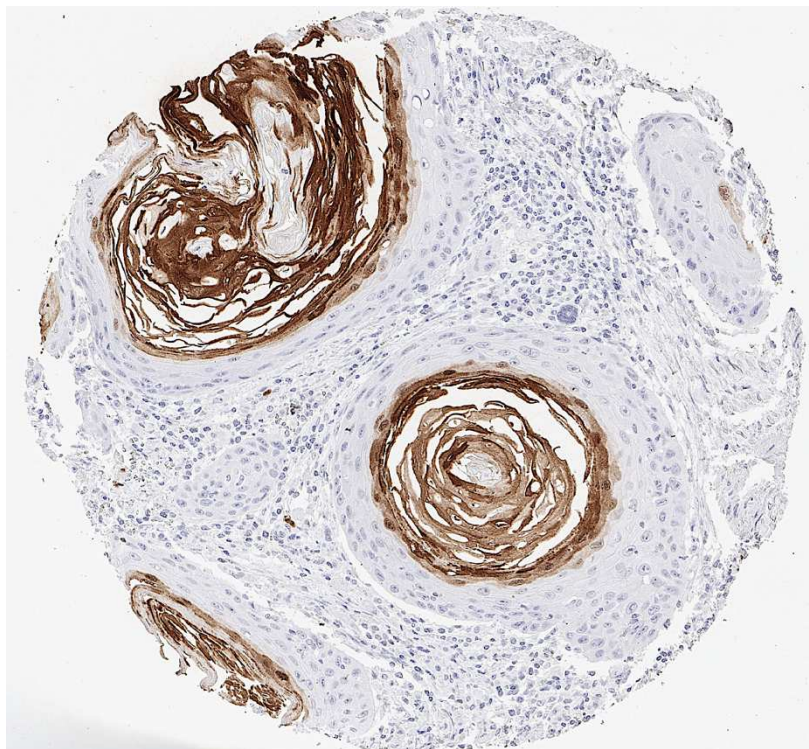


Abbildung 29: **Plattenepithelkarzinom des Larynx.** Moderate Arginase-1 Färbung im Bereich von Verhornung.

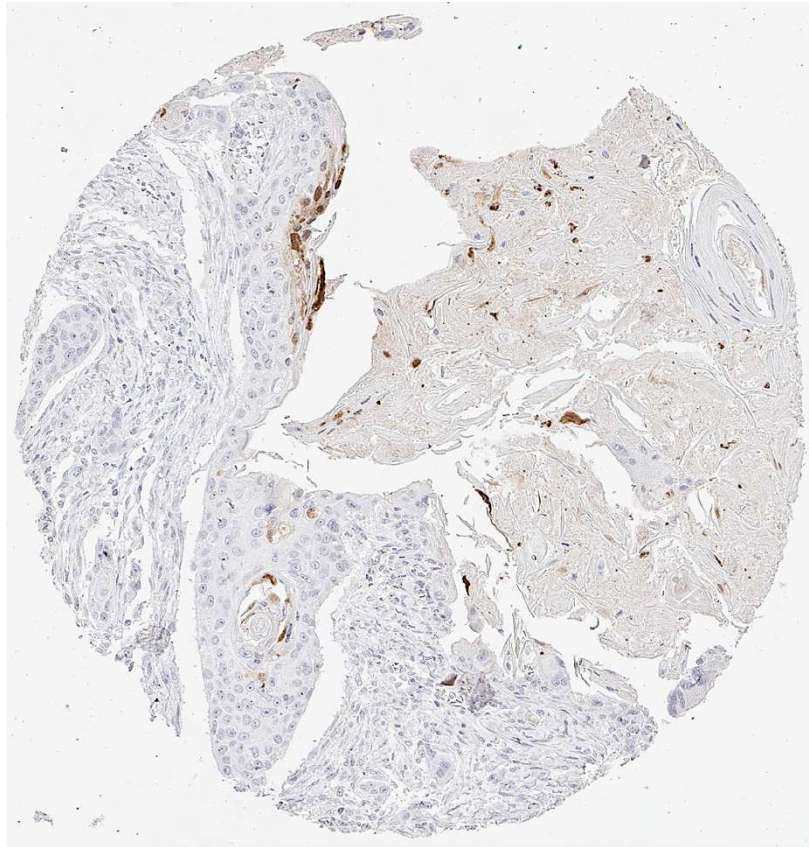


Abbildung 30: **Plattenepithelkarzinom des Pharynx.** Fokal moderate Arginase-1 Färbung.

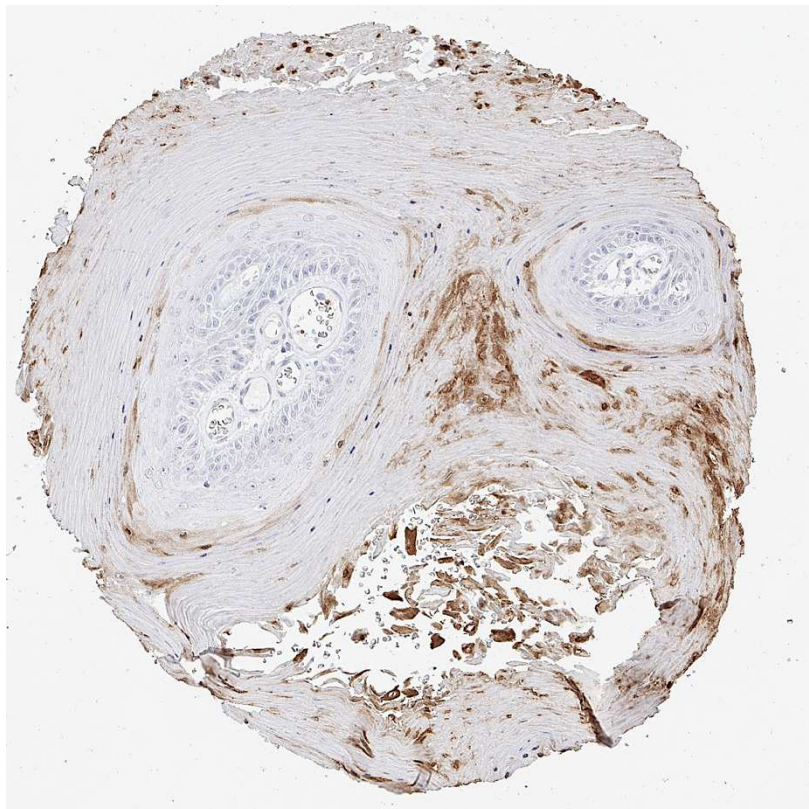


Abbildung 31: **Plattenepithelkarzinom des Penis.** Fokal moderate Arginase-1 Färbung im Bereich von Verhornung.

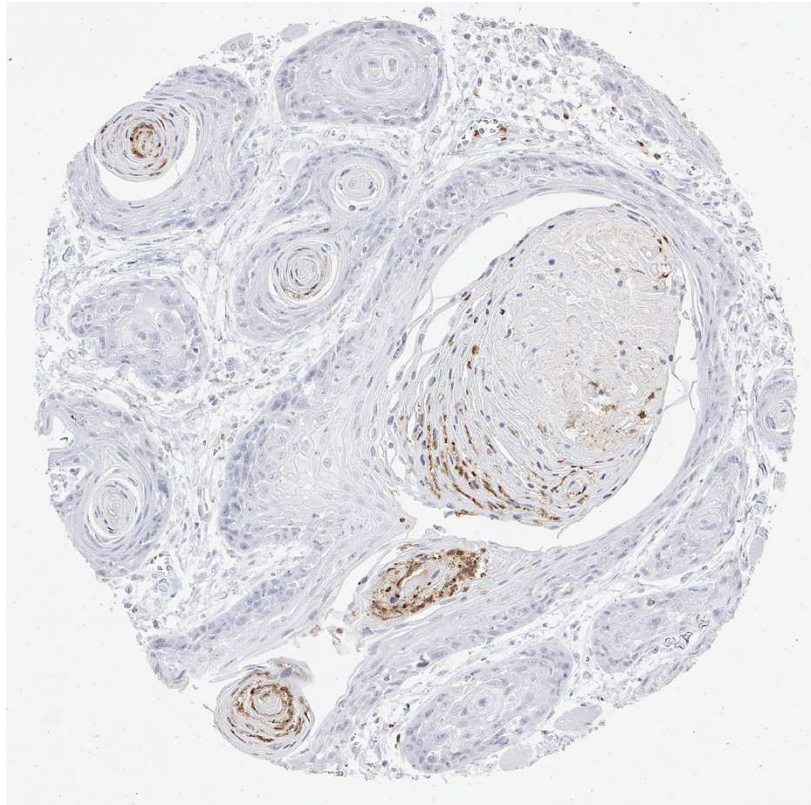


Abbildung 32: **Orales Plattenepithelkarzinom des Mundboden.** Kleinherdig moderate Arginase-1 Färbung um Verhornungszonen.

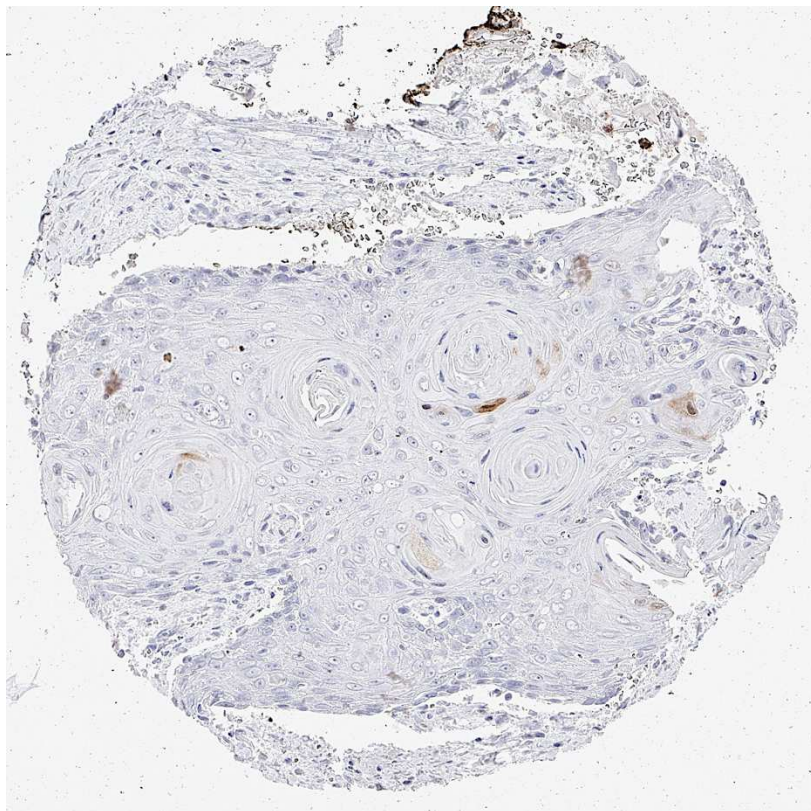


Abbildung 33: **Plattenepithelkarzinom des Analkanals.** Vereinzelt schwache Arginase-1 Färbung in Verhornungszonen.

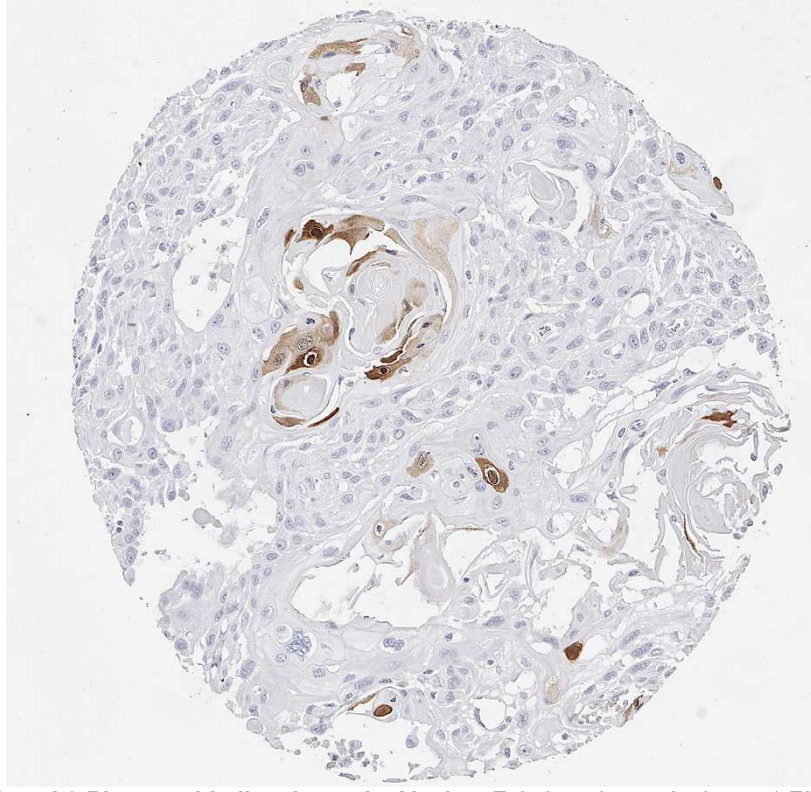


Abbildung 34: **Plattenepithelkarzinom der Vagina.** Fokal moderate Arginase-1 Färbung.

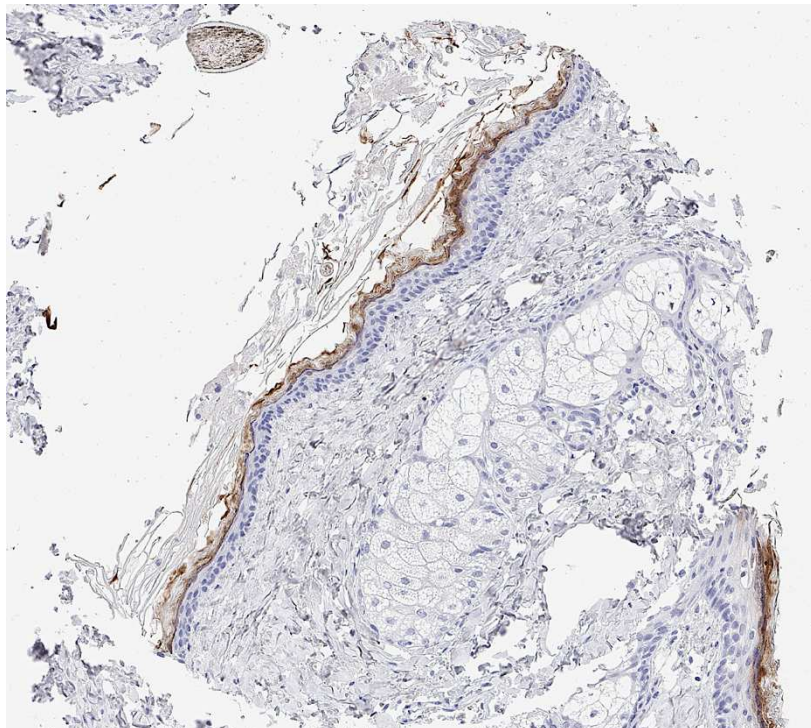


Abbildung 35: **Teratom, Stratum granulosum und Stratum corneum des Plattenepithels.** Moderate Arginase-1 Färbung.

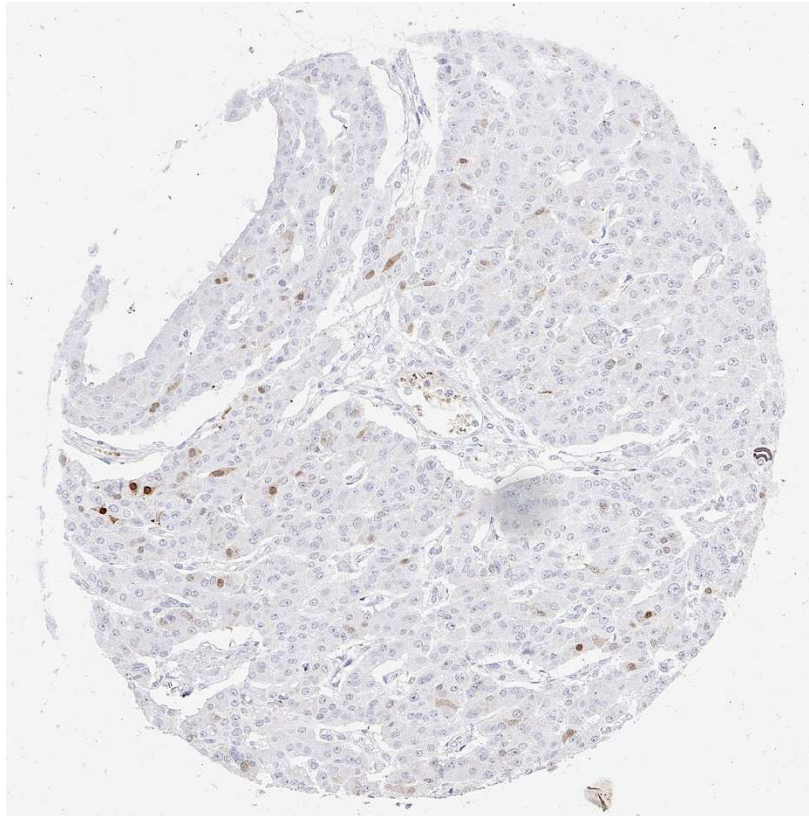


Abbildung 36: **Neuroendokriner Tumor des Pankreas.** Einzelne Arginase-1 positive Zellen (Granulozyten).

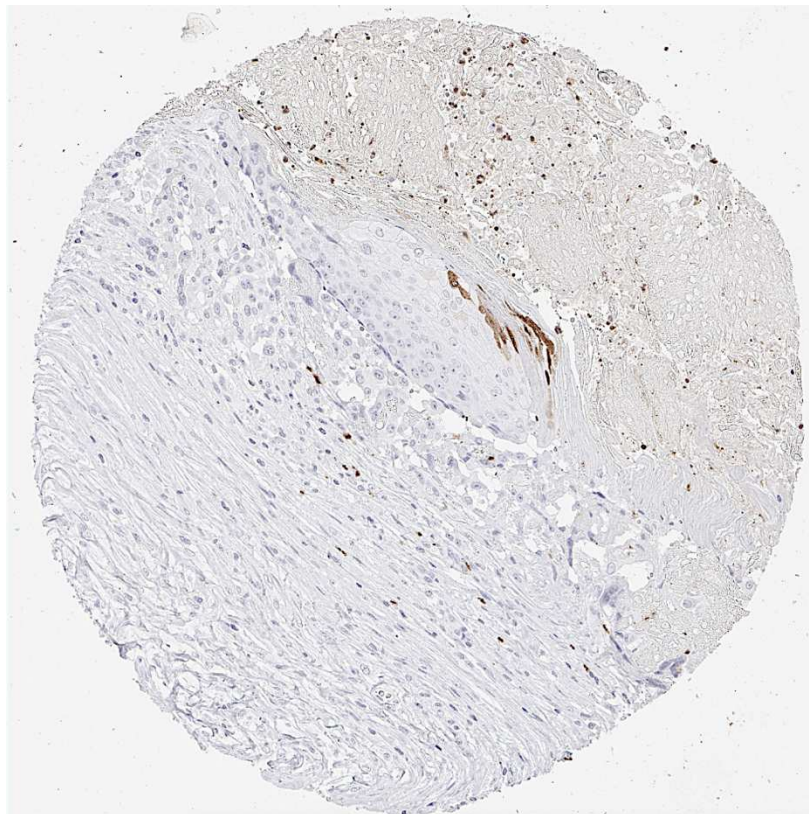


Abbildung 37: **Pilomatricom.** Vereinzelt schwach positive Arginase-1 Zellen, fokal moderat positiv in Verhornungszonen.

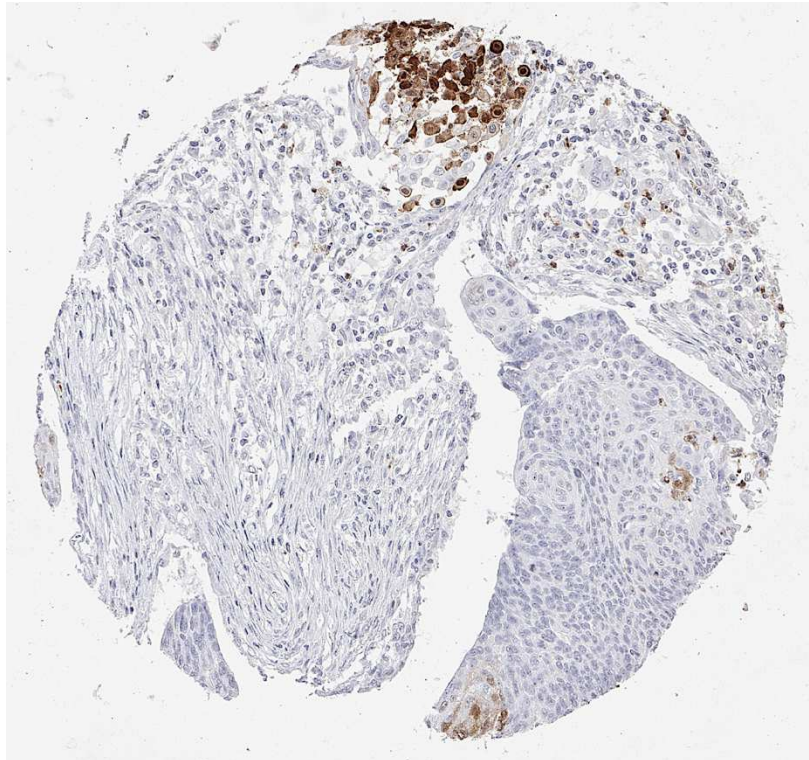


Abbildung 38: **Plattenepithelkarzinom des Ösophagus.** Fokal moderat positive Arginase-1 Färbung in Verhornungszonen.

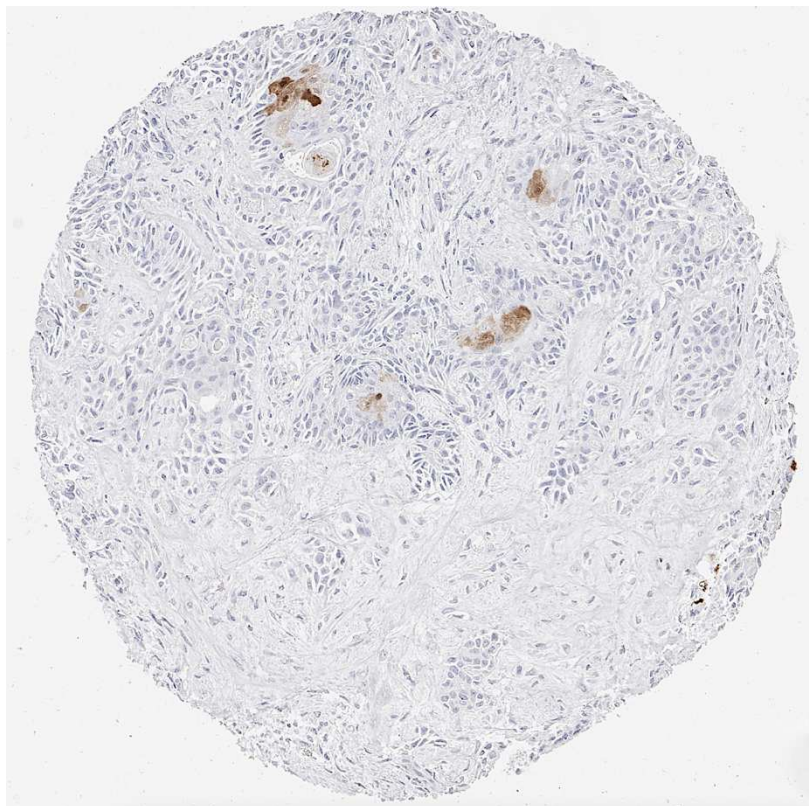


Abbildung 39: **Pleomorphes Adenom der Parotis.** Vereinzelt moderat positive Arginase-1 Zellen in Bereichen plattenepithelialer Differenzierung.

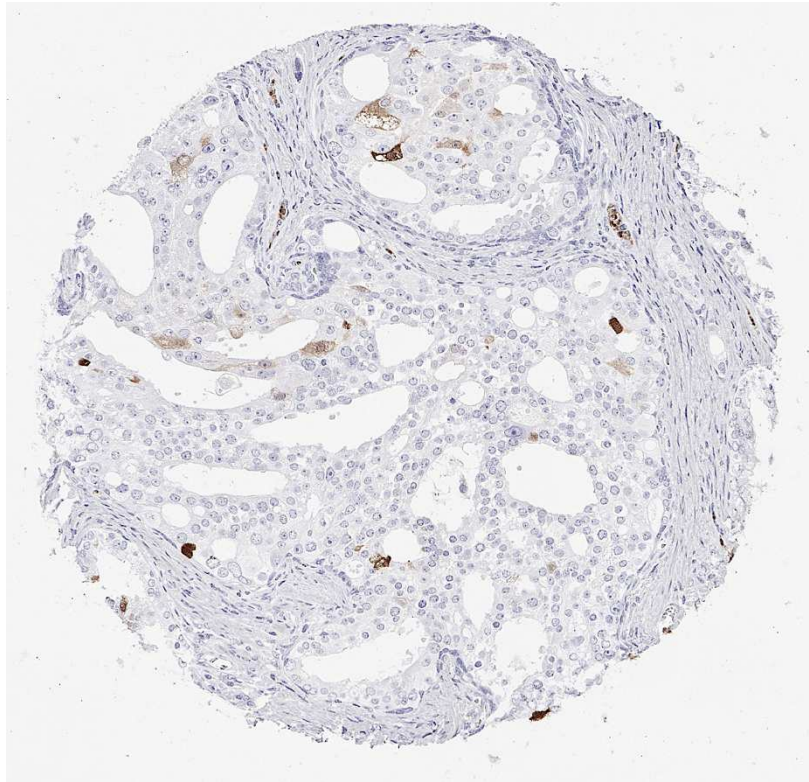


Abbildung 40: Adenokarzinom der Prostata, Rezidiv. Fokal schwach bis moderate Arginase-1 Färbung in wenigen Zellen.

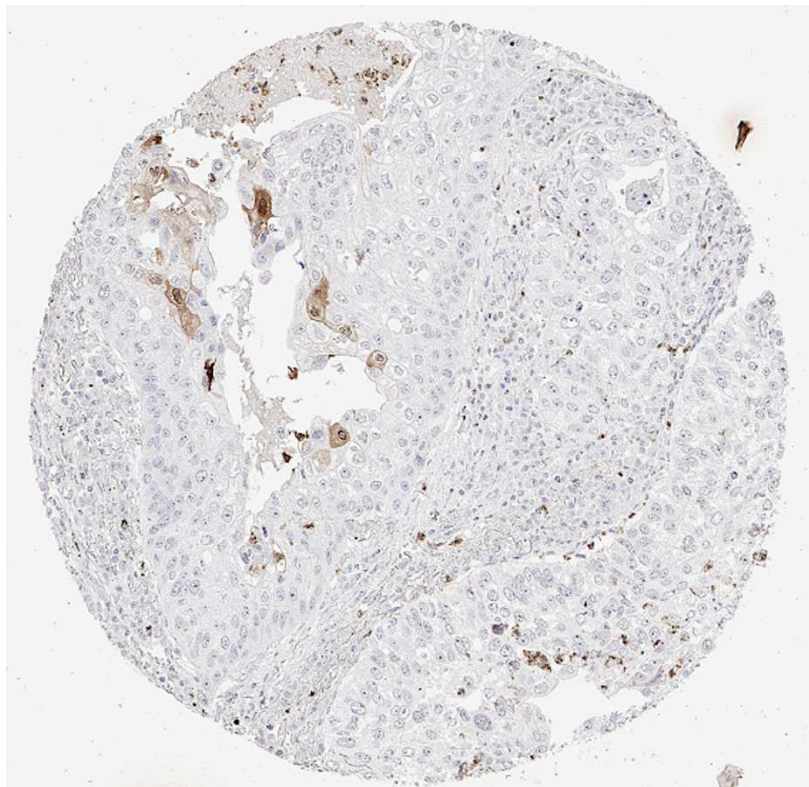


Abbildung 41: Plattenepithelkarzinom der Lunge. Schwache Arginase-1 Färbung in Verhornungszonen.

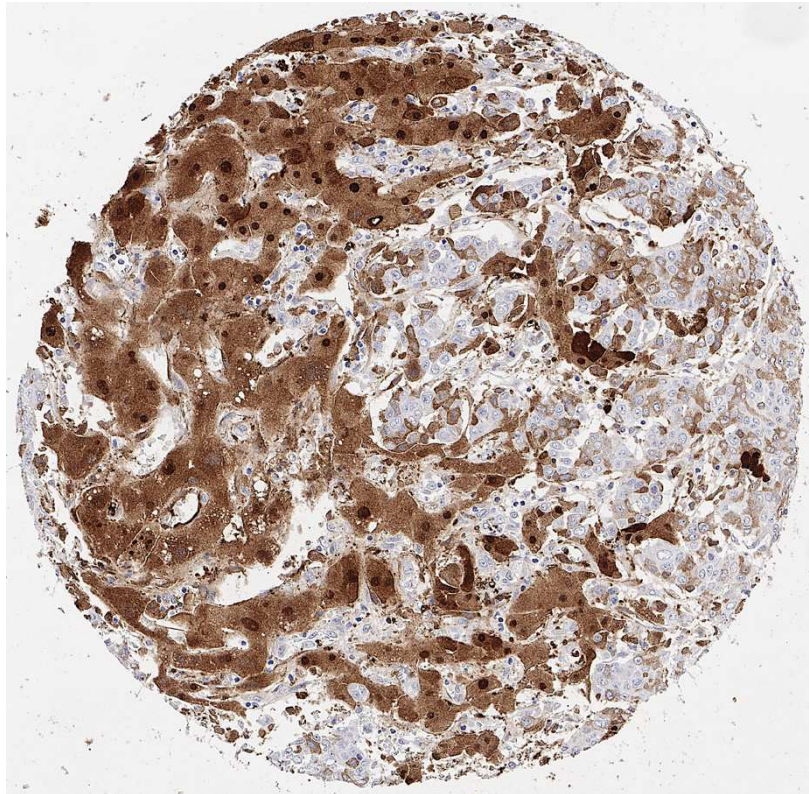


Abbildung 42: **Cholangiozelluläres Karzinom.** Starke zytoplasmatische und nukleäre Arginase-1 Färbung im Rest der normalen Hepatozyten, weitgehend negative Färbung im Tumor.

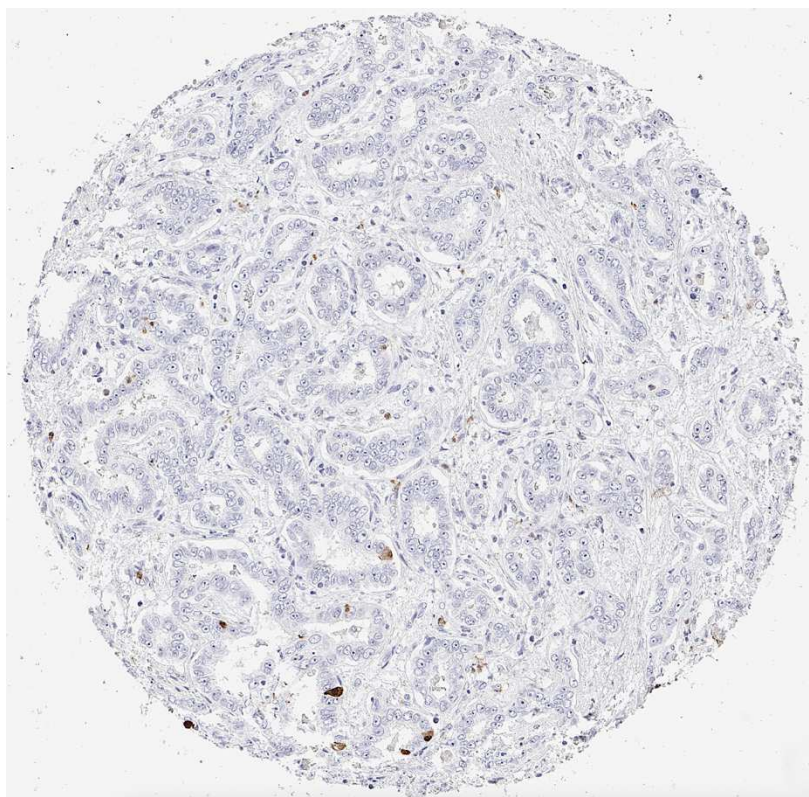


Abbildung 43: **Cholangiozelluläres Karzinom.** Arginase-1 Färbung von Einzelzellen (wahrscheinlich Granulozyten).

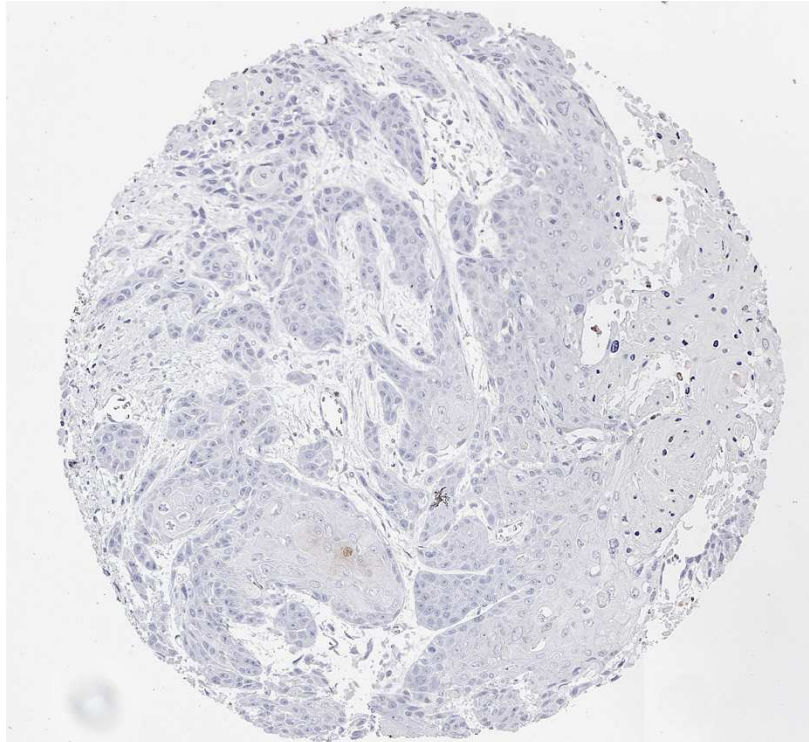


Abbildung 44: **Plattenepithelkarzinom der Zervix.** Schwache Arginase-1 Färbung in Bereichen von Verhornung.

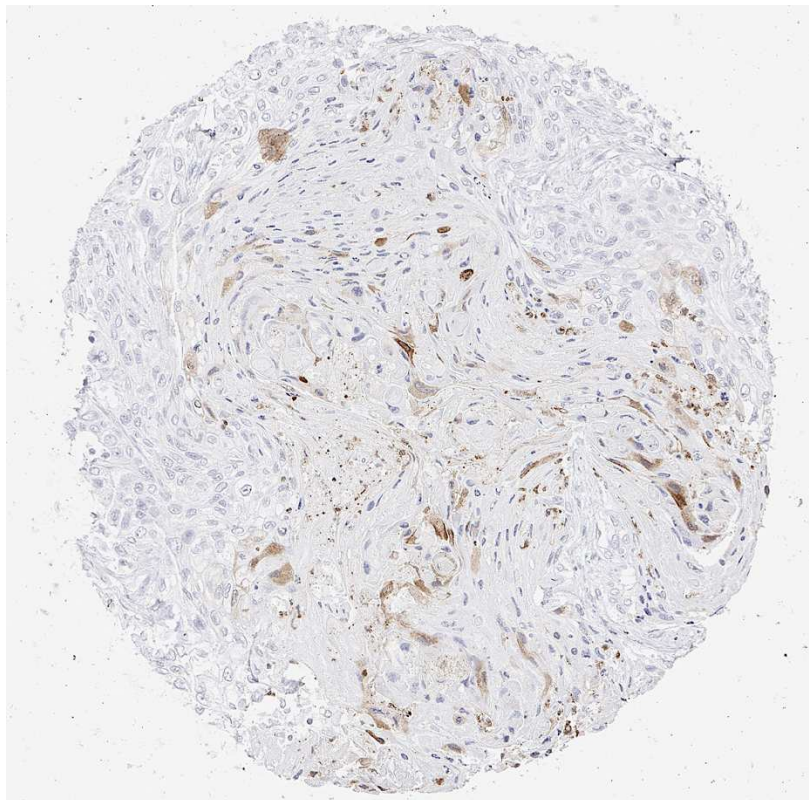


Abbildung 45: **Urothelkarzinom pT2-4 G3.** Fokale Arginase-1 Färbung in Bereichen plattenepithelialer Differenzierung.

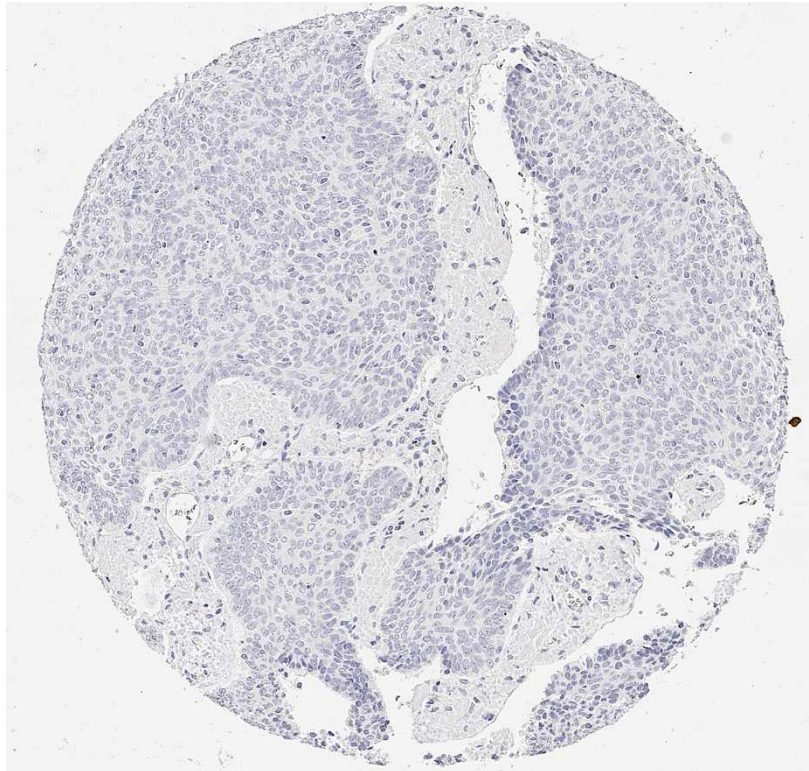


Abbildung 46: **Basalzellkarzinom der Haut.** Negative Arginase-1 Färbung.

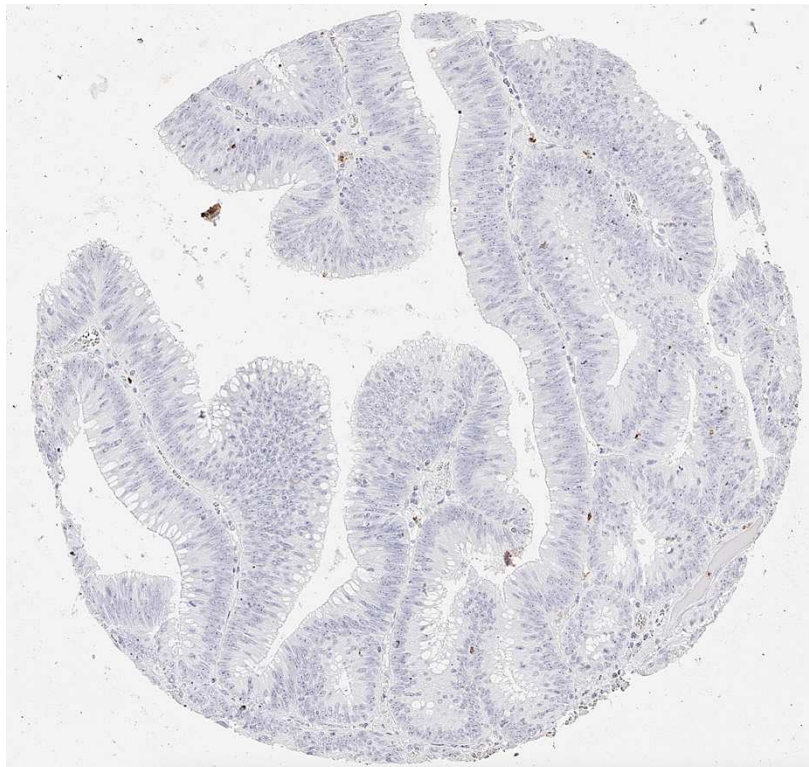


Abbildung 47: **Kolonadenom, low grade.** Negative Arginase-1 Färbung.

3.4 Arginase-1 Expression und klinisch-pathologische Parameter

Zu insgesamt 635 Plattenepithelkarzinomen waren zusätzlich histopathologische Parameter, zu 454 Plattenepithelkarzinomen Daten zum HPV Status verfügbar. Tabelle 10 zeigt die prozentuale Arginase-1 Immunfärbung in 635 Plattenepithelkarzinomen verschiedener Ursprungsorgane. Darunter waren oropharyngeale Plattenepithelkarzinome, pharyngeale Plattenepithelkarzinome, Plattenepithelkarzinome des Larynx, Plattenepithelkarzinome der Zervix, Plattenepithelkarzinome der Vagina, Plattenepithelkarzinome der Vulva, Plattenepithelkarzinome des Penis, Plattenepithelkarzinome der Haut und Plattenepithelkarzinome des Analkanals. Die Untersuchungen ergaben eine signifikante ($p = 0,0025$) Assoziation zwischen hochdifferenzierten Plattenepithelkarzinomen und einer positiven Arginase-1 Immunfärbung. Für die Parameter Tumorgroße sowie dem Fehlen oder Vorhandensein regionärer Lymphknotenmetastasen fand sich kein signifikanter Zusammenhang mit einer Arginase-1 Expression. Auch eine mögliche Beziehung zwischen der Arginase-1 Expression und dem HPV Status in Plattenepithelkarzinomen wurde untersucht. Hierbei zeigte sich keine signifikante Assoziation (Tabelle 11).

Tabelle 10: Ergebnisse der Arginase-1 Immunhistochemie für Plattenepithelkarzinome verschiedener Phänotypen

	Anzahl (n)	neg. (%)	schwach (%)	mod. (%)	stark (%)	p-Wert
pT1	220	93.2	6.4	0.5	0.0	0.0761
pT2	221	94.6	5.4	0.0	0.0	
pT3	81	88.9	7.4	3.7	0.0	
pT4	113	91.2	6.2	2.7	0.0	
pN0	236	91.9	6.4	1.7	0.0	0.6054
pN0+	233	94.0	5.2	0.9	0.0	
G1	28	85.7	10.7	3.6	0.0	0.0025
G2	340	90.3	8.5	1.2	0.0	
G3	226	97.8	1.8	0.4	0.0	

Tabelle 11: Ergebnisse der Arginase-1 Immunhistochemie für HPV positive und negative Plattenepithelkarzinome

	HPV Status	Anzahl (n)	neg. (%)	schwach (%)	mod.(%)	strong (%)	p-Wert
Alle PleCa	negativ	250	90.0	8.4	1.6	0.0	0.7690
	positiv	204	91.7	7.4	1.0	0.0	
Orale PleCa	negativ	56	89.3	8.9	1.8	0.0	0.8193
	positiv	12	91.7	8.3	0.0	0.0	
Pharynx PleCa	negativ	18	94.4	5.6	0.0	0.0	0.4354
	positiv	24	87.5	12.5	0.0	0.0	
Larynx PleCa	negativ	39	89.7	5.1	5.1	0.0	0.5278
	positiv	7	85.7	14.3	0.0	0.0	
Zervix PleCa	negativ	10	100.0	0.0	0.0	0.0	-
	positiv	64	100.0	0.0	0.0	0.0	
Vagina PleCa	negativ	15	93.3	6.7	0.0	0.0	0.2578
	positiv	13	100.0	0.0	0.0	0.0	
Vulva PleCa	negativ	47	87.2	12.8	0.0	0.0	0.1330
	positiv	24	70.8	25.0	4.2	0.0	
Penis PleCa	negativ	26	96.2	3.8	0.0	0.0	0.2657
	positiv	35	88.6	11.4	0.0	0.0	
Haut PleCa	negativ	34	85.3	11.8	2.9	0.0	0.8551
	positiv	1	100.0	0.0	0.0	0.0	
Analkanal PleCa	negativ	5	80.0	20.0	0.0	0.0	0.1347
	positiv	24	95.8	0.0	4.2	0.0	

Verwendete Abkürzung: *PleCa* = Plattenepithelkarzinom.

4. Diskussion

In dieser Studie waren von 14 912 untersuchten Tumoren 12 047 auswertbar. Die Erfolgsrate entspricht dem für Tissue-Microarrays in etwa üblichen Anteil auswertbarer Tumoren. Dass in einigen aus dem Tumorgewebe entnommenen 0,6 mm messenden Gewebeproben keine Tumorzellen enthalten waren, passt zu der biologischen Tatsache, dass es in sehr vielen Tumoren Areale gibt, in denen Stromaanteile oder Entzündungsinfiltrate dominieren, beispielsweise in Zonen, in welchen früher nekrotische Veränderungen aufgetreten sind (Szebeni et al., 2017). Auch das Fehlen von Gewebespots an einigen Koordinatenpositionen spiegelt eine nicht vermeidbare Variabilität in den verwendeten Tumormaterialien wider. Hauptgrund hierfür ist die unterschiedliche Dicke/Tiefe der für den Stanzprozess verwendeten Gewebeblöcke. Die Dicke der Gewebeblöcke definiert die maximale Länge eines aus einem Tumorgewebeblock entnommenen Stanzzyinders. Wegen der unterschiedlichen Länge dieser Zylinder kommt es mit zunehmendem Gebrauch des TMAs zu einer immer größeren Zahl von Schnitten, bei denen einzelne Stanzen „aufgebraucht“ sind. Die Zahl der fehlenden Spots auf einem TMA ist somit Ausdruck der Zahl der vorher bereits angefertigten Schnitte des entsprechenden Blocks. Allerdings kann es auch auf den ersten Schnitten eines TMA Blocks zu fehlenden Gewebespots kommen, weil es in der Praxis schwierig ist, alle Stanzen so in die vorgefertigten Löcher zu deponieren, dass ihre Oberkante exakt auf dem Niveau der Blockoberfläche liegt. Wird die Stanze zu tief eingedrückt, kann es sein, dass die ersten Schnitte durch den TMA Block an der entsprechenden Position noch kein Gewebe zeigen. Hervorzuheben ist allerdings, dass trotz des Ausfalls von 19 % unserer Tumoren die hier vorgestellte Studie mit 12 047 erfolgreich untersuchten Tumoren die mit Abstand größte bisher durchgeführte Studie zur Arginase-1 Expression bei Tumoren darstellt. Die in Tabelle 12 dargestellten wichtigsten 29 früheren Publikationen zur Arginase-1 Immunhistochemie hatten zusammengenommen nur 6 501 Tumoren analysiert.

Tabelle 12: Übersicht bisheriger Studien zur Arginase-1 Immunhistochemie

Studie	Untersuchte Tumorentitäten und Fallzahl (n)
(Yan et al., 2010)	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom (193) - Cholangiozelluläres Karzinom (6) <ul style="list-style-type: none"> - Mammakarzinom NST (23) - Adenokarzinom der Lunge (15) - Adenokarzinom der Prostata (15) - Kolorektales Adenokarzinom (99) <ul style="list-style-type: none"> - Onkozytom (11) - Nierenzellkarzinom (163) - Malignes Melanom (16) <ul style="list-style-type: none"> - Urothelkarzinom (47) - Nebennierenrindenzellkarzinom (6) - Adenokarzinom des Magen (19)
(Obiorah et al., 2019)	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom (40) - Cholangiozelluläres Karzinom (12) <ul style="list-style-type: none"> - Kolonadenom (8) - Neuroendokriner Tumor des Pankreas (2) <ul style="list-style-type: none"> - Adenokarzinom des Pankreas (1) - Nierenzellkarzinom (1) - Kleinzelliges Lungenkarzinom (100) - nicht kleinzelliges Adenokarzinom der Lunge (3) <ul style="list-style-type: none"> - Mammakarzinom NST (5) - Schilddrüsenkarzinom (3) <ul style="list-style-type: none"> - Thymom (50) - Magen Adenokarzinom (3) - Kolorektales Adenokarzinom (10) - Adenokarzinom des Pankreas (7) - Non Hodgkin Lymphom (3)
(Ma et al., 2019)	<ul style="list-style-type: none"> - Kolorektales Adenokarzinom (189) - Kolorektales Karzinom, muzinöser und gemischter Typ (47)
(Ren et al., 2019)	<ul style="list-style-type: none"> - Kolorektales Adenokarzinom (20)
(Clark et al., 2017)	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom (68)
(Labib et al., 2020)	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom (30)
(Zhao et al., 2018)	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom (139) - Cholangiozelluläres Karzinom (29)

(Yan et al., 2011)	<ul style="list-style-type: none"> - Leiomyosarkom (12) - Synovialsarkom (10) - Maligner peripherer Nervenscheidentumor (16) <ul style="list-style-type: none"> -Angiosarkom (7) - Liposarkom (1) - Dermatofibrosarcoma protuberans (18)
(Fujikura et al., 2016)	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom (54) - Cholangiozelluläres Karzinom (34)
(Ye et al., 2013)	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom (167)
(Lagana et al., 2015a)	<ul style="list-style-type: none"> - Adenokarzinom der Ampulla vateri (32) - Kolorektales Adenokarzinom (22)
(Salleng et al., 2015)	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom (5)
(Fatima et al., 2014)	<ul style="list-style-type: none"> - Adenokarzinom des Pankreas (33) - Hepatozelluläres Karzinom (85)
(Srivastava und Ghosh, 2015)	<ul style="list-style-type: none"> - Orales Plattenepithelkarzinom (33) - Plattenepithelkarzinom des Larynx (17)
<p>(Sang et al., 2015)</p> <p>Anmerkung : alle nicht-hepatozellulären Tumoren (n= 228) wurden als eine Gruppe ausgewertet (0,4% positiv). Da nicht aus der Studie entnehmbar war, welches der 228 nicht hepatozellulären Tumoren Positivität zeigte, erscheinen diese nicht in Abbildung 9.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom (78) - Kolorektales Adenokarzinom (28) <ul style="list-style-type: none"> - Mammakarzinom NST (22) - Adenokarzinom des Endometriums (16) - Cholangiozelluläres Karzinom (17) - Adenokarzinom des Pankreas (6) <ul style="list-style-type: none"> - Nierenzellkarzinom (16) - Urothelkarzinom (16) - nicht kleinzelliges Adenokarzinom der Lunge (12) - Adenokarzinom des Ösophagus (10) - Adenokarzinom des Magens (22)
(Krings et al., 2013)	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom (zirrhös) (20) - Hepatozelluläres Karzinom (169) - Cholangiozelluläres Karzinom (16)
(Geramizadeh und Seirfar, 2015)	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom (43) - Cholangiozelluläres Karzinom (19)
(Giedl et al., 2016)	<ul style="list-style-type: none"> - Adenokarzinom der Prostata (557)
(Shahid et al., 2015)	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom (87) - Cholangiozelluläres Karzinom (59)

Fortsetzung Tabelle 12: Übersicht bisheriger Studien zur Arginase-1 Immunhistochemie.

(Timek et al., 2012)	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom (18) - Dottersacktumor (10) - Neuroendokriner Tumor der Lunge (61) - nicht kleinzelliges Adenokarzinom der Lunge (110) - Plattenepithelkarzinom der Lunge (49) <ul style="list-style-type: none"> - Schilddrüsenkarzinom (99) - Nierenzellkarzinom (130) - Kolorektales Adenokarzinom (71) - Adenokarzinom des Ösophagus (30) - Adenokarzinom des Magen (21) <ul style="list-style-type: none"> - Urothelkarzinom (72) - Adenokarzinom der Prostata (136) - Cholangiozelluläres Karzinom (11) <ul style="list-style-type: none"> - Mammakarzinom NST (99) - Lobuläres Mammakarzinom (48) - Endometrioides Endometriumkarzinom (38) <ul style="list-style-type: none"> - Seröses Ovarialkarzinom (46) - Malignes Melanom (100)
(Radwan und Ahmed, 2012)	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom (50) - Cholangiozelluläres Karzinom (12)
(Lu et al., 2021)	<p>Drei Kohorten (welche getrennte ausgewertet wurden) mit insgesamt:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom (1 381) - Cholangiozelluläres Karzinom (261)
(Nguyen et al., 2015)	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom (79)
(Iida et al., 2011)	<ul style="list-style-type: none"> - Cholangiozelluläres Karzinom (28)
(Ming et al., 2020)	<ul style="list-style-type: none"> - Mammakarzinom NST (79)
(Askan et al., 2016)	<ul style="list-style-type: none"> - Azinuszellkarzinom des Pankreas (23)
(Lagana et al., 2015b)	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom (48) - Cholangiozelluläres Karzinom (41) - Adenokarzinom der Ampulla vateri (34)
(You et al., 2018)	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatozelluläres Karzinom (90)
(Czystowska-Kuzmicz et al., 2019)	<ul style="list-style-type: none"> - Epitheliales Ovarialkarzinom (84)
29 Studien	= 6 501 untersuchte Tumoren

Fortsetzung Tabelle 12: Übersicht bisheriger Studien zur Arginase-1 Immunhistochemie.

Studien die nicht nachvollziehbar waren oder Entitäten, die sich nicht in unserem Multitumor-Array fanden sind nicht aufgeführt.

Angesichts der großen Dimension unserer Studie wurde ein besonderes Augenmerk auf die sorgfältige Validierung unseres Assays gelegt. Die internationale Arbeitsgruppe für Antikörpervalidierung (International Working Group for Antibody Validation, IWGAV) hat gefordert, dass alle Antikörper für ihre individuelle Anwendung validiert werden müssen (Uhlen et al., 2016). Für die Immunhistochemie wurde festgelegt, dass es zwei akzeptable Verfahren gibt. Nämlich den Vergleich von immunhistochemisch gewonnenen Expressionsdaten mit Expressionsdaten, welche mit einer anderen unabhängigen Methode gewonnen worden sind oder aber den Vergleich mit immunhistochemischen Befunden, welche mit einem zweiten unabhängigen Antikörper erhoben wurden (Sivertsson et al., 2020). Beide Verfahren kamen in unserer Studie zur Anwendung. Darüber hinaus wurde mit der Untersuchung von 76 verschiedenen Normalgewebekategorien sichergestellt, dass unser Antikörper mit einer möglichst großen Zahl verschiedener Proteine in Kontakt kommt, sodass die Chance maximiert wurde, unerwünschte Kreuzreaktivitäten des Antikörpers zu erkennen. Für den Vergleich der Expressionsanalyse mit einer unabhängigen zweiten Methode wurden RNA Expressionsdaten herangezogen, welche in öffentlich verfügbaren Datenbanken zu verschiedenen Normalgeweben verfügbar sind. Die drei RNA Datenbanken waren der RNA-seq Gewebedatensatz aus dem Human Protein Atlas (HPA) (Fagerberg et al., 2014), das FANTOM5 Projekt (Noguchi et al., 2017) und das Genotype Tissue Expression Projekt (GTEx)(Consortium, 2015). Ein wesentliches Argument für die Spezifität unseres Antikörpers ist der immunhistochemische Nachweis einer Arginase-1 Expression in allen Geweben, bei denen in der RNA Datenbank eine Arginase-1 Expression beschrieben worden war (Leber, Haut, Knochenmark, Granulozyten). Der zusätzliche, ausschließlich immunhistochemisch erbrachte Nachweis einer Arginase-1 Expression in Deziduazellen spricht nicht gegen die Qualität unseres Antikörpers, da Deziduazellen in den untersuchten Geweben (Plazenta, Uterus) einen so seltenen Zelltyp ausmachen, dass bei der RNA Untersuchung des Gesamtorgans diese so unterrepräsentiert seien dürften, dass eine Arginase-1 RNA Expression insgesamt nicht nachweisbar würde. Der Vergleich mit einem zweiten, unabhängigen Antikörper belegt schließlich eindeutig, dass eine Arginase-1 Expression in Deziduazellen tatsächlich vorkommt (Abbildung 48).

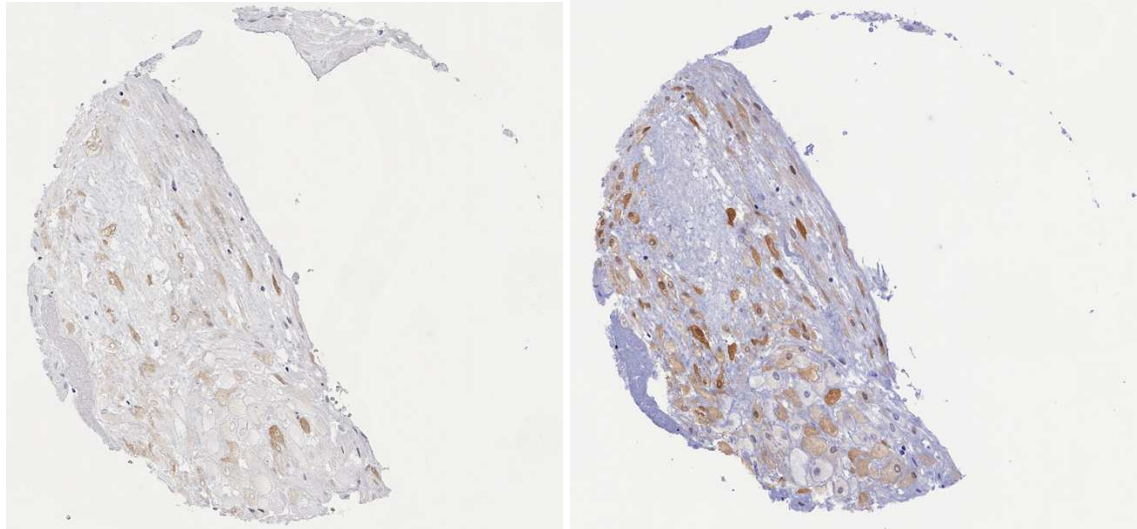


Abbildung 48: **Reife Plazenta**. Links: Arginase-1 Färbung der Deziduazellen mit anti-Arginase-1 Antikörper MSVA-511R, MS Validated Antibodies GmbH Hamburg. Rechts: Arginase-1 Färbung der Deziduazellen mit anti-Arginase-1 Antikörper Cell Marque clone SP156, Cat.#380R-18. Beide Antikörper führen zu eine Färbung der Deziduazellen.

Die erfolgreiche Untersuchung von 12 047 Tumoren von 117 verschiedenen Tumorentitäten zeigte ein Expressionsmuster für Arginase-1, welches eng mit der Arginase-1 Expression in Normalgeweben korrelierte. Eine zytoplasmatische und nukleäre Arginase-1 Expression fand sich ganz überwiegend in hepatozellulären Karzinomen, in der Ausreifungszone von Plattenepithelkarzinomen und in tumorinfiltrierenden Granulozyten. Insgesamt unterstützen die Befunde die hohe Nützlichkeit der Arginase-1 Immunhistochemie zur Bestätigung einer morphologischen oder klinischen Verdachtsdiagnose auf ein primäres Leberzellkarzinom. Dass 87,8 % von 49 erfolgreich untersuchten Leberzellkarzinomen eine starke Arginase-1 Immunfärbung und 95,9 % eine mindestens moderate Arginase-1 Positivität zeigten, passt gut zu früheren Daten. Neun von 21 Studien, welche die Arginase-1 Expression in hepatozellulären Karzinomen untersucht hatten, hatten Positivitätsraten von > 90 % beschrieben (Timek et al., 2012, Krings et al., 2013, Geramizadeh und Seirfar, 2015, Lagana et al., 2015b, Fujikura et al., 2016, Sang et al., 2015, Nguyen et al., 2015, You et al., 2018, Yan et al., 2010). Dass einigen Studien allerdings auch Arginase-1 Positivitäten von lediglich 83,0 % (Shahid et al., 2015), 61,0 % (Lu et al., 2021) oder 44,9 % (Ye et al., 2013) gefunden haben ist durch inhärente Probleme der Immunhistochemie zu erklären. Es ist bekannt, dass unterschiedliche Färbeprotokolle, Antikörper und Auswertekriterien zu signifikanten Unterschieden in den Positivitätsraten in fast allen immunhistochemischen Markern führen. Einige frühere Studien hatten darüber hinaus gezeigt, dass Arginase-1 negative hepatozelluläre Karzinome meistens besonders wenig differenziert sind (Shahid et al., 2015, Yan et al., 2010).

Im Zusammenhang mit den variablen Befunden in der Literatur muss ein in dieser Studie aufgetauchter technischer Aspekt hervorgehoben werden. In zahlreichen Fällen kam es in der Umgebung von stark positiven normalen oder neoplastischen Leberzellen zu einer gering- bis mäßiggradigen manchmal auch starken Arginase-1 Positivität des Stroma oder benachbarter Zellen. Diese Färbung stellt höchstwahrscheinlich ein Kontaminationsartefakt dar, hervorgerufen durch die sehr große Menge an Arginase-1 in vielen normalen und neoplastischen Leberzellen. Ein kleiner Anteil dieser sehr großen Arginase-1 Menge dürfte in Proben mit Kontaminationsartefakten in das umliegende Gewebe diffundiert sein. Diese Diffusion könnte ein physiologisches Phänomen darstellen, wird aber sehr wahrscheinlich durch autolytische Vorgänge oder intravitale Gewebenekrosen begünstigt. Minimale autolytische Vorgänge dürften in größeren Operationspräparaten wie beispielsweise Tumorektomien aus der Leber regelmäßig vorkommen, da der autolytische Prozess bereits intraoperativ nach temporärer Abkoppelung eines Organs vom Blutkreislauf beginnt und auch nach Einbringen des Gewebes in einen formalin角度füllten Topf nicht automatisch sistieren, denn das Formalin durchdringt größere Gewebeknoten nicht unverzüglich (Start et al., 1992). Ähnliche Kontaminationsartefakte ereignen sich auch in anderen Organen, wenn Proteine immunhistochemisch untersucht werden, welche in großer Menge vorkommen. Beispielsweise fand sich in einer früheren Studie zur Thyreoglobulin Expression in Tumoren eine Thyreoglobulin Anfärbung für alle in der Schilddrüse vorkommenden Tumorarten, einschließlich medullärer Karzinome (Steurer et al., 2021). Auch Carboxypeptidase A1 (CPA1), ein in Azinuszellen des Pankreas hoch exprimiertes Protein, führt bei immunhistochemischer Darstellung zu Kontaminationsartefakten in der Umgebung von stark positiven normalen Pankreasepithel (Uhlig et al., 2021). Alle in unserer Studie als Arginase-1 positiv identifizierten cholangiozellulären Karzinome zeigten eine schwache bis moderate, ausschließlich zytoplasmatische Arginase-1 Positivität von meist weniger als 25 % der Tumorzellen. Hätten wir Zellen mit einer schwachen bis mäßiggradigen, rein zytoplasmatischen Arginase-1 Positivität nicht als Arginase-1 positiv gewertet, hätten wir in unserer Studie kein einziges Arginase-1 positives cholangiozelluläres Karzinom identifiziert. Wir erachten es daher als möglich, dass Kontaminationsartefakte für zumindest einen signifikanten Teil der Arginase-1 positiven cholangiozellulären Karzinome verantwortlich sind und dementsprechend auch zu der hohen Variabilität der in der Literatur berichteten Positivitätsdaten beim cholangiozellulären Karzinom von 0 % bis 67,9 % beigetragen haben. Die Art und Weise der Arginase-1 Immunfärbung in Plattenepithelkarzinomen spiegelte in ihrem Verteilungsmuster die Befunde in normalem verhornenden Plattenepithel wider. Eine Arginase-1 Positivität fand sich in Plattenepithelkarzinomen immer nur fokal und eng verbunden mit umschriebenen Ausreifungsstadien des Epithels in unmittelbarer Umgebung von Verhornung.

Diese spezifische Ausreifungszone entspricht der Granularzellschicht des normalen Plattenepithels. Da die Verhornung in Plattenepithelien ein Differenzierungsphänomen ist, verwundert es nicht, dass sich eine signifikante Beziehung zwischen einer Arginase-1 Positivität und einem hohen Differenzierungsgrad von Plattenepithelkarzinomen fand. Das Fehlen einer statistischen Beziehung zwischen Arginase-1 Anfärbung und dem HPV Status in der vorliegenden Studie war nicht zu erwarten, da andere Studien für bestimmte Tumortypen eine signifikante Beziehung zwischen HPV Infektion und der Verhornung in HPV assoziierten Karzinomen angeben (Fujimaki et al., 2013, Rakislova et al., 2017, Broccolo et al., 2018).

Eine Arginase-1 Positivität fand sich nur sehr selten in nicht-hepatozellulären, nicht-plattenepithelialen Karzinomen. In einigen dieser Tumortypen war die Arginase-1 Positivität teilweise mit einer fokalen plattenepithelialen Differenzierung assoziiert, wie beispielsweise in pleomorphen Adenomen oder Urothelkarzinomen. Des Weiteren fand sich eine Arginase-1 Positivität in einem plattenepithelialen Abschnitt eines reifen testikulären Teratoms. Seltene Fälle einer Arginase-1 Positivität in mukusproduzierenden kolorektalen Adenokarzinomen, Klarzellkarzinomen des Ovars, muziösen und lobulären Mammakarzinomen lassen sich am ehesten dadurch erklären, dass letztlich alle Gene sporadisch in Tumoren aktiviert werden können, auch wenn diese im Tumor keine spezielle Funktion ausüben (Esteller, 2008, Pon und Marra, 2015). Es erscheint wahrscheinlich, dass die seltene Arginase-1 Positivität in derartigen Tumoren sogenannte „passenger“ darstellen ohne tumorbiologische Bedeutung.

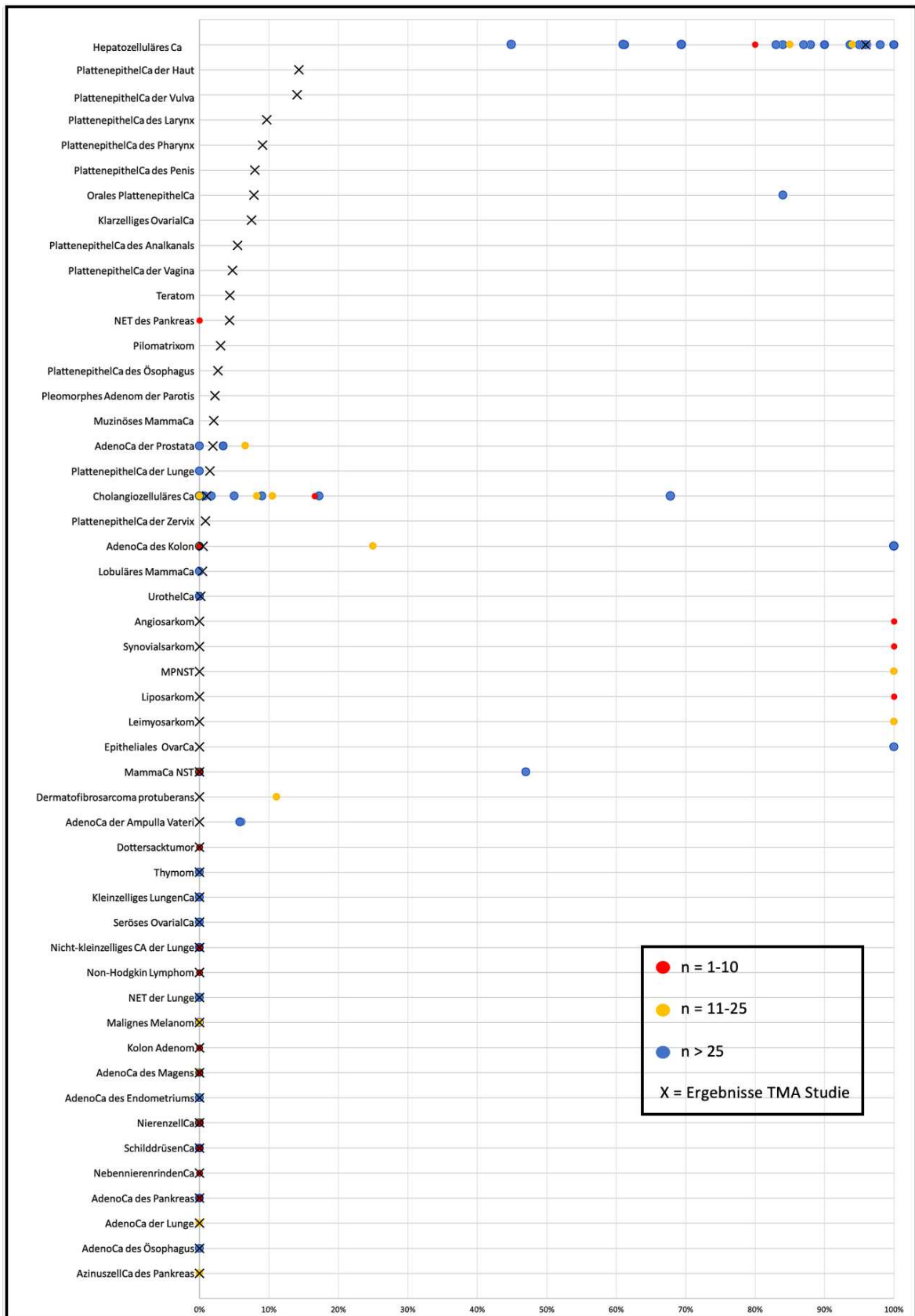


Abbildung 49: Vergleich der Positivitäten der Arginase-1 Färbung unserer Studie mit früheren Studien. Die Kreuze geben unsere Ergebnisse an, jeder Punkt kennzeichnet eine Studie in der der Tumortyp zuvor untersucht wurde. Rote Punkte geben die Untersuchung von 1–10 Fällen, gelbe von 11–25 und blaue von über 25 Fällen pro Studie an. Die Literaturdaten zu den abgebildeten Studien finden sich in Tabelle 12. Verwendete Abkürzungen: Ca Karzinom, NET neuroendokriner Tumor, MPNST maligner peripherer Nervenscheiden Tumor, NST nicht-speziieller Typ.

Die von uns erhobenen Daten leisten einen wesentlichen Beitrag zum Wissen um die Arginase-1 Expression in humanen Tumoren. Die Bedeutung dieser Arbeit lässt sich am besten aus Abbildung 49 ablesen, in der die Ergebnisse früheren Studien zur Arginase-1 Expression zusammen mit unseren eigenen Daten graphisch in Form einer Rangliste der Tumoren nach ihrer Positivitätsrate in unserer Studie dargestellt sind. Unser wichtigster Befund ist, die Bestätigung der sehr häufigen Arginase-1 Expression in hepatozellulären Karzinomen, was gut mit den in der Literatur aufgeführten Daten übereinstimmt. Die Tumortypen, die nach hepatozellulären Karzinomen am häufigsten Arginase-1 Positivität zeigten, sind im wesentlichen Plattenepithelkarzinome, von denen viele Subtypen zuvor nicht untersucht worden sind. Unsere Arbeit identifiziert somit 14 verschiedene Tumorentitäten, welche bisher noch nicht auf eine Arginase-1 Expression untersucht worden waren, als gelegentlich Arginase-1 positiv. Von besonderer Bedeutung ist allerdings auch der fehlende Nachweis einer Arginase-1 Expression in mehreren Tumorarten, bei denen Arginase-1 in früheren Studien in bis zu 100 % als positiv beschrieben worden war. Dazu gehören insbesondere Adenokarzinome des Kolon, Synovialsarkome, Angiosarkome, Maligne periphere Nervenscheidentumoren, Liposarkome, Leiomyosarkome, Ovariakarzinome, Mammakarzinome vom nicht-spezialen Typ und auch cholangiozelluläre Karzinome. Diese Tumorarten fallen aufgrund unserer Befunde unter Anwendung hoch validierter Testverfahren bei Arginase-1 Positivität als differentialdiagnostische Optionen aus.

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Studie, dass eine starke nukleäre und zytoplasmatische Arginase-1 Immunfärbung weitgehend spezifisch für hepatozelluläre Tumoren ist. Aus diagnostischer Sicht muss beim Einsatz der Arginase-1 Immunhistochemie in Leberbiopsien allerdings immer die Möglichkeit eines Kontaminationsartefaktes, bedingt durch freigesetzte Arginase-1 aus nicht-neoplastischen Leberzellen, berücksichtigt werden. Eine fokale Arginase-1 Positivität ist ein häufiges Phänomen in Plattenepithelkarzinomen, welches topografisch eng assoziiert ist mit dem Prozess der Keratinisierung.

5. Zusammenfassung

Arginase-1 ist ein zytosolisches Enzym, das die Umwandlung von Arginin in Ornithin und Harnstoff im letzten Schritt des Harnstoffzyklus katalysiert. Aufgrund seiner überwiegenden Expression in Hepatozyten wird der immunhistochemische Nachweis der Arginase-1-Expression als Marker für hepatozelluläre Karzinome verwendet. Auch bei anderen Tumorentitäten wurde die Expression von Arginase-1 beschrieben. Um die Expression von Arginase-1 in normalem und neoplastischem Gewebe umfassend zu bestimmen, wurde ein Gewebe-Mikroarray mit 14 912 Proben von 117 verschiedenen Tumortypen und -subtypen sowie 608 Proben von 76 verschiedenen normalen Gewebetypen immunhistochemisch analysiert. In normalem Gewebe wurde die Expression von Arginase-1 in der Leber, in der Granularzellschicht der Epidermis und in Granulozyten festgestellt. Bei den Tumoren wurde eine nukleäre und zytoplasmatische Arginase-1-Immunfärbung vor allem beim hepatozellulären Karzinom festgestellt, wobei 88 % der 49 Karzinome eine starke und 96 % eine zumindest moderate Positivität aufwiesen. Obwohl 22 weitere Tumorkategorien in einem viel geringeren Anteil der Fälle eine Arginase-1 Immunfärbung aufwiesen, war eine starke Färbung bei diesen Entitäten äußerst selten. Eine fokale Anfärbung von wenigen Tumorzellen wurde häufig bei Plattenepithelkarzinomen verschiedener Lokalisationen beobachtet. In Analogie zur Arginase-1 Expression des normalen Plattenepithels betraf die Arginase-1 Positivität bei diesen Tumoren typischerweise reifende Zellen mit beginnender Keratinisierung. Dementsprechend war die Arginase-1-Positivität bei 635 Plattenepithelkarzinomen verschiedener Herkunftsorte signifikant mit einem hohen Differenzierungsgrad assoziiert ($p=0,0025$). Seltene positive Tumoren wie Teratome, Urothelkarzinome und pleomorphe Adenome zeigten meist eine Arginase-1-Expression in Bereichen mit plattenepithelialer Differenzierung. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Arginase-1-Immunhistochemie hoch sensitiv und spezifisch für hepatozelluläre Karzinome ist, wenn schwache und fokale Färbungen außer Acht gelassen werden.

6. English Summary

Arginase-1 is a cytosolic enzyme that catalyzes the conversion of arginine to ornithine and urea in the final step of the urea cycle. Because of its predominant expression in hepatocytes, immunohistochemical detection of arginase-1 expression is used as a marker for hepatocellular carcinoma. Other tumor entities were also described to express arginase-1. To comprehensively determine arginase-1 expression in normal and neoplastic tissues, a tissue microarray containing 14 912 samples from 117 different tumor types and subtypes as well as 608 samples of 76 different normal tissue types was analyzed by using immunohistochemistry. In normal tissues, arginase-1 expression was seen in the liver, the granular layer of the epidermis and in granulocytes. Among tumors, a nuclear and cytoplasmic arginase-1 immunostaining was predominantly seen in hepatocellular carcinoma where 88 % of 49 tumors showed strong and 96 % at least moderate positivity. Although 22 additional tumor categories showed arginase immunostaining in a much smaller fraction of cases, strong staining was exceedingly rare in these entities. A focal staining of few tumor cells was often seen in squamous cell carcinomas of various sites. In analogy to arginase expression of normal squamous epithelium, arginase positivity typically involved maturing cells with beginning keratinization in these tumors. Accordingly, arginase-1 positivity was significantly associated with low grade in 635 squamous cell carcinomas of various sites of origin ($p=0,0025$). Rare positive tumors of teratoma, urothelial carcinoma and pleomorphic adenomas also showed arginase expression in areas with squamous differentiation. In summary, arginase-1 immunohistochemistry is highly sensitive and specific for hepatocellular carcinoma if weak and focal staining is disregarded.

7. Abkürzungsverzeichnis

Aqua Dest.....	destilliertes Laborwasser
ATF.....	activator of transcription factor
C/EBP.....	CCAAT/ enhancer binding protein
Ca.....	Karzinom
CMP.....	myeloische Stammzelle
COPD.....	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DAB.....	3'3-Diaminobenzidin
EDRF.....	endothelium derived relaxing factor
ELISA.....	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FOX.....	Foxhead box transcription factor
FPKM.....	Fragments per Kilobase of exon per million reads
GIST.....	Gastrointestinale Stromatumoren
GMP.....	Granulozyten-Monozyten Vorläufer
GRA.....	Granulozyt
GTEX.....	Genotype Tissue Expression Projekt
HE.....	Hämatoxylin-Eosin
HIER.....	Heat induced epitope retrieval
HIF.....	hypoxia inducible factor
HPA.....	Human Protein Atlas
HPV.....	Humanen Papillomvirus
HSC.....	Hämatopoetische Stammzelle
IHC.....	Immunhistochemie
IMP.....	unreife myeloische Vorläuferzelle
IVD.....	in vitro Diagnostika
IWGAV.....	International Working Group for Antibody Validation
kb.....	Kilobase
kDa.....	kiloDalton
MDSC.....	granulozytäre myeloide Suppressorzellen
M-MDSC.....	monozytische myeloide Suppressorzelle
MO.....	Monozyt
MPP.....	Multipotente Vorläuferzelle, Multipotente Vorläuferzelle
mRNA.....	messenger RNA
MTA.....	Multi Tumor Array, Multi Tumor Array, Multi Tumor Array
NET.....	neuroendokriner Tumor
NO.....	Stickstoffmonoxid
NOS.....	Stickstoffsynthase
NOS1.....	Stickstoffsynthase1 (neuronal)
NOS2.....	Stickstoffsynthase2 (induzierbare)
NOS3.....	Stickstoffsynthase3 (endotheliale)
NST.....	nicht-spezzieller Typ
NX.....	Normalized eXpression
OAT.....	Ornithin-Aminotransferase
ODC.....	Ornithindecaboxylase
OTC.....	Ornithin-Transcarbamylase
PeCa.....	Plattenepithelkarzinom
PMN-MDSC.....	polymorphkernige myeloide Suppressorzelle
PMNs.....	polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten
RTU.....	ready-to-use
STAT3.....	signal transducer and activator of transcription3
sTNF.....	löslicher Tumornekrosefaktor
TAM.....	Tumorassoziierte Makrophage
TBS-T.....	Tris-buffered-saline-with-Tween
TBST.....	Tris-buffered-saline-with-Tween
TCGA.....	The Cancer Genome Atlas
TEC.....	Tris-EDTA-Citrat Puffers, Tris-EDTA-Citrat
TMA.....	Tissue-Microarray
TME.....	Tumormikroenvironment
UICC.....	Union for international cancer control

8. Literaturverzeichnis

- ALBAUGH, V. L., PINZON-GUZMAN, C. & BARBUL, A. 2017. Arginine-Dual roles as an onconutrient and immunonutrient. *J Surg Oncol*, 115, 273-280.
- ASH, D. E. 2004. Structure and function of arginases. *J Nutr*, 134, 2760S-2764S; discussion 2765S-2767S.
- ASKAN, G., DESHPANDE, V., KLIMSTRA, D. S., ADSAY, V., SIGEL, C., SHIA, J. & BASTURK, O. 2016. Expression of Markers of Hepatocellular Differentiation in Pancreatic Acinar Cell Neoplasms: A Potential Diagnostic Pitfall. *Am J Clin Pathol*, 146, 163-9.
- AURON, A. & BROPHY, P. D. 2012. Hyperammonemia in review: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Pediatr Nephrol*, 27, 207-22.
- BANIYASH, M. 2004. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol*, 4, 675-87.
- BERKOWITZ, D. E., WHITE, R., LI, D., MINHAS, K. M., CERNETICH, A., KIM, S., BURKE, S., SHOUKAS, A. A., NYHAN, D., CHAMPION, H. C. & HARE, J. M. 2003. Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation*, 108, 2000-6.
- BERUTER, J., COLOMBO, J. P. & BACHMANN, C. 1978. Purification and properties of arginase from human liver and erythrocytes. *Biochem J*, 175, 449-54.
- BLIDNER, A. G., SALATINO, M., MASCANFRONI, I. D., DIAMENT, M. J., BAL DE KIER JOFFE, E., JASNIS, M. A., KLEIN, S. M. & RABINOVICH, G. A. 2015. Differential response of myeloid-derived suppressor cells to the nonsteroidal anti-inflammatory agent indomethacin in tumor-associated and tumor-free microenvironments. *J Immunol*, 194, 3452-62.
- BORREGAARD, N., SORENSEN, O. E. & THEILGAARD-MONCH, K. 2007. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol*, 28, 340-5.
- BOUCHER, J. L., CUSTOT, J., VADON, S., DELAFORGE, M., LEPOIVRE, M., TENU, J. P., YAPO, A. & MANSUY, D. 1994. N omega-hydroxyl-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochem Biophys Res Commun*, 203, 1614-21.
- BROCCOLO, F., CICCARESE, G., ROSSI, A., ANSELMI, L., DRAGO, F. & TONIOLO, A. 2018. Human papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr virus (EBV) in keratinizing versus non-keratinizing squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Infect Agent Cancer*, 13, 32.
- BRONTE, V., BRANDAU, S., CHEN, S. H., COLOMBO, M. P., FREY, A. B., GRETEN, T. F., MANDRUZZATO, S., MURRAY, P. J., OCHOA, A., OSTRAND-ROSENBERG, S., RODRIGUEZ, P. C., SICA, A., UMANSKY, V., VONDERHEIDE, R. H. & GABRILOVICH, D. I. 2016. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun*, 7, 12150.
- BRONTE, V. & ZANOVELLO, P. 2005. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol*, 5, 641-54.
- BUBENDORF, L., NOCITO, A., MOCH, H. & SAUTER, G. 2001. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol*, 195, 72-9.
- CALDWELL, R. W., RODRIGUEZ, P. C., TOQUE, H. A., NARAYANAN, S. P. & CALDWELL, R. B. 2018. Arginase: A Multifaceted Enzyme Important in Health and Disease. *Physiol Rev*, 98, 641-665.
- CALIFANO, J. A., KHAN, Z., NOONAN, K. A., RUDRARAJU, L., ZHANG, Z., WANG, H., GOODMAN, S., GOURIN, C. G., HA, P. K., FAKHRY, C., SAUNDERS, J., LEVINE, M., TANG, M., NEUNER, G., RICHMON, J. D., BLANCO, R., AGRAWAL, N., KOCH, W. M., MARUR, S., WEED, D. T., SERAFINI, P. & BORRELLO, I. 2015. Tadalafil augments tumor specific immunity in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 21, 30-8.

- CEDERBAUM, S. D., SHAW, K. N. & VALENTE, M. 1977. Hyperargininemia. *J Pediatr*, 90, 569-73.
- CHEUNG, W. C., BEAUSOLEIL, S. A., ZHANG, X., SATO, S., SCHIEFERL, S. M., WIELER, J. S., BEAUDET, J. G., RAMENANI, R. K., POPOVA, L., COMB, M. J., RUSH, J. & POLAKIEWICZ, R. D. 2012. A proteomics approach for the identification and cloning of monoclonal antibodies from serum. *Nat Biotechnol*, 30, 447-52.
- CLARK, I., SHAH, S. S., MOREIRA, R., GRAHAM, R. P., WU, T. T., TORBENSON, M. S. & CHANDAN, V. 2017. A subset of well-differentiated hepatocellular carcinomas are Arginase-1 negative. *Hum Pathol*, 69, 90-95.
- CLINICALTRIALS (2000) Arginase Inhibitor INCB001158 as a Single Agent and in Combination With Immune Checkpoint Therapy in Patients With Advanced/Metastatic Solid Tumors [Online in Internet] URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02903914?term=NCT02903914&draw=2&rank=1> [Stand 28.09.2021, 08:01]
- CONSORTIUM, G. T. 2015. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science*, 348, 648-60.
- CRICK, F. 1970. Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227, 561-3.
- CZYSTOWSKA-KUZMICZ, M., SOSNOWSKA, A., NOWIS, D., RAMJI, K., SZAJNIK, M., CHLEBOWSKA-TUZ, J., WOLINSKA, E., GAJ, P., GRAZUL, M., PILCH, Z., ZERROUQI, A., GRACZYK-JARZYNSKA, A., SOROCZYNSKA, K., CIERNIAK, S., KOKTYSZ, R., ELISHAEV, E., GRUCA, S., STEFANOWICZ, A., BLASZCZYK, R., BOREK, B., GZIK, A., WHITESIDE, T. & GOLAB, J. 2019. Small extracellular vesicles containing arginase-1 suppress T-cell responses and promote tumor growth in ovarian carcinoma. *Nat Commun*, 10, 3000.
- DAFF, S. 2010. NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide*, 23, 1-11.
- DIMSKI, D. S. 1994. Ammonia metabolism and the urea cycle: function and clinical implications. *J Vet Intern Med*, 8, 73-8.
- DIZIKES, G. J., GRODY, W. W., KERN, R. M. & CEDERBAUM, S. D. 1986. Isolation of human liver arginase cDNA and demonstration of nonhomology between the two human arginase genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 141, 53-9.
- DURANTE, W., LIAO, L., REYNA, S. V., PEYTON, K. J. & SCHAFER, A. I. 2001. Transforming growth factor-beta(1) stimulates L-arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells: role in polyamine and collagen synthesis. *Circulation*, 103, 1121-7.
- DYSTHE, M. & PARIHAR, R. 2020. Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*, 1224, 117-140.
- EL-MAIS, N., FAKHOURY, I., ABDELLATEF, S., ABI-HABIB, R. & EL-SIBAI, M. 2021. Human recombinant arginase I [HuArgI (Co)-PEG5000]-induced arginine depletion inhibits ovarian cancer cell adhesion and migration through autophagy-mediated inhibition of RhoA. *J Ovarian Res*, 14, 13.
- ELSHEIKH, T. M. & SILVERMAN, J. F. 2019. Fine needle aspiration and core needle biopsy of metastatic malignancy of unknown primary site. *Mod Pathol*, 32, 58-70.
- ESTELLER, M. 2008. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, 358, 1148-59.
- EYER, K., CASTRILLON, C., CHENON, G., BIBETTE, J., BRUHNS, P., GRIFFITHS, A. D. & BAUDRY, J. 2020. The Quantitative Assessment of the Secreted IgG Repertoire after Recall to Evaluate the Quality of Immunizations. *J Immunol*, 205, 1176-1184.
- FAGERBERG, L., HALLSTROM, B. M., OKSVOLD, P., KAMPF, C., DJUREINOVIC, D., ODEBERG, J., HABUKA, M., TAHMASEBPOOR, S., DANIELSSON, A., EDLUND, K., ASPLUND, A., SJOSTEDT, E., LUNDBERG, E., SZIGYARTO, C. A., SKOGS, M., TAKANEN, J. O., BERLING, H., TEGEL, H., MULDER, J., NILSSON, P., SCHWENK, J. M., LINDSKOG, C., DANIELSSON, F., MARDINOGLU, A., SIVERTSSON, A., VON FEILITZEN, K., FORSBERG, M., ZWAHLEN, M., OLSSON, I., NAVANI, S., HUSS, M., NIELSEN, J., PONTEN, F. & UHLEN, M. 2014. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide

- integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 13, 397-406.
- FATIMA, N., COHEN, C. & SIDDIQUI, M. T. 2014. Arginase-1: a highly specific marker separating pancreatic adenocarcinoma from hepatocellular carcinoma. *Acta Cytol*, 58, 83-8.
- FUJIKURA, K., YAMASAKI, T., OTANI, K., KANZAWA, M., FUKUMOTO, T., KU, Y., HIROSE, T., ITOH, T. & ZEN, Y. 2016. BSEP and MDR3: Useful Immunohistochemical Markers to Discriminate Hepatocellular Carcinomas From Intrahepatic Cholangiocarcinomas and Hepatoid Carcinomas. *Am J Surg Pathol*, 40, 689-96.
- FUJIMAKI, M., FUKUMURA, Y., MITANI, K., KURISAKI, A., YOKOYAMA, J., IKEDA, K. & YAO, T. 2013. Histological subtypes and characteristic structures of HPV-associated oropharyngeal carcinoma: study with Japanese cases. *Diagn Pathol*, 8, 211.
- G, S. C., VAN WAARDE, A., I, F. A., DOMLING, A. & P, H. E. 2020. Arginase as a Potential Biomarker of Disease Progression: A Molecular Imaging Perspective. *Int J Mol Sci*, 21.
- GERAMIZADEH, B. & SEIRFAR, N. 2015. Diagnostic Value of Arginase-1 and Glypican-3 in Differential Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma, Cholangiocarcinoma and Metastatic Carcinoma of Liver. *Hepat Mon*, 15, e30336.
- GERARD, A., WOOLFE, A., MOTTET, G., REICHEN, M., CASTRILLON, C., MENRATH, V., ELLOUZE, S., POITOU, A., DOINEAU, R., BRISENO-ROA, L., CANALES-HERRERIAS, P., MARY, P., ROSE, G., ORTEGA, C., DELINCE, M., ESSONO, S., JIA, B., IANNASCOLI, B., RICHARD-LE GOFF, O., KUMAR, R., STEWART, S. N., POUSSE, Y., SHEN, B., GROSSELIN, K., SAUDEMONT, B., SAUTEL-CAILLE, A., GODINA, A., MCNAMARA, S., EYER, K., MILLOT, G. A., BAUDRY, J., ENGLAND, P., NIZAK, C., JENSEN, A., GRIFFITHS, A. D., BRUHNS, P. & BRENNAN, C. 2020. High-throughput single-cell activity-based screening and sequencing of antibodies using droplet microfluidics. *Nat Biotechnol*, 38, 715-721.
- GIEDL, J., BUTTNER-HEROLD, M., WACH, S., WULLICH, B., HARTMANN, A. & AGAIMY, A. 2016. Hepatocyte differentiation markers in adenocarcinoma of the prostate: hepatocyte paraffin 1 but not arginase-1 is specifically expressed in a subset of prostatic adenocarcinoma. *Hum Pathol*, 55, 101-7.
- GOWN, A. M. 2016. Diagnostic Immunohistochemistry: What Can Go Wrong and How to Prevent It. *Arch Pathol Lab Med*, 140, 893-8.
- GRZYWA, T. M., SOSNOWSKA, A., MATRYBA, P., RYDZYNSKA, Z., JASINSKI, M., NOWIS, D. & GOLAB, J. 2020. Myeloid Cell-Derived Arginase in Cancer Immune Response. *Front Immunol*, 11, 938.
- HASKELL, C. M., COCHRAN, A. J., BARSKY, S. H. & STECKEL, R. J. 1988. Metastasis of unknown origin. *Curr Probl Cancer*, 12, 5-58.
- HELANDER, K. G. 1994. Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. *Biotech Histochem*, 69, 177-9.
- HENNO, P., MAUREY, C., LE PIMPEC-BARTHES, F., DEVILLIER, P., DELCLAUX, C. & ISRAEL-BIET, D. 2015. Is arginase a potential drug target in tobacco-induced pulmonary endothelial dysfunction? *Respir Res*, 16, 46.
- HOFF, F. W., LU, Y. & KORNBLAU, S. M. 2019. Antibody Screening. *Adv Exp Med Biol*, 1188, 149-163.
- HUMAN PROTEIN ATLAS (2003) Tissue Protein Expression of Arginase-1. [Online im Internet]. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000118520-ARG1/tissue> [Stand 28.09.2021, 07:30]
- HUMAN PROTEIN ATLAS (2003) Tissue mRNA Expression of Arginase-1. [Online im Internet]. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000118520-ARG1/tissue> [Stand 28.09.2021, 07:42]
- HUMAN PROTEIN ATLAS (2003) mRNA Expression of Arginase-1 in cancer. [Online im Internet]. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000118520-ARG1/pathology> [Stand 28.09.2021, 07:58]

- IIDA, H., HATA, M., KAKUNO, A., HIRANO, H., YAMANEGI, K., YAMADA, N., OHYAMA, H., TERADA, N., YASUI, C., YAMANAKA, N. & NAKASHO, K. 2011. Expression of hepatocyte markers in mass-forming peripheral and periductal-infiltrating hilar intrahepatic cholangiocarcinomas. *Oncol Lett*, 2, 1041-1046.
- INGERSOLL, S. A., LAVAL, J., FORREST, O. A., PREININGER, M., BROWN, M. R., ARAFAT, D., GIBSON, G., TANGPRICHA, V. & TIROUVANZIAM, R. 2015. Mature cystic fibrosis airway neutrophils suppress T cell function: evidence for a role of arginase 1 but not programmed death-ligand 1. *J Immunol*, 194, 5520-8.
- IYER, R., JENKINSON, C. P., VOCKLEY, J. G., KERN, R. M., GRODY, W. W. & CEDERBAUM, S. 1998. The human arginases and arginase deficiency. *J Inherit Metab Dis*, 21 Suppl 1, 86-100.
- JACOBY, M., GOHRBANDT, S., CLAUSSE, V., BRONS, N. H. & MULLER, C. P. 2012. Interindividual variability and co-regulation of DNA methylation differ among blood cell populations. *Epigenetics*, 7, 1421-34.
- JAIN, D. & SALUNKE, D. M. 2019. Antibody specificity and promiscuity. *Biochem J*, 476, 433-447.
- JENKINSON, C. P., GRODY, W. W. & CEDERBAUM, S. D. 1996. Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 114, 107-32.
- KANYO, Z. F., SCOLNICK, L. R., ASH, D. E. & CHRISTIANSON, D. W. 1996. Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature*, 383, 554-7.
- KHALIL, N. & ABI-HABIB, R. J. 2020. [HuArgI (co)-PEG5000]-induced arginine deprivation leads to autophagy dependent cell death in pancreatic cancer cells. *Invest New Drugs*, 38, 1236-1246.
- KONONEN, J., BUBENDORF, L., KALLIONIEMI, A., BARLUND, M., SCHRAML, P., LEIGHTON, S., TORHORST, J., MIHATSCH, M. J., SAUTER, G. & KALLIONIEMI, O. P. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4, 844-7.
- KRINGS, G., RAMACHANDRAN, R., JAIN, D., WU, T. T., YEH, M. M., TORBENSON, M. & KAKAR, S. 2013. Immunohistochemical pitfalls and the importance of glypican 3 and arginase in the diagnosis of scirrhous hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol*, 26, 782-91.
- KUMARI, N. & BANSAL, S. 2021. Arginine depriving enzymes: applications as emerging therapeutics in cancer treatment. *Cancer Chemother Pharmacol*, 88, 565-594.
- LABIB, O. H., HARB, O. A., KHALIL, O. H., BAIOMY, T. A., GERTALLAH, L. M. & AHMED, R. Z. 2020. The Diagnostic Value of Arginase-1, FTCD, and MOC-31 Expression in Early Detection of Hepatocellular Carcinoma (HCC) and in Differentiation Between HCC and Metastatic Adenocarcinoma to the Liver. *J Gastrointest Cancer*, 51, 88-101.
- LACCHINI, R., MUNIZ, J. J., NOBRE, Y. T., COLOGNA, A. J., MARTINS, A. C. & TANUS-SANTOS, J. E. 2015. Relationship between Arginase 1 and Arginase 2 levels and genetic polymorphisms with erectile dysfunction. *Nitric Oxide*, 51, 36-42.
- LACKNER, D. H., BEILHARZ, T. H., MARGUERAT, S., MATA, J., WATT, S., SCHUBERT, F., PREISS, T. & BAHLE, J. 2007. A network of multiple regulatory layers shapes gene expression in fission yeast. *Mol Cell*, 26, 145-55.
- LAGANA, S., HSIAO, S., BAO, F., SEPULVEDA, A., MOREIRA, R., LEFKOWITZ, J. & REMOTTI, H. 2015a. HepPar-1 and Arginase-1 Immunohistochemistry in Adenocarcinoma of the Small Intestine and Ampullary Region. *Arch Pathol Lab Med*, 139, 791-5.
- LAGANA, S. M., SALOMAO, M., REMOTTI, H. E., KNISELY, A. S. & MOREIRA, R. K. 2015b. Bile salt export pump: a sensitive and specific immunohistochemical marker of hepatocellular carcinoma. *Histopathology*, 66, 598-602.
- LANG, S., BRUDEREK, K., KASPAR, C., HOING, B., KANAAN, O., DOMINAS, N., HUSSAIN, T., DROEGE, F., EYTH, C., HADASCHIK, B. & BRANDAU, S. 2018. Clinical Relevance and Suppressing Capacity of Human Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets. *Clin Cancer Res*, 24, 4834-4844.

- LENIS, Y. Y., ELMETWALLY, M. A., MALDONADO-ESTRADA, J. G. & BAZER, F. W. 2017. Physiological importance of polyamines. *Zygote*, 25, 244-255.
- LIN, F. & LIU, H. 2014. Immunohistochemistry in undifferentiated neoplasm/tumor of uncertain origin. *Arch Pathol Lab Med*, 138, 1583-610.
- LIU, V. W. & HUANG, P. L. 2008. Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res*, 77, 19-29.
- LU, S. X., HUANG, Y. H., LIU, L. L., ZHANG, C. Z., YANG, X., YANG, Y. Z., SHAO, C. K., LI, J. M., XIE, D., ZHANG, X., JAIN, D. & YUN, J. P. 2021. alpha-Fetoprotein mRNA in situ hybridisation is a highly specific marker of hepatocellular carcinoma: a multi-centre study. *Br J Cancer*, 124, 1988-1996.
- MA, Z., LIAN, J., YANG, M., WUYANG, J., ZHAO, C., CHEN, W., LIU, C., ZHAO, Q., LOU, C., HAN, J. & ZHANG, Y. 2019. Overexpression of Arginase-1 is an indicator of poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Pathol Res Pract*, 215, 152383.
- MACMICKING, J., XIE, Q. W. & NATHAN, C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*, 15, 323-50.
- MAIER, T., GUELL, M. & SERRANO, L. 2009. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett*, 583, 3966-73.
- MENGEL, M., KREIPE, H. & VON WASIELEWSKI, R. 2003. Rapid and large-scale transition of new tumor biomarkers to clinical biopsy material by innovative tissue microarray systems. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 11, 261-8.
- MINEMURA, M., TAJIRI, K. & SHIMIZU, Y. 2009. Systemic abnormalities in liver disease. *World J Gastroenterol*, 15, 2960-74.
- MING, Z., ZOU, Z., CAI, K., XU, Y. I., CHEN, X., YI, W., LUO, J. & LUO, Z. 2020. ARG1 functions as a tumor suppressor in breast cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 52, 1257-1264.
- MIRLACHER, M., KASPER, M., STORZ, M., KNECHT, Y., DURMULLER, U., SIMON, R., MIHATSCH, M. J. & SAUTER, G. 2004. Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. *Mod Pathol*, 17, 1414-20.
- MODELELL, M., CORRALIZA, I. M., LINK, F., SOLER, G. & EICHMANN, K. 1995. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol*, 25, 1101-4.
- MONIN, L., GRIFFITHS, K. L., LAM, W. Y., GOPAL, R., KANG, D. D., AHMED, M., RAJAMANICKAM, A., CRUZ-LAGUNAS, A., ZUNIGA, J., BABU, S., KOLLS, J. K., MITREVA, M., ROSA, B. A., RAMOS-PAYAN, R., MORRISON, T. E., MURRAY, P. J., RANGEL-MORENO, J., PEARCE, E. J. & KHADER, S. A. 2015. Helminth-induced arginase-1 exacerbates lung inflammation and disease severity in tuberculosis. *J Clin Invest*, 125, 4699-713.
- MUNDER, M. 2009. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol*, 158, 638-51.
- MUNDER, M., MOLLINEDO, F., CALAFAT, J., CANCHADO, J., GIL-LAMAIGNERE, C., FUENTES, J. M., LUCKNER, C., DOSCHKO, G., SOLER, G., EICHMANN, K., MULLER, F. M., HO, A. D., GOERNER, M. & MODELELL, M. 2005. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood*, 105, 2549-56.
- MUNDER, M., SCHNEIDER, H., LUCKNER, C., GIESE, T., LANGHANS, C. D., FUENTES, J. M., KROPF, P., MUELLER, I., KOLB, A., MODELELL, M. & HO, A. D. 2006. Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood*, 108, 1627-34.
- NGUYEN, T., PHILLIPS, D., JAIN, D., TORBENSON, M., WU, T. T., YEH, M. M. & KAKAR, S. 2015. Comparison of 5 Immunohistochemical Markers of Hepatocellular Differentiation for the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*, 139, 1028-34.

- NOGUCHI, S., ARAKAWA, T., FUKUDA, S., FURUNO, M., HASEGAWA, A., HORI, F., ISHIKAWA-KATO, S., KAIDA, K., KAIHO, A., KANAMORI-KATAYAMA, M., KAWASHIMA, T., KOJIMA, M., KUBOSAKI, A., MANABE, R. I., MURATA, M., NAGAO-SATO, S., NAKAZATO, K., NINOMIYA, N., NISHIYORI-SUEKI, H., NOMA, S., SAIJYO, E., SAKA, A., SAKAI, M., SIMON, C., SUZUKI, N., TAGAMI, M., WATANABE, S., YOSHIDA, S., ARNER, P., AXTON, R. A., BABINA, M., BAILLIE, J. K., BARNETT, T. C., BECKHOUSE, A. G., BLUMENTHAL, A., BODEGA, B., BONETTI, A., BRIGGS, J., BROMBACHER, F., CARLISLE, A. J., CLEVERS, H. C., DAVIS, C. A., DETMAR, M., DOHI, T., EDGE, A. S. B., EDINGER, M., EHRLUND, A., EKWALL, K., ENDOH, M., ENOMOTO, H., ESLAMI, A., FAGIOLINI, M., FAIRBAIRN, L., FARACH-CARSON, M. C., FAULKNER, G. J., FERRAI, C., FISHER, M. E., FORRESTER, L. M., FUJITA, R., FURUSAWA, J. I., GEIJTENBEEK, T. B., GINGERAS, T., GOLDOWITZ, D., GUHL, S., GULER, R., GUSTINCICH, S., HA, T. J., HAMAGUCHI, M., HARA, M., HASEGAWA, Y., HERLYN, M., HEUTINK, P., HITCHENS, K. J., HUME, D. A., IKAWA, T., ISHIZU, Y., KAI, C., KAWAMOTO, H., KAWAMURA, Y. I., KEMPFLE, J. S., KENNA, T. J., KERE, J., KHACHIGIAN, L. M., KITAMURA, T., KLEIN, S., KLINKEN, S. P., KNOX, A. J., KOJIMA, S., KOSEKI, H., KOYASU, S., LEE, W., LENNARTSSON, A., MACKAY-SIM, A., MEJHERT, N., MIZUNO, Y., MORIKAWA, H., MORIMOTO, M., MORO, K., MORRIS, K. J., MOTOHASHI, H., et al. 2017. FANTOM5 CAGE profiles of human and mouse samples. *Sci Data*, 4, 170112.
- OBIORAH, I. E., CHAHINE, J., PARK, B. U., KO, K., DEGUZMAN, J. & KALLAKURY, B. 2019. Well differentiated arginase-1 negative hepatocellular carcinoma. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 4, 66.
- PATASSINI, S., BEGLEY, P., REID, S. J., XU, J., CHURCH, S. J., CURTIS, M., DRAGUNOW, M., WALDVOGEL, H. J., UNWIN, R. D., SNELL, R. G., FAULL, R. L. & COOPER, G. J. 2015. Identification of elevated urea as a severe, ubiquitous metabolic defect in the brain of patients with Huntington's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 468, 161-6.
- PEGG, A. E. 1986. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J*, 234, 249-62.
- PON, J. R. & MARRA, M. A. 2015. Driver and passenger mutations in cancer. *Annu Rev Pathol*, 10, 25-50.
- PREISS, T. & HENTZE, M. W. 1998. Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast. *Nature*, 392, 516-20.
- RADWAN, N. A. & AHMED, N. S. 2012. The diagnostic value of arginase-1 immunostaining in differentiating hepatocellular carcinoma from metastatic carcinoma and cholangiocarcinoma as compared to HepPar-1. *Diagn Pathol*, 7, 149.
- RAKISLOVA, N., CLAVERO, O., ALEMANY, L., SACO, A., QUIROS, B., LLOVERAS, B., ALEJO, M., PAWLITA, M., QUINT, W., DEL PINO, M., DE SANJOSE, S., ORDI, J. & GROUP, V. S. 2017. "Histological characteristics of HPV-associated and -independent squamous cell carcinomas of the vulva: A study of 1,594 cases". *Int J Cancer*, 141, 2517-2527.
- RATH, M., MULLER, I., KROPF, P., CLOSS, E. I. & MUNDER, M. 2014. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol*, 5, 532.
- REN, F., WENG, W., ZHANG, Q., TAN, C., XU, M., ZHANG, M., WANG, L., SHENG, W., NI, S. & HUANG, D. 2019. Clinicopathological features and prognosis of AFP-producing colorectal cancer: a single-center analysis of 20 cases. *Cancer Manag Res*, 11, 4557-4567.
- ROBBINS, R. A. & GRISHAM, M. B. 1997. Nitric oxide. *Int J Biochem Cell Biol*, 29, 857-60.

- RODRIGUEZ, P. C., ZEA, A. H., DESALVO, J., CULOTTA, K. S., ZABALETA, J., QUICENO, D. G., OCHOA, J. B. & OCHOA, A. C. 2003. L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J Immunol*, 171, 1232-9.
- ROMANO, A., PARRINELLO, N. L., LA CAVA, P., TIBULLO, D., GIALLONGO, C., CAMIOLO, G., PUGLISI, F., PARISI, M., PIROSA, M. C., MARTINO, E., CONTICELLO, C., PALUMBO, G. A. & DI RAIMONDO, F. 2018. PMN-MDSC and arginase are increased in myeloma and may contribute to resistance to therapy. *Expert Rev Mol Diagn*, 18, 675-683.
- ROMANO, A., PARRINELLO, N. L., VETRO, C., TIBULLO, D., GIALLONGO, C., LA CAVA, P., CHIARENZA, A., MOTTA, G., CARUSO, A. L., VILLARI, L., TRIPODO, C., COSENTINO, S., IPPOLITO, M., CONSOLI, U., GALLAMINI, A., PILERI, S. & DI RAIMONDO, F. 2016. The prognostic value of the myeloid-mediated immunosuppression marker Arginase-1 in classic Hodgkin lymphoma. *Oncotarget*, 7, 67333-67346.
- SALLENG, K. J., REVETTA, F. L., DEANE, N. G. & WASHINGTON, M. K. 2015. The Applicability of a Human Immunohistochemical Panel to Mouse Models of Hepatocellular Neoplasia. *Comp Med*, 65, 398-408.
- SAMSON, M. L. 2000. Drosophila arginase is produced from a nonvital gene that contains the elav locus within its third intron. *J Biol Chem*, 275, 31107-14.
- SANG, W., ZHANG, W., CUI, W., LI, X., ABULAJIANG, G. & LI, Q. 2015. Arginase-1 is a more sensitive marker than HepPar-1 and AFP in differential diagnosis of hepatocellular carcinoma from nonhepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*, 36, 3881-6.
- SAPER, C. B. 2009. A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *J Histochem Cytochem*, 57, 1-5.
- SCHIMKE, R. T. 1962. Differential effects of fasting and protein-free diets on levels of urea cycle enzymes in rat liver. *J Biol Chem*, 237, 1921-4.
- SCHWARTZ, D. C. & PARKER, R. 1999. Mutations in translation initiation factors lead to increased rates of deadenylation and decapping of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 19, 5247-56.
- SERAFINI, P., MECKEL, K., KELSO, M., NOONAN, K., CALIFANO, J., KOCH, W., DOLCETTI, L., BRONTE, V. & BORRELLO, I. 2006. Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med*, 203, 2691-702.
- SHAHID, M., MUBEEN, A., TSE, J., KAKAR, S., BATEMAN, A. C., BORGER, D., RIVERA, M. N., TING, D. T. & DESHPANDE, V. 2015. Branched chain in situ hybridization for albumin as a marker of hepatocellular differentiation: evaluation of manual and automated in situ hybridization platforms. *Am J Surg Pathol*, 39, 25-34.
- SHATANAWI, A., LEMTALSI, T., YAO, L., PATEL, C., CALDWELL, R. B. & CALDWELL, R. W. 2015. Angiotensin II limits NO production by upregulating arginase through a p38 MAPK-ATF-2 pathway. *Eur J Pharmacol*, 746, 106-14.
- SHELDON, K. E., SHANDILYA, H., KEPKA-LENHART, D., POLJAKOVIC, M., GHOSH, A. & MORRIS, S. M., JR. 2013. Shaping the murine macrophage phenotype: IL-4 and cyclic AMP synergistically activate the arginase I promoter. *J Immunol*, 191, 2290-8.
- SIMON, R., MIRLACHER, M. & SAUTER, G. 2004. Tissue microarrays. *Methods Mol Med*, 97, 377-89.
- SIVERTSSON, A., LINDSTROM, E., OKSVOLD, P., KATONA, B., HIKMET, F., VUU, J., GUSTAVSSON, J., SJOSTEDT, E., VON FEILITZEN, K., KAMPF, C., SCHWENK, J. M., UHLEN, M. & LINDSKOG, C. 2020. Enhanced Validation of Antibodies Enables the Discovery of Missing Proteins. *J Proteome Res*, 19, 4766-4781.

- SPARKES, R. S., DIZIKES, G. J., KLISAK, I., GRODY, W. W., MOHANDAS, T., HEINZMANN, C., ZOLLMAN, S., LUSIS, A. J. & CEDERBAUM, S. D. 1986. The gene for human liver arginase (ARG1) is assigned to chromosome band 6q23. *Am J Hum Genet*, 39, 186-93.
- SRIVASTAVA, S. & GHOSH, S. K. 2015. Modulation of L-Arginine-Arginase Metabolic Pathway Enzymes: Immunocytochemistry and mRNA Expression in Peripheral Blood and Tissue Levels in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas in North East India. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16, 7031-8.
- START, R. D., LAYTON, C. M., CROSS, S. S. & SMITH, J. H. 1992. Reassessment of the rate of fixative diffusion. *J Clin Pathol*, 45, 1120-1.
- STEGGERDA, S. M., BENNETT, M. K., CHEN, J., EMBERLEY, E., HUANG, T., JANES, J. R., LI, W., MACKINNON, A. L., MAKKOUK, A., MARGUIER, G., MURRAY, P. J., NEOU, S., PAN, A., PARLATI, F., RODRIGUEZ, M. L. M., VAN DE VELDE, L. A., WANG, T., WORKS, M., ZHANG, J., ZHANG, W. & GROSS, M. I. 2017. Inhibition of arginase by CB-1158 blocks myeloid cell-mediated immune suppression in the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer*, 5, 101.
- STEURER, S., SCHNEIDER, J., BUSCHECK, F., LUEBKE, A. M., KLUTH, M., HUBEMAGG, C., HINSCH, A., HOFLMAYER, D., WEIDEMANN, S., FRAUNE, C., MOLLER, K., MENZ, A., BERNREUTHER, C., LEBOK, P., SAUTER, G., SIMON, R., JACOBSEN, F., UHLIG, R., WILCZAK, W., MINNER, S., BURANDT, E., KRECH, R. H., DUM, D., KRECH, T., MARX, A. H. & CLAUDITZ, T. S. 2021. Immunohistochemically detectable thyroglobulin expression in extrathyroidal cancer is 100% specific for thyroidal tumor origin. *Ann Diagn Pathol*, 54, 151793.
- SUN, A., CROMBEZ, E. A. & WONG, D. 1993. Arginase Deficiency. In: ADAM, M. P., ARDINGER, H. H., PAGON, R. A., WALLACE, S. E., BEAN, L. J. H., MIRZAA, G. & AMEMIYA, A. (eds.) *GeneReviews(R)*. Seattle (WA).
- SWAYDEN, M., BEKDASH, A., FAKHOURY, I., EL-ATAT, O., BORJAC-NATOUR, J., EL-SIBAI, M. & ABI-HABIB, R. J. 2021. Activation of autophagy following [HuArgI (Co)-PEG5000]-induced arginine deprivation mediates cell death in colon cancer cells. *Hum Cell*, 34, 152-164.
- SZEBENI, G. J., VIZLER, C., KITAJKA, K. & PUSKAS, L. G. 2017. Inflammation and Cancer: Extra- and Intracellular Determinants of Tumor-Associated Macrophages as Tumor Promoters. *Mediators Inflamm*, 2017, 9294018.
- TAKIGUCHI, M., HARAGUCHI, Y. & MORI, M. 1988. Human liver-type arginase gene: structure of the gene and analysis of the promoter region. *Nucleic Acids Res*, 16, 8789-802.
- TESI, R. J. 2019. MDSC; the Most Important Cell You Have Never Heard Of. *Trends Pharmacol Sci*, 40, 4-7.
- TIMEK, D. T., SHI, J., LIU, H. & LIN, F. 2012. Arginase-1, HepPar-1, and Glypican-3 are the most effective panel of markers in distinguishing hepatocellular carcinoma from metastatic tumor on fine-needle aspiration specimens. *Am J Clin Pathol*, 138, 203-10.
- TORHORST, J., BUCHER, C., KONONEN, J., HAAS, P., ZUBER, M., KOCHLI, O. R., MROSS, F., DIETERICH, H., MOCH, H., MIHATSCH, M., KALLIONIEMI, O. P. & SAUTER, G. 2001. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*, 159, 2249-56.
- UHLEN, M., BANDROWSKI, A., CARR, S., EDWARDS, A., ELLENBERG, J., LUNDBERG, E., RIMM, D. L., RODRIGUEZ, H., HILTKE, T., SNYDER, M. & YAMAMOTO, T. 2016. A proposal for validation of antibodies. *Nat Methods*, 13, 823-7.
- UHLIG, R., WEIDENMANN, S., HOEFLMAYER, D., MINNER, S., SAUTER, G., SIMON, R., CLAUDITZ, T., DUM, D. Carboxypeptidase A1 (CPA1) immunohistochemistry is highly sensitive and specific for acinar cell carcinoma (ACC) of the pancreas. Online- Vorveröffentlichung. [https://www.pathologyjournal.rcpa.edu.au/article/S0031-3025\(21\)00328-7/fulltext](https://www.pathologyjournal.rcpa.edu.au/article/S0031-3025(21)00328-7/fulltext).
- UHR, J. W. 1984. The 1984 Nobel Prize in medicine. *Science*, 226, 1025-8.

- VOCKLEY, J. G., GOODMAN, B. K., TABOR, D. E., KERN, R. M., JENKINSON, C. P., GRODY, W. W. & CEDERBAUM, S. D. 1996a. Loss of function mutations in conserved regions of the human arginase I gene. *Biochem Mol Med*, 59, 44-51.
- VOCKLEY, J. G., JENKINSON, C. P., SHUKLA, H., KERN, R. M., GRODY, W. W. & CEDERBAUM, S. D. 1996b. Cloning and characterization of the human type II arginase gene. *Genomics*, 38, 118-23.
- VONWIRTH, V., BULBUL, Y., WERNER, A., ECHCHANNAOUI, H., WINDSCHMITT, J., HABERMEIER, A., IOANNIDIS, S., SHIN, N., CONRADI, R., BROS, M., TENZER, S., THEOBALD, M., CLOSS, E. I. & MUNDER, M. 2020. Inhibition of Arginase 1 Liberates Potent T Cell Immunostimulatory Activity of Human Neutrophil Granulocytes. *Front Immunol*, 11, 617699.
- WAIGEL, S., RENDON, B. E., LAMONT, G., RICHIE, J., MITCHELL, R. A. & YADDANAPUDI, K. 2016. MIF inhibition reverts the gene expression profile of human melanoma cell line-induced MDSCs to normal monocytes. *Genom Data*, 7, 240-2.
- WANG, H., RAN, J. & JIANG, T. 2014. Urea. *Subcell Biochem*, 73, 7-29.
- WERNER, M., CHOTT, A., FABIANO, A. & BATTIFORA, H. 2000. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*, 24, 1016-9.
- WERNER, M., VON WASIELEWSKI, R. & KOMMINOTH, P. 1996. Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol*, 105, 253-60.
- WINE, Y., BOUTZ, D. R., LAVINDER, J. J., MIKLOS, A. E., HUGHES, R. A., HOI, K. H., JUNG, S. T., HORTON, A. P., MURRIN, E. M., ELLINGTON, A. D., MARCOTTE, E. M. & GEORGIU, G. 2013. Molecular deconvolution of the monoclonal antibodies that comprise the polyclonal serum response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 2993-8.
- WINE, Y., HORTON, A. P., IPPOLITO, G. C. & GEORGIU, G. 2015. Serology in the 21st century: the molecular-level analysis of the serum antibody repertoire. *Curr Opin Immunol*, 35, 89-97.
- WU, G., BAZER, F. W., DAVIS, T. A., KIM, S. W., LI, P., MARC RHOADS, J., CAREY SATTERFIELD, M., SMITH, S. B., SPENCER, T. E. & YIN, Y. 2009. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*, 37, 153-68.
- YAMASHITA, S. 2007. Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry. *Prog Histochem Cytochem*, 41, 141-200.
- YAN, B. C., GONG, C., SONG, J., KRAUSZ, T., TRETIAKOVA, M., HYJEK, E., AL-AHMADIE, H., ALVES, V., XIAO, S. Y., ANDERS, R. A. & HART, J. A. 2010. Arginase-1: a new immunohistochemical marker of hepatocytes and hepatocellular neoplasms. *Am J Surg Pathol*, 34, 1147-54.
- YAN, X., TAKAHARA, M., XIE, L., GONDO, C., SETSU, N., ODA, Y., TAKEUCHI, S., TU, Y., MOROI, Y. & FURUE, M. 2011. Arginine metabolism in soft tissue sarcoma. *J Dermatol Sci*, 61, 211-5.
- YANG, B. & BANKIR, L. 2005. Urea and urine concentrating ability: new insights from studies in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 288, F881-96.
- YANG, Z. & MING, X. F. 2014. Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Front Immunol*, 5, 533.
- YAZIJI, H. & BARRY, T. 2006. Diagnostic Immunohistochemistry: what can go wrong? *Adv Anat Pathol*, 13, 238-46.
- YE, Y., HUANG, A., HUANG, C., LIU, J., WANG, B., LIN, K., CHEN, Q., ZENG, Y., CHEN, H., TAO, X., WEI, G. & WU, Y. 2013. Comparative mitochondrial proteomic analysis of hepatocellular carcinoma from patients. *Proteomics Clin Appl*, 7, 403-15.
- YOU, J., CHEN, W., CHEN, J., ZHENG, Q., DONG, J. & ZHU, Y. 2018. The Oncogenic Role of ARG1 in Progression and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma. *Biomed Res Int*, 2018, 2109865.

- ZHAO, C. L., HUI, Y., WANG, L. J., YANG, D., YAKIREVICH, E., MANGRAY, S., HUANG, C. K. & LU, S. 2018. Alanine-glyoxylate aminotransferase 1 (AGXT1) is a novel marker for hepatocellular carcinomas. *Hum Pathol*, 80, 76-81.
- ZHAO, G., CHEN, W., HE, J., CUI, C., ZHAO, L., ZHAO, Y., SUN, C., NIE, D., JIN, F. & KONG, L. 2020. Analysis of Cyclooxygenase 2, Programmed Cell Death Ligand 1, and Arginase 1 Expression in Human Pituitary Adenoma. *World Neurosurg*, 144, e660-e673.
- ZHU, M., GOETSCH, S. C., WANG, Z., LUO, R., HILL, J. A., SCHNEIDER, J., MORRIS, S. M., JR. & LIU, Z. P. 2015. FoxO4 promotes early inflammatory response upon myocardial infarction via endothelial Arg1. *Circ Res*, 117, 967-77.

9. Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Professor Guido Sauter für die Möglichkeit wertvolle Einblicke in das Fach der Pathologie zu erlangen sowie für seine außerordentlich konstruktive Betreuung dieser Promotionsarbeit. Auch dem restlichen Team der Pathologie, vor allem Melanie Witt sowie PD Dr. Ronald Simon, danke ich für die wissenschaftliche Betreuung. Der größte Dank gilt meinen Eltern, Nicole und Michael Gehrig, die mich mit allen Mitteln unterstützt haben und ohne die diese Promotionsarbeit nicht möglich gewesen wäre. Zusätzlich danke ich meinen Großeltern, insbesondere meinem wissenschaftlichen Vorbild und Großvater, Dietrich Overhoff, für sein Interesse und seine ansteckende Begeisterungsfähigkeit für das wissenschaftliche Arbeiten.

10. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

11. Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Unterschrift: