

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. Guido Sauter

## **Expression von GP2 und CELA3B in menschlichen Tumoren und Normalgeweben; Eine Tissue-Microarray-Studie an 13.223 Tumoren**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Nina Bröker  
aus Winsen Luhe

Hamburg 2021

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 05.05.2022**

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

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. rer. nat. Dipl.-Med. Boris  
Fehse**

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

# Inhaltsverzeichnis

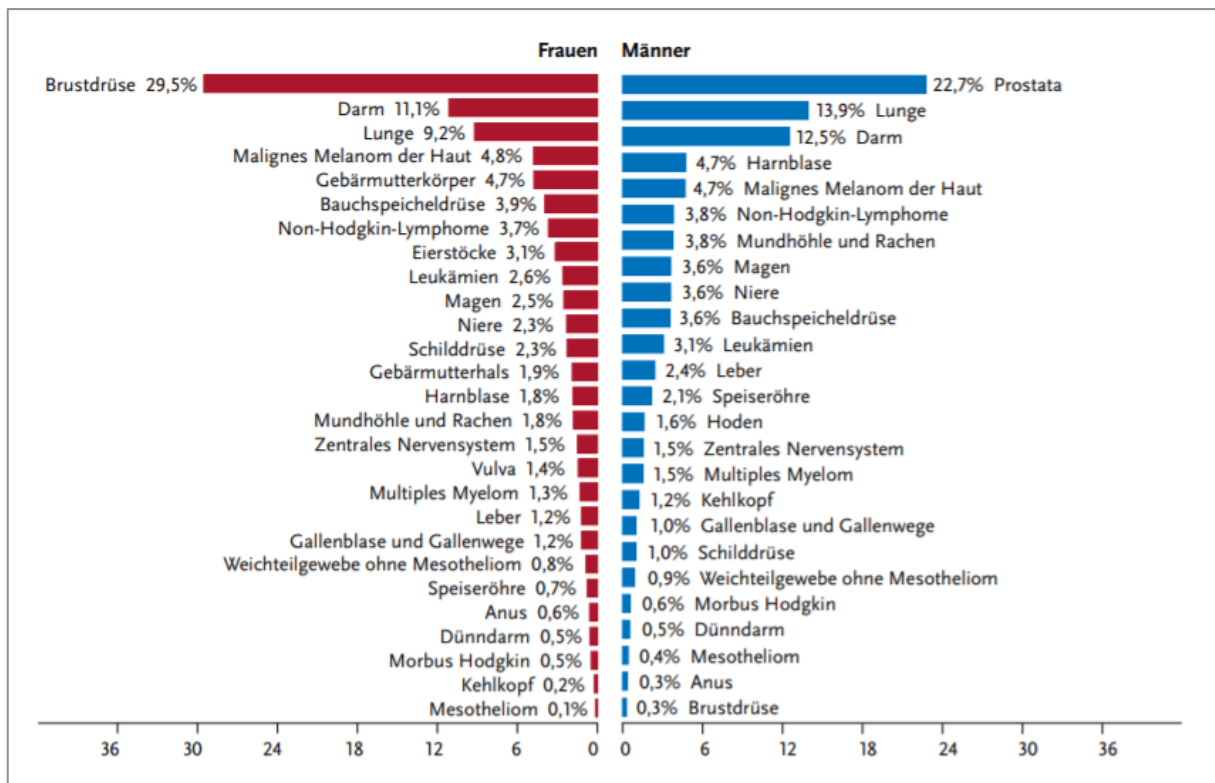
1. Einleitung.....	1
1.1 Azinuszellkarzinom.....	2
1.2 GP2.....	6
1.2.1 Aufbau und Struktur .....	6
1.2.2 Funktion von GP2.....	9
1.2.3 klinische Bedeutung von GP2 .....	10
1.2.4 GP2 und die Bedeutung in Tumoren.....	12
1.3 CELA3B.....	13
1.3.1 Aufbau und Struktur .....	14
1.3.2 Funktion von CELA3B .....	14
1.3.3 klinische Bedeutung von CELA3B.....	15
1.3.4 CELA3B und die Bedeutung in Tumoren .....	16
1.4 Ziel dieser Arbeit .....	18
2. Material und Methoden .....	18
2.1 Tissue Microarray-Technik.....	18
2.2 Für die Studie verwendete TMA-Blöcke.....	22
2.3 Immunhistochemie .....	27
2.4 Immunhistochemische Untersuchungen im Rahmen der Studie .....	29
2.5 Auswertung der Färbung am Tumor TMA.....	31
2.6 Statistik.....	32
3. Ergebnisse .....	32
3.3 CELA3B.....	32
3.3.1 CELA3B in Normalgeweben.....	32
3.1.2 CELA3B in Tumorgeweben.....	36
3.4 GP2 .....	41
3.4.1 GP2 in Normalgeweben .....	41
3.2.2 GP2 in Tumorgeweben .....	45
4. Diskussion.....	55
5. Zusammenfassung.....	65
5.1 Deutsche Zusammenfassung.....	65
5.2 Abstract .....	66
6. Abkürzungsverzeichnis .....	67
7. Literaturverzeichnis .....	68
8. Danksagung .....	80
9. Lebenslauf.....	81
10. Eidesstattliche Erklärung.....	

## 1. Einleitung

Die Lebenszeitprävalenz an einem malignen Tumor zu erkranken beträgt in der westlichen Welt circa 50% und bis zu einem Viertel der Betroffenen verstirbt an den Folgen ihrer Erkrankung. Somit zählt eine maligne Erkrankung zu den Haupttodesursachen (Koch-Institut, Robert und Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. 2019).

Allein in Deutschland erkranken rund 500.000 Menschen jährlich an Krebs. Diese Schätzung stammt von dem Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) des Robert Koch-Instituts, welches die anonymisierten Daten der epidemiologischen Landeskrebsregister auf Bundesebene zusammenführt. Es wird davon ausgegangen, dass die Zahl der Neuinzidenzen bis zum Jahre 2030 um bis zu 23% weiter ansteigen wird. Zu den Hauptursachen zählen neben der demographischen Entwicklung Lifestylefaktoren wie beispielsweise Ernährungs- und Konsumverhalten sowie Umweltfaktoren (Koch-Institut, Robert und Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. 2019).

Das Pankreaskarzinom zählt zu den malignen Neoplasien des Gastrointestinaltrakts. Laut Daten des Zentrums für Krebsregisterdaten erkrankten daran in Deutschland etwa 18.700 Menschen im Jahr 2017. Bezüglich des prozentualen Anteils der am häufigsten vorkommenden Tumorlokalisationen aller Krebserkrankungen steht das Pankreaskarzinom in der deutschen Krebsstatistik bei den Männern an zehnter (3,6%) und bei den Frauen an sechster Stelle (3,9%) (Stand: 2016). Im Hinblick auf die Krebstodesfälle belegt es bei beiden Geschlechtern den vierten Rang (Stand; 2016). Dies verdeutlicht die durchaus schlechte Prognose der Erkrankung mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von gerade einmal 9% (Koch-Institut, Robert und Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. 2019).



**Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebserkrankungen in Deutschland 2016 (Koch-Institut, Robert und Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. 2019)**

Bauchspeicheldrüsentumore stehen bei Männern an zehnter Stelle und bei Frauen an sechster Stelle.

Bei der Klassifikation maligner Neoplasien des Pankreas wird zwischen duktal, azinär und neuroendokrin unterschieden (Klimstra et al. 2009). Die Mehrzahl der Tumoren des Pankreas sind maligner Art und entstehen aus dem exokrinen Anteil der Bauchspeicheldrüse (Reznek und Stephens 1993; Kelly und Benjamin 1995). Das duktale Adenokarzinom mit seinen Untergruppen bildet mit ca. 80-90% die überwiegende Mehrheit der Pankreaskarzinome (Fitzgerald et al. 2008). Andere maligne Tumoren treten demnach in ca. 10% der Fälle auf. Neben dem duktalem Adenokarzinom zählen auch das Pankreatoblastom, solide pseudopapilläre Neoplasien sowie das Azinuszellkarzinom zu den weiteren malignen epithelialen Tumoren des Pankreas (WHO classification of tumours 2019).

## 1.1 Azinuszellkarzinom

Bei dem Azinuszellkarzinom handelt es sich um eine seltene maligne pankreatische epitheliale Neoplasie mit azinärer Zelldifferenzierung. Das Karzinom macht etwa 1-2% der Bauchspeicheldrüsen Tumoren bei Erwachsenen und etwa 15% bei Kindern aus und gilt damit als seltener Tumor des Erwachsenenalters (Holen et al. 2002; Klimstra und Adsay

2016). Das Durchschnittsalter der Patienten liegt bei 60 Jahren und das männliche Geschlecht ist häufiger betroffen (La Rosa et al. 2012).

Es wird angenommen, dass die meisten Azinuszellkarzinome sporadisch auftreten. Es existieren wenig dokumentierte Fälle, die das Karzinom in Zusammenhang mit dem Lynch-Syndrom, dem Carney-Komplex und der familiären adenomatösen Polyposis bringen (La Rosa et al. 2012; Lowery et al. 2011; Gaujoux et al. 2011; Seket et al. 2003).

Bezüglich der Pathogenese der Erkrankung ist bislang wenig bekannt. Jäkel et al. untersuchten in einer Genom-weiten Analyse sogenannte Mutationssignaturen. Die Studie gibt Hinweise auf Tabakkonsum als Risikofaktor und eine defekte DNA-Reparatur in den Tumoren (Jäkel et al. 2017). Eine komparative genomische Hybridisierung zeigte dementsprechend ein hohes Maß an sowohl Allelverlusten als auch -zugewinnen. Einige Regionen konnten gezielt beschrieben werden. Weitere Ergebnisse der Untersuchung legen nahe, dass MYC-Alterationen eine Rolle bei der Pathogenese der Erkrankung spielen könnte (Bergmann et al. 2014).

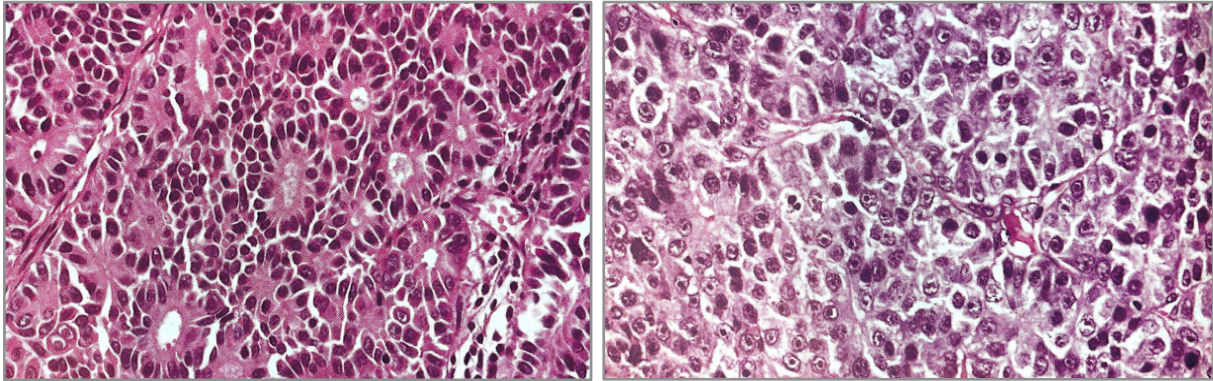
Die Symptome des Azinuszellkarzinoms sind meist abhängig vom Tumorwachstum und/oder der fortschreitenden metastatischen Ausbreitung und eher unspezifisch. Hierzu zählen u.a. abdominelle Schmerzen, Gewichtsverlust oder auch Übelkeit. Bei Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung und ausgedehnter Metastasierung können Symptome wie beispielsweise subkutane Fettnekrosen oder Polyarthralgien auftreten. Es wird angenommen, dass diese Symptome durch eine Lipase-Hypersekretion verursacht werden (La Rosa et al. 2012; La Rosa et al. 2015). Bei einigen wenigen, eher jüngeren Patienten, konnte ein erhöhter Serumlevel des Alpha-Fetoproteins nachgewiesen werden (Itoh et al. 1992; Nojima et al. 1992).

Die meisten Azinuszellkarzinome (ACC) sind reine ACCs. Des Weiteren existieren gemischte Karzinome, die sich durch über 25% zusätzlichen Zelltypen auszeichnen. Hierzu zählen sowohl gemischte azinär-neuroendokrine Karzinome (MAEC) als auch gemischte azinär-duktales Karzinome (MADC) (Klimstra und Adsay 2016).

Das Azinuszellkarzinom kann potentiell in jedem Bereich des Pankreas auftreten. Meist treten sie jedoch im Pankreaskopf gefolgt vom Pankreasschwanz und Pankreaskörper auf (La Rosa et al. 2012; Klimstra und Adsay 2016). Makroskopisch präsentiert sich das Karzinom generell gut umschrieben, teilweise verkapselt und hat in der Regel eine rosa bis hellbraune Schnittfläche. Mit einem Durchschnittsdurchmesser von ca. 8-10 cm ist es ein größerer Tumor. Einblutungen und/oder Nekrosen kommen häufig vor (Klimstra und Adsay 2016; Klimstra et al. 1992; Basturk et al. 2007).

Mikroskopisch zeichnet sich das Karzinom durch eine hohe Dichte neoplastischer Zellen mit einem Mangel an faserigem Stroma aus. Es zeigt ein lobuläres Wachstumsmuster mit häufig vorkommenden Nekrosen. Die Zellen beinhalten eine moderate Menge granuläres

eosinophiles Zytoplasma, welches Zymogengranula enthält und die Mitoserate wird als generell erhöht angesehen. Es werden unterschiedliche architektonische Muster unterschieden. Zu den gängigsten zählt das azinäre- und das solide Muster. Charakterisierende Strukturen für das azinäre Muster sind ähnlich den normalen Azini. Zu beobachten sind basal lokalisierte Zellkerne und zusätzlich werden Lumen ausgebildet. Das solide Muster ist gekennzeichnet durch die Ausbildung von „Tumorzellnestern“ ohne erkennbare Lumenbildung (Klimstra 2007; La Rosa et al. 2012).



**Abbildung 2: Beispiel eines azinären- und soliden Wachstumsmusters des Azinuszellkarzinoms (WHO classification of tumours 2019)**

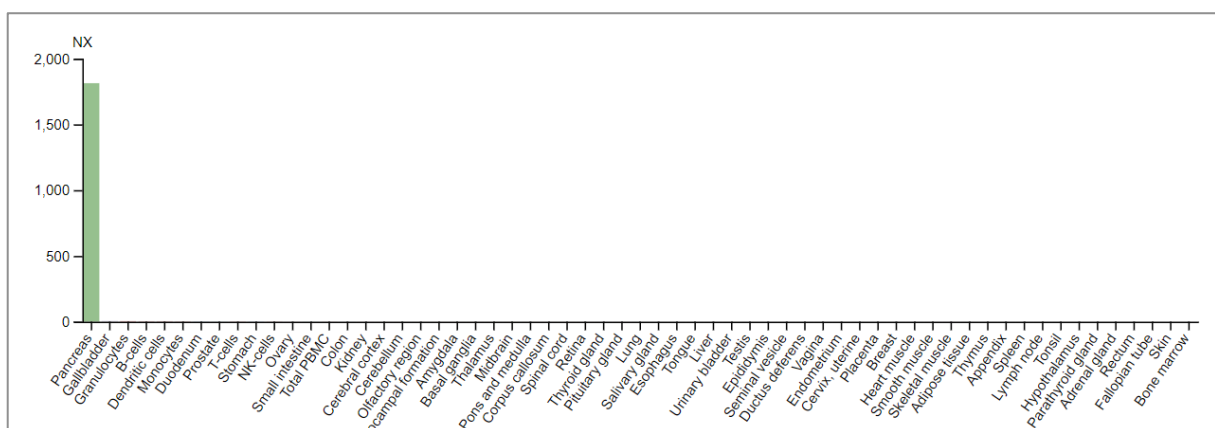
Auf der linken Seite dargestellt ist ein azinäres Muster. Auf der rechten Seite dargestellt ist ein solides-Muster.

Eine aktuell durchgeführte Analyse von 57.804 Pankreaskarzinompatienten, die sich einer chirurgischen Resektion unterzogen, zeigte für das Azinuszellkarzinom ein medianes Gesamtüberleben von 67,5 Monaten und eine 5-Jahres-Überlebensrate von insgesamt 51%. Demnach ist die Prognose des Azinuszellkarzinoms deutlich besser verglichen mit der 5-Jahres-Überlebensrate des duktales Adenokarzinoms (22%). Sie ist jedoch signifikant schlechter als die von neuroendokrinen Tumoren des Pankreas, die bei 84% liegt (Pokrzywa et al. 2019). Folglich ist eine sehr genaue Abgrenzung der drei Pankreastumorentitäten durch den Pathologen von großer Bedeutung.

Aufgrund des breiten morphologischen Spektrums und auch immunhistochemischer Überschneidungen kann die Untersuchung dieser drei Tumortypen für den Pathologen allerdings schwierig sein. Sowohl bei zytologischen als auch histologischen Proben kam es häufig zu Fehldiagnosen (Basturk et al. 2014; La Rosa et al. 2012; Sigel und Klimstra 2013). Die korrekte Diagnosestellung bei nicht eindeutiger Morphologie erfordert die Verwendung immunhistochemischer Marker. Sie spielen eine entscheidende diagnostische Rolle bei dem Nachweis der Azinuszelldifferenzierung. Zu den Antikörpern, die in der Routinediagnostik verwendet werden, zählen bislang Trypsin, Chymotrypsin, Lipase, Amylase und BCL-10. Allerdings ist keiner der immunhistochemischen Marker vollständig spezifisch und/oder sensitiv für das Azinuszellkarzinom (Thompson und Wood 2020; La Rosa et al. 2009).

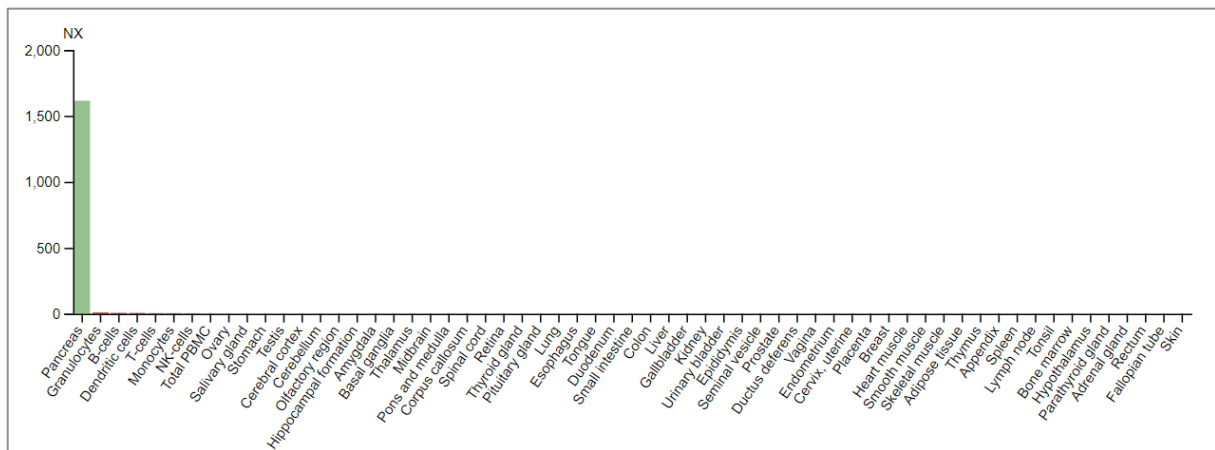
Die Carboxypeptidase A1 (CPA1) stellt einen neuen potentiellen immunhistochemischen Marker für das Azinuszellkarzinom dar (Said et al. 2020). Bei CPA1 handelt es sich um eine Zink-Metallprotease, welche in den Azinuszellen des Pankreas produziert wird. Beteiligt ist das Protein u.a. an der Zymogenhemmung und an der Spaltung von Nahrungsproteinen (Quiocho und Lipscomb 1971). Eine Forschungsgruppe des Instituts der Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf führte eine umfassende Studie bezüglich des Nutzens der immunhistochemischen CPA1-Färbung zur Diagnose von Azinuszellkarzinomen des Pankreas durch. Insgesamt wurden 15.680 Tumorproben von 132 verschiedenen Tumortypen und –subtypen sowie jeweils acht Proben von 76 verschiedenen Normalgewebetypen immunhistochemisch im Tissue-Microarray-Format (TMA) analysiert. CPA1 wurde in den Azinuszellen aller normalen Pankreasgewebeproben stark exprimiert, jedoch nicht in anderen Normalgeweben. Eine CPA1-Immunfärbung wurde zu 100% bei allen elf azinären Pankreaszellkarzinomen und einem gemischten azinären endokrinen Karzinom nachgewiesen, fehlte jedoch bei 449 untersuchten duktalem Adenokarzinomen, 75 Adenokarzinomen der Ampulla Vateri und 11.739 anderen ausgewerteten Karzinomen aus 128 Tumorentitäten. Hierbei handelt es sich möglicherweise um autolytische Zellschäden. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass CPA1 ein hochsensitiver und weitestgehend spezifischer Marker für normale und neoplastische Pankreas-Azinuszellen ist und dass die CPA1-Immunhistochemie die oft schwierige Diagnose des Azinuszellkarzinoms des Pankreas erheblich erleichtert (Uhlig et al. 2021).

Zwei weitere Proteine GP2 und CELA3B, die im hohen Maße in den Azinuszellen des Pankreas sowohl produziert als auch sezerniert werden (Uhlén et al. 2015; Ronzio et al. 1978; Macdonald und Ronzio 1972), könnten ähnlich spezifisch für das pankreatische Azinuszellkarzinom sein wie die Carboxypeptidase A1.



**Abbildung 3: Die GP2 Expression in verschiedenen Normalgeweben, bestimmt mittels RNA-Messung (The Human Protein Atlas o.D.)**  
 CELA3B RNA Gewebespezifität im Pankreasgewebe.





**Abbildung 4: Die CELA3B Expression in verschiedenen Normalgeweben, bestimmt mittels RNA-Messung (The Human Protein Atlas o.D.)**  
 CELA3B RNA Gewebespezifität im Pankreasgewebe.

Aufgrund der Spezifität beider Proteine ist es sinnvoll deren potentiell diagnostische Nützlichkeit im Bezug auf das Azinuszellkarzinom des Pankreas zu evaluieren.

## 1.2 GP2

Bei dem Glykoprotein 2 (GP2, Pancreatic zymogen granule membrane major protein) handelt es sich um ein Oligoprotein mit einer Molekülmasse von ca. 75 Kilodalton (kDa). Das Glykoprotein 2 existiert in einer löslichen- und in einer membrangebundenen Form (Fukuoka et al. 1991). GP2 kann membrangebunden in der Zymogengranula und im Lumen der Azinus-Zellen des Pankreas nachgewiesen werden (Ronzio et al. 1978). Es bildet den Hauptbestandteil der Membranproteine der Zymogengranula und wird im Pankreas aktiv exokrin sezerniert (Macdonald und Ronzio 1972; Wong und Lowe 1996; Fritz et al. 2002).

GP2 spielt nicht nur eine Rolle im Pankreas, sondern soll ebenfalls auf unterschiedlichen Zellen des Immunsystems wie beispielsweise den Monozyten, T-Lymphozyten und Epithelzellen und auch auf M-Zellen des Darmes exprimiert werden sowie auch in verschiedenen anderen Drüsen (Werner et al. 2012; Terahara et al. 2008).

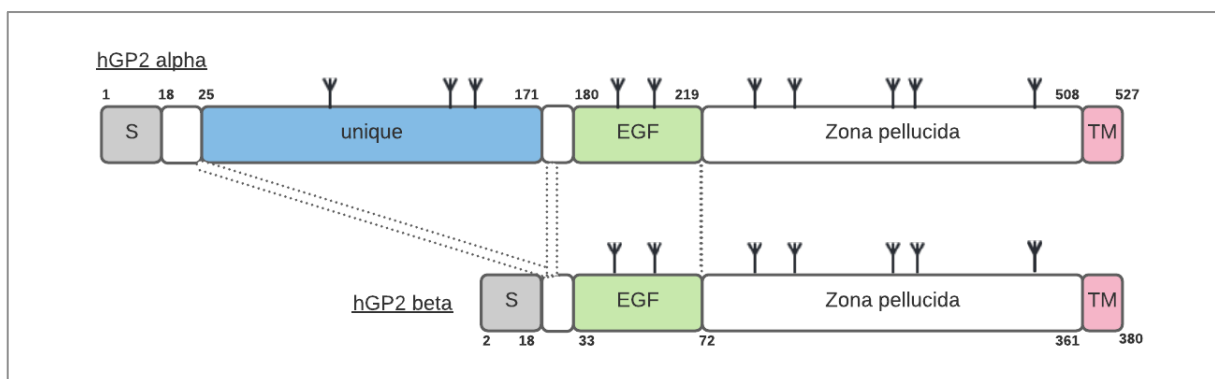
### 1.2.1 Aufbau und Struktur

GP2 ist mittels eines C-terminalen Glykosylphosphatidylinositol-Ankers (GPI) mit der Lipidmembran der Zymogengranula verbunden (LeBel und Beattie 1988). Posttranslational wird der GPI-Anker im endoplasmatischen Retikulum kovalent mit dem Proteingerüst verknüpft (Fukuoka 2000). Zusätzlich weist GP2 eine N-terminale Bindungsstelle, eine EGF-ähnliche Domäne und eine Zona pellucida-Domäne (ZP-Domäne) auf (Jovine et al. 2005).

Mehrere GP2 Makromoleküle sind über die ZP-Domäne miteinander verbunden und bilden lösliche Proteinkomplexe (Rindler und Hoops 1990).

Es wurden bislang vier verschiedene Isoformen von GP2 beschrieben. Hierzu zählen die Isoformen eins bis vier, wobei die Isoformen vier auch als beta- und die Isoform zwei auch als alpha- bezeichnet wird. Die Isoformen unterscheiden sich primär in der Länge der Aminosäureketten, allerdings besitzen alle eine N-terminale Signalsequenz, eine ZP-Domäne und eine C-terminale Transmembrandomäne mit dem sogenannten GPI-Anker (Roggenbuck et al. 2016). Die Isoform 1 (UniProt-ID P55259-1) umfasst insgesamt 537 Aminosäuren und gilt im Vergleich zu den anderen als kanonisches Makromolekül. Bei der Isoform 2 (UniProt-ID P55259-4) fehlen die Aminosäuren 179 bis 181 und somit beinhaltet sie insgesamt 534 Aminosäuren. Bei der dritten Isoform (390 Aminosäuren) fehlen die Aminosäuren 32 bis 178 und bei der Isoform 4 (387 Aminosäuren) fehlen die Aminosäuren 31 bis 180 (Roggenbuck et al. 2016). Fukuoka beschreibt die Isoformen alpha (UniProt-ID P55259-3) und beta (UniProt-ID P55259-2). Die Isoform alpha wird als lange- und die Isoform beta als kurze Isoform bezeichnet. Isoform alpha unterscheidet sich zur Isoform 1 lediglich durch das nicht Vorhandensein dreier Aminosäuren, im Gegensatz zur Isoform beta, bei der die Aminosäuren 32 bis 178 in Bezug auf die Isoform 1 fehlen (Fukuoka 2000).

Der beta Form fehlt eine 147 aa Domäne, die der 25-171 Region der alpha Isoform entspricht. Dies könnte darauf hindeuten, dass die beta Isoform ein Produkt eines alternativen splicing Prozesses ist. Eine Analyse hat ergeben, dass insbesondere die beta Isoform dominant im menschlichen Pankreasgewebe exprimiert wird. Über die physiologische Relevanz beider Isoformen ist bislang kaum etwas bekannt (Fukuoka 2000).



**Abbildung 5: Struktur von Glykoprotein2 (modifiziert nach Fukuoka 2000)**

Es werden bisher sechs verschiedene Isoformen von GP2 beschrieben. Isoform alpha entspricht in der Abbildung dem Volllängenprotein. Die verkürzte Isoform beta entsteht durch alternatives Spleißen. Dargestellt sind die Bestandteile des GP2. Hierzu zählen die N-terminale Signalsequenz (S), die Zona pellucida, die C-terminale Transmembrandomäne (TM), eine EGF-Domäne und potentielle N-Glykosylierungsstellen. Die Zahlen geben wiederum die Aminosäureposition an.

Die Freisetzung von GP2 erfolgt einerseits enzymatisch durch eine Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C und andererseits über pH-Änderungen in das Pankreassekret

(Rindler und Hoops 1990). Beaudoin et al. gelang es in einer Untersuchung elektronenmikroskopisch zu zeigen, dass GP2 im Pankreassekret ein Bestandteil eines fibrillären Netzwerkes ist (Beaudoin et al. 1991). Das Sekret gelangt dann über den Ductus pancreaticus in das Duodenum.

GP2 unterscheidet sich hinsichtlich anderer Proteine, die ebenfalls exokrin sezerniert werden. GP2 wird nicht im Darmlumen durch Proteolyse aktiviert, sondern im Pankreas durch sequentielle Spaltung modifiziert (Fritz et al. 2002).

Die physiologische Bedeutung von GP2 ist bislang nicht ganz klar. Bekannt ist, dass das Glykoprotein Verdauungsenzyme binden kann, darunter beispielsweise die Amylase (Yu et al. 2004b). Es wurde auch vermutet, dass GP2 am Protein-Sorting und bei der Sekretion der Verdauungsenzyme in den Granula eine Rolle spielen könnte (Schmidt et al. 2001). Der Einfluss von GP2 auf die Pankreasfunktion wurde an GP2 Knockout Mäusen untersucht (Yu et al. 2004b). In weitestgehender Abwesenheit von GP2 zeigten sich kaum Anzeichen einer Malabsorptionsstörung wie beispielsweise Gewichtsverlust, Diarrhoen und Wachstumsverzögerung. Auch die Zymogengranula stellten sich in den Knockout Mäusen lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch unverändert im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen dar. Zusätzlich konnten keinerlei Veränderungen in der Zusammensetzung des Pankreassekretes und bezüglich der sekretorischen Antwort in Abwesenheit von GP2 nachgewiesen werden. Dies veranschaulicht, dass GP2 weder bei der Bildung der Zymogengranula noch bezüglich der exokrinen Pankreasfunktion von essentieller Bedeutung ist (Yu et al. 2004b). Dies lässt wiederum vermuten, dass das Glykoprotein GP2 anderweitig und ggf. auf einer anderen Ebene für die Formation der Zymogengranula und auch den Sortierungsprozess zuständig sein könnte. Scheele et. al. stellten die Hypothese auf, dass GP2 zusammen mit Proteoglykanen eine submembranöse Matrix an der luminalen Seite der Zymogengranula bilden (Scheele et al. 1994). Einige Glykoproteine und Proteoglykane dieser Matrix konnten im Verlauf durch Schmidt et. al. charakterisiert und identifiziert werden. Hierdurch wurde bestätigt, dass GP2 Bestandteil der submembranösen Matrix ist. Neben GP2 konnten auch andere Proteine wie Lektin, Serpin, ZG16p, ZG46p, eine Gruppe basischer sowie saurer Proteine und zahlreiche bislang nicht identifizierter Proteine isoliert nachgewiesen werden (Schmidt et al. 2000). Ein in vitro durchgeführtes „condensations-sorting assay“ veranschaulichte, dass Bestandteile der Matrix die Bindung von aggregierten Zymogenen an die Zymogengranulamembran vermitteln. Dieser Prozess wird als Kondensationssortierung angesehen (Schmidt et al. 2000; Kleene et al. 1999). Schmidt et al. suggerieren, dass sowohl die Formation der Granula als auch das Protein-Sorting durch die Hemmung der GPI-Ankerbiosynthese beeinträchtigt werden. Die Inhibierung der Synthese hat Einfluss auf die Protein Bewegung und die Formation der Granula. Folglich kommt es zur

Akkumulation von Zymogenen in vorhergeschalteten Kompartimenten, wie beispielsweise dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Komplex (Schmidt et al. 2001).

### 1.2.2 Funktion von GP2

GP2 ähnelt strukturell dem Tamm-Horsfall Protein, auch bekannt als Uromodulin (Hoops und Rindler 1991; Fukuoka et al. 1992). Beide Proteine sind zu ca. 52% identisch und weisen eine 85% Ähnlichkeit bezüglich ihrer Aminosäuresequenzen auf (Hoops und Rindler 1991). Bei dem Tamm-Horsfall Protein handelt es sich um ein Glykoprotein der Niere, welches in der Henle-Schleife gebildet wird. Analog zum GP2 ist auch das Tamm-Horsfall Protein über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verankert und verfügt über eine EGF-Domäne, eine N-terminale Bindungsstelle und eine ZP-Domäne (Rindler et al. 1990; Jovine et al. 2002; Wolf et al. 2003). Es bildet den Hauptbestandteil der physiologisch vorkommenden Proteine im Urin. THP besitzt die Fähigkeit zur Aggregation und ist beteiligt an der Entstehung von Proteinzyllindern in der Niere. Die Bildung von Aggregaten beruht auf der ZP-Domäne, die unter verschiedenen Bedingungen die Aggregation von Proteinen verursacht (Fletcher et al. 1970). Auf Grund der hohen strukturellen Ähnlichkeit zu THP untersuchten Freedman et al. in einer Studie die Möglichkeit einer potentiellen Beteiligung von GP2 hinsichtlich einer durch Aggregation von Proteinen bedingten Obstruktion im Pankreasgang bei der chronischen Pankreatitis. Es konnte gezeigt werden, dass GP2 eine Komponente der intraduktalen Konkremente von Patienten mit sowohl alkoholinduzierter-, als auch ideopathischer Pankreatitis ist. Die Tatsache, dass GP2 in den Proteinaggregaten angereichert ist, lässt vermuten, dass das Glykoprotein eine Rolle bezüglich der Pathologie der intraduktalen Konkrementbildung spielt (Freedman et al. 1993).

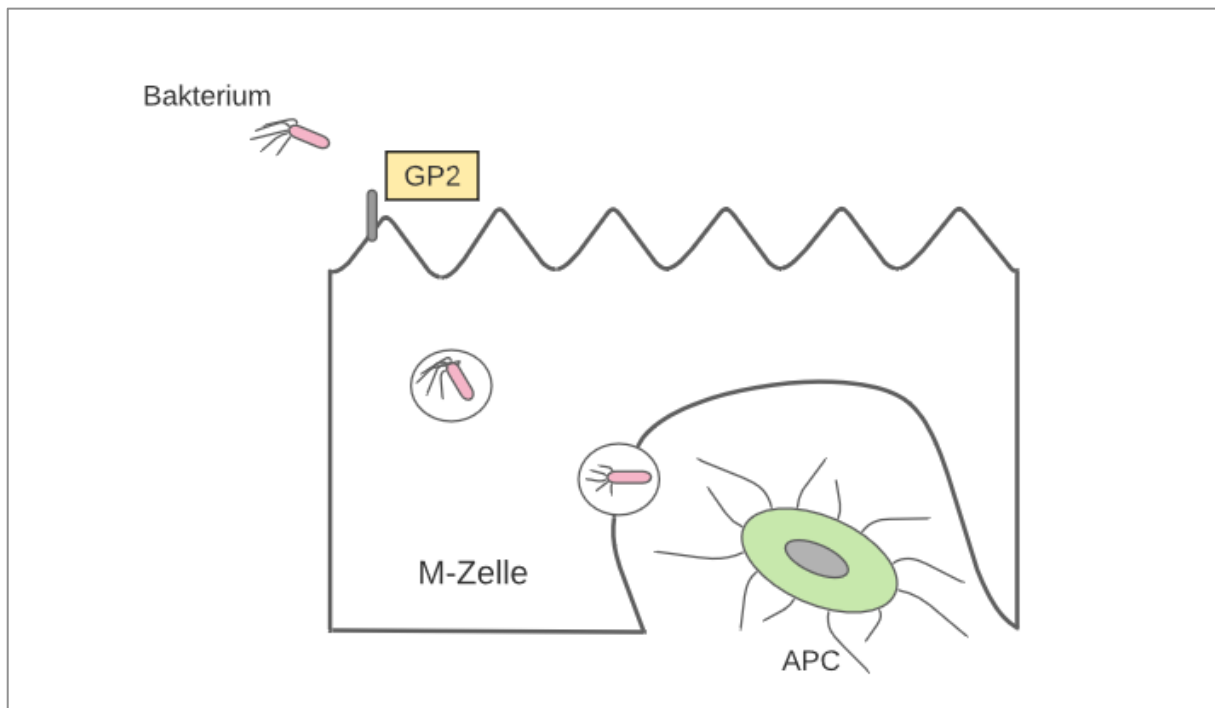
Das Tamm-Horsfall Protein und GP2 besitzen beide eine bakterienbindende Eigenschaft. Yu et al. veranschaulichten, dass das Glykoprotein 2 in der Lage ist, das Typ 1 Fimbrien tragende Bakterium *Escherichia coli* zu binden. Analog hierzu besitzt das THP die gleiche Eigenschaft. *E. coli* zählt zu der Familie der Enterobacteriaceae und gilt als Verursacher zahlreicher urogenitaler und gastrointestinaler Infektionen im menschlichen Körper. GP2 bindet an FimH, ein Adhäsionsprotein, welches eine essentielle Untereinheit der Typ 1-Fimbrien ist (Yu und Lowe 2009). Durch THP Knockout Mäuse konnte gezeigt werden, dass diese im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Sensitivität bezüglich urogenitaler Infektionen aufwiesen. Durch die Bindung von THP an die Typ 1-Fimbrien wird verhindert, dass das Bakterium an die Urothelrezeptoren, Uroplakin 1a und 1b, binden kann (Pak et al. 2001). Durch die strukturelle Ähnlichkeit der Proteine und dem gleichen Bindungsverhalten bezüglich Typ 1-Fimbrien ist anzunehmen, dass auch GP2 eine Rolle in der bakteriellen Abwehr spielt (Yu und Lowe 2009). Analog zu THP bindet GP2 an den Scavenger-Rezeptor

von Endothelzellen (SREC-1). Die Scavenger-Rezeptoren repräsentieren eine Gruppe von Membran-Rezeptoren (Hölzl et al. 2011). Es wird beschrieben, dass sie LDL-Lipoproteine binden können und in der Lage sind Pathogene sowohl zu erkennen als auch aufzunehmen (Areschoug und Gordon 2008). Durch die Bindung an den Rezeptor folgt die Internalisierung in die Zelle. Der SREC-1 wird auf unterschiedlichen Zellen, wie beispielsweise den dendritischen Zellen, exprimiert. Dendritische Zellen können GP2 binden und internalisieren. Dies könnte laut Hölzl et al. die Immunantwort und Antigen-Clearance beeinflussen (Hölzl et al. 2011).

Laut Säemann et al. ist das THP ein regulatorischer Faktor für die angeborene und adaptive Immunantwort (Säemann et al. 2005). Somit kann ein ähnlicher immunologischer Mechanismus für GP2 angenommen werden. Untersuchungen von Werner et al. zeigen, dass rekombinantes GP2 die Aktivierung und die Proliferation peripherer T-Zellen einschränkt und die Apoptose von T-Zellen verringert wird. Zusätzlich verringert GP2 die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise TNF-alpha und IL17, aus intraepithelialen und peripheren T-Zellen. Dies suggeriert einen entzündungshemmenden Einfluss des Glykoproteins (Werner et al. 2012).

### 1.2.3 klinische Bedeutung von GP2

Das Glykoprotein 2 wird an der Außenseite von M-Zellen im Follikel-assoziierten Epithel der Peyer-Plaques des Darmes exprimiert (Terahara et al. 2008). M-Zellen sind spezielle Epithelzellen, die eine wichtige Rolle bezüglich der Funktionalität des Immunsystems spielen. M-Zellen können Antigene aufnehmen und diese werden wiederum an der basalen Seite an Zellen des adaptiven Immunsystems abgegeben (Owen und Jones 1974). GP2 fungiert als transzytotischer Rezeptor für Schleimhautantigene und Aufnahmerezeptor von Bakterien. Hierzu zählen die Bakterien E.coli und Salmonella enterica (Ohno und Hase 2010). Verdeutlicht wird dies durch eine Untersuchung in der GP2 defiziente Mäuse keine ausreichende Immunantwort gegen die Bakterien entwickelten. Dies zeigt, dass GP2 ein wichtiges Protein der Darmimmunität ist (Hase et al. 2009).



**Abbildung 6: GP2 Expression an der Außenseite einer M-Zelle (modifiziert nach Nakamura et al. 2018)**

GP2 Expression an der Außenseite von einer M-Zelle im Follikel-assoziierten Epithel der Peyer-Plaques des Darmes. GP2 fungiert als transzytotischer Rezeptor für Typ 1-Fimbrien exprimierende Bakterien. Die Aufnahme erfolgt dann durch eine antigenpräsentierende Zelle (APC), die dendritische Zelle.

Das pankreatische Glykoprotein 2 zählt zu einem wichtigen Antigenziel Morbus Crohn spezifischer Autoantikörper. Autoantikörper zählen zu wichtigen pathologischen Markern bei der Autoimmunerkrankung Morbus Crohn (Roggenbuck et al. 2009; Komorowski et al. 2013). Autoantikörper, darunter Anti-GP2 IgG und IgA, konnten bei ca. 30% der Morbus Crohn Patienten nachgewiesen werden und scheinen mit bestimmten Phänotypen der Erkrankung in Verbindung zu stehen, beispielsweise mit dem jüngeren Erkrankungsalter und der ileokolischen Lokalisation (Bogdanos et al. 2012; Roggenbuck et al. 2013). Neben dem Nachweis von Autoantikörpern gegen GP2 konnten auch Anti-GP2 bei der aktiven Zöliakie nachgewiesen werden. (Bonaci-Nikolic et al. 2012). Laass et al. konnten zeigen, dass IgA Antikörperspiegel gegen GP2 gemäß der Mars-Klassifikation mit dem Grad der villösen Atrophie assoziiert sind (Laass et al. 2015).

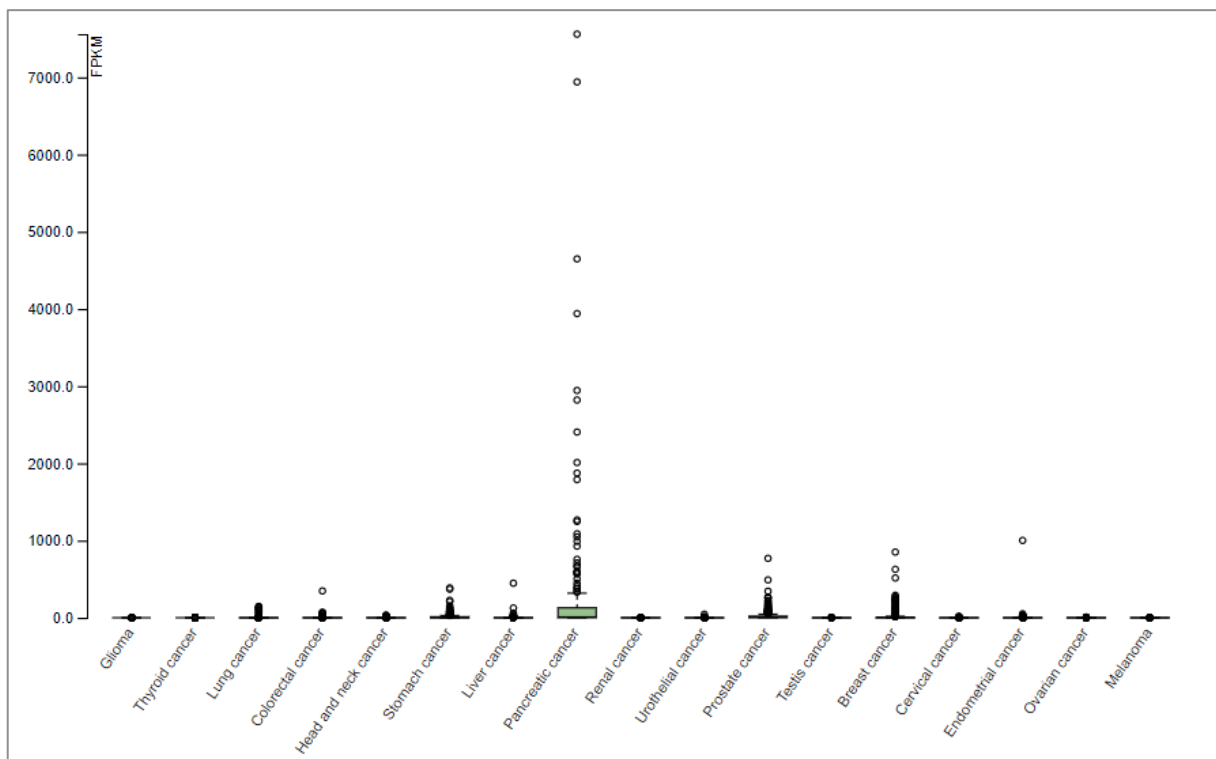
Hao et al. untersuchten in einer Studie die Bedeutung von Plasmaspiegeln des Glykoproteins 2 bezüglich der Pankreatitis und des Pankreaskarzinoms. Ergebnisse zeigten, dass der GP2-Assay ein nützlicher Serummarker insbesondere der akuten und chronischen Pankreatitis darstellen könnte (Hao et al. 2004). Eine später durchgeführte Studie veranschaulichte, dass insbesondere die Isoform GP2 alpha eine signifikante Rolle als Marker spielt. GP2 alpha Werte waren signifikant höher bei Patienten/innen mit einem schweren Verlauf der akuten Pankreatitis im Vergleich zu milden Fällen (Roggenbuck et al.

2017). GP2 Serumlevel könnten sowohl einen prognostischen als auch diagnostischem Marker darstellen.

Andererseits spielt das Glykoprotein 2 eine protektive Rolle im Hinblick auf eine durch Caerulein induzierten Pankreatitis. In einem Mausversuch zeigten die GP2 defizienten Mäuse, die wiederum mit einer hochdosierten Konzentration von Careulein behandelt wurden, signifikant mehr nekrotische Zellen als die Wildtyp Mäuse (Yu et al. 2004b).

### 1.2.4 GP2 und die Bedeutung in Tumoren

Die GP2 RNA-Expression in unterschiedlichen Tumorentitäten wurde durch Daten aus einer RNA-Screening Studie veranschaulicht. Die Daten stammen aus dem „Cancer Genome Atlas Program“ (TCGA) und sind im Proteinatlas zusammengefasst (The Human Protein Atlas o.D.). Das TCGA ist ein Projekt zur Identifizierung Krebs spezifischer genetischer Mutationen mittels Genomsequenzierung (The Cancer Genome Atlas Program o.D.).



**Abbildung 7: Übersicht GP2 RNA-Expression (The Human Protein Atlas o.D.)**  
GP2 RNA-Expression in unterschiedlichen Tumorentitäten.

Die Grafik zeigt die GP2 RNA-Expression in unterschiedlichen Tumorentitäten. Zu erkennen ist eine starke Dominanz von GP2 positiven Pankreaskarzinomen. Weiterhin wird die GP2 RNA in den folgenden Karzinomen exprimiert: kolorektales Karzinom, Magenkarzinom,

Leberkarzinom, Prostatakarzinom, Mammakarzinom und Endometriumkarzinom (Human Protein Atlas, Stand 2021). Immunhistochemisch existieren bislang kaum Daten bezüglich der Expression des Proteins in menschlichen Tumoren.

Li et al. untersuchten und validierten potentiell neue Biomarker bei Patienten mit der Diagnose eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas. Es wurden unterschiedlich exprimierte Gene im Karzinomgewebe und dem angrenzenden Normalgewebe analysiert. Die Studie ergab insgesamt 444 unterschiedlich exprimierte Gene; darunter 271 hochregulierte und 173 herunterregulierte. Zu den fünf am stärksten herunterregulierten Genen zählt GP2 (Li et al. 2019). Es ist anzunehmen, dass bestimmte Gen-Varianten des Glykoproteins ein erhöhtes Risiko darstellen an einem Pankreaskarzinom zu erkranken. Eine japanische Forschungsgruppe führte eine Metaanalyse von drei genomweiten Assoziationsstudien durch. Es wurden insgesamt 2039 Genomdaten von Pankreaskarzinom-Patienten und 32.592 Genomdaten gesunder Patienten ausgewertet, mit dem Ziel Genstellen zu ermitteln, die eine Prädisposition für das Pankreaskarzinom darstellen. Als Ergebnis wurden 3 Loci mit genomweiter Signifikanz identifiziert. Experimente mittels Zelllinien zeigten zusätzlich, dass diese Genvarianten sich auf die Aktivität von KRAS auswirken, welches eine entscheidende Rolle bei der Proliferation maligner Neoplasien besitzt. Basierend auf diesen Daten postulieren die Autoren, dass GP2-Genvarianten höchstwahrscheinlich mit der Entstehung des Pankreaskarzinoms assoziiert sind (Lin et al. 2020).

Aberrante Mengen von GP2 im Blut konnten bei Patienten mit unterschiedlichen Pankreaserkrankungen nachgewiesen werden u.a. bei der Pankreatitis und bei dem Pankreaskarzinom (Hao et al. 2004). Eine spätere Untersuchung von Lucien et al. bestätigte die Erhöhung des GP2 Plasmalevels bei dem duktales Adenokarzinom des Pankreas, jedoch war der Spiegel nicht signifikant höher als bei benignen Pankreaserkrankungen (Lucien et al. 2019).

### 1.3 CELA3B

Bei CELA3B (chymotrypsin like elastase 3B, ELA3B, CBPP) handelt es sich um eine pankreatische Serinprotease mit einer Molekülmasse von ca. 29 Kilodalton (kDa) (Weiss et al. 2016; Shen et al. 1987).

Im menschlichen Körper existieren fünf verschiedene Elastase-Gene, die jeweils für die strukturell gleichen Protein-Elastasen codieren. Hierzu zählen die Protein-Elastasen 1, 2, 2A, 2B, 3A und 3B. Vier von ihnen, darunter CELA2A, 2B, 3A und 3B, werden durch die Azinus-Zellen des Pankreas sowohl produziert als auch sezerniert (Uhlén et al. 2015). CELA3B wird als eine inaktive Vorstufe von Zellen des Pankreas sezerniert und durch Autolyse aktiviert



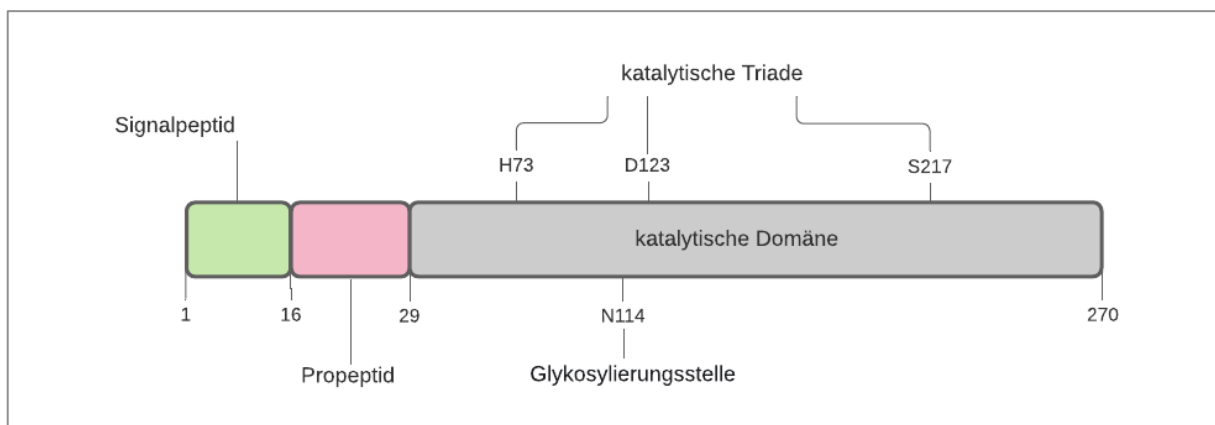
(Szabó et al. 2016). Aufgrund evolutionärer Mutationen wird CELA1 nicht im menschlichen Körper exprimiert (Shen et al. 1987).

### 1.3.1 Aufbau und Struktur

Tani et al. klonierten humanes CELA3A und CELA3B aus einer humanen Pankreas cDNA-Bibliothek. Sie benannten es Elastase3A und 3B. CELA3B ähnelt stark der Cholesterol bindenden Pankreas Protease (Tani et al. 1988).

CELA3B besteht strukturell aus einem Signalpeptid (Aminosäurereste 1-15), einem Propeptid (Aminosäurereste 16-28) und einer katalytischen Domäne (Aminosäurereste 29-270). CELA3B und auch CELA3A bestehen aus insgesamt 270 Aminosäuren, wobei das Signal- und Propeptid aus 28 Aminosäuren besteht. CELA3B und 3A ähneln sich in ihrem strukturellen Aufbau, wobei die Homologie der Aminosäuresequenzübereinstimmung zwischen beiden Proteinen ca. 93% beträgt. Es handelt sich um Produkte von Genduplikation (Párniczky et al. 2016). Gewebesanalysen verschiedener mRNAs zeigten, dass die Gene der klonierten cDNAs im Pankreas exprimiert werden (Tani et al. 1988; Boros et al. 2017).

Nach der Sekretion folgt die Aktivierung durch das Verdauungsenzym Trypsin. Dies hat die Umwandlung von CELA3B von einem Zymogen in eine aktive Protease zur Folge (Moore et al. 2019).



**Abbildung 8: Struktur von humanem CELA3B (modifiziert nach Moore et al. 2019)**

Dargestellt sind die Bestandteile von CELA3B. Hierzu zählen das Signalpeptid, ein Propeptid, eine katalytische Domäne und potentielle Glykosylierungsstellen. Die Zahlen geben wiederum Aminosäureposition an.

### 1.3.2 Funktion von CELA3B

Bisher existieren wenige Erkenntnisse über die genaue Funktion von CELA3B. Tani et al. veranschaulichten, dass die Aminosäurezusammensetzung und auch das kalkulierte Molekulargewicht von CELA3B der humanen Protease E ähnelt (Tani et al. 1988). Zusätzlich

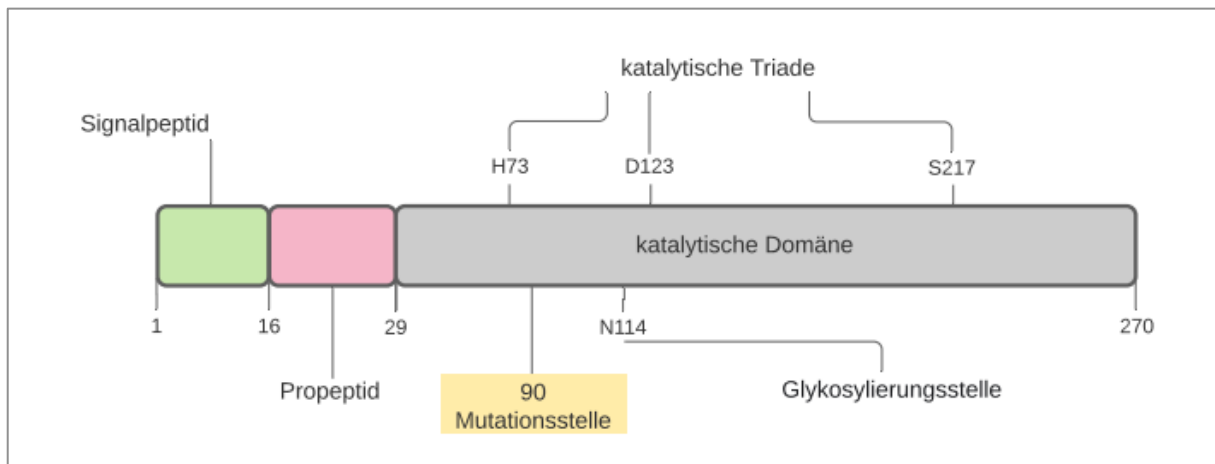
ist die aminoternale Sequenz der reifen Form der Schweineprotease E (Kobayashi et al. 1981) exakt identisch zu CELA3B (Tani et al. 1988). Die Protease E weist eine hohe Affinität bezüglich Alanin auf und zeigt wenig bis keine elastolytische Aktivität (Largman et al. 1976). Analog hierzu zählt auch CELA3B zu den effizienten Proteasen mit einer Affinität zu Alanin und geringer elastolytischer Aktivität (UniProtKB - P08861 (CEL3B\_HUMAN)).

Largman et al. berichten, dass CELA3B Elastin solubilisieren kann (Largman et al. 1976) und eine andere Forschungsgruppe charakterisierte das Protein als Cholesterin-bindendes Protein mit proteolytischer Aktivität (Sziegoleit 1982, 1984). Somit wird dem Protein eine Verdauungsfunktion zugeschrieben und dass es beim intestinalen Transport und bei dem Metabolismus von Cholesterin mitwirkt (Tani et al. 1988).

### 1.3.3 klinische Bedeutung von CELA3B

Das Proenzym CELA3B ist in der Lage mit der Procarboxypeptidase A1 und A2 (proCPA1 und 2) Komplexe zu bilden. Als Hauptdeterminante der Bindungsaffinität detektierte die Forschungsgruppe die Aminosäure Alanin an Position 241 (Párniczky et al. 2016). Es wurde angenommen, dass eine individuelle Variabilität bezüglich der Komplexbildung das Risiko einer chronischen Pankreatitis erhöhen könnte, da die Aminosäureposition polymorph ist (Szabó et al. 2016). Hierzu wurden genetische Analysen bei Patienten mit chronischer Pankreatitis und einer Kontrollgruppe durchgeführt. Varianten, die die Aminosäureposition 241 betreffen, konnten nicht in Verbindung zum Krankheitsbild gebracht werden. Diese Erkenntnis verdeutlicht, dass Veränderungen in der Komplexbildung zwischen Proelastase und Procarboxypeptidase das Pankreatitisrisiko nicht erhöhen (Párniczky et al. 2016).

Moore et al. führten eine vollständige Exom-Sequenzierungsanalyse durch und detektierten eine Missense-Mutation in einem Gen, welches für die Elastase3B kodiert. Weiterführende Studien sowohl in vitro, in Zelllinien als auch in Mausmodellen verdeutlichen, dass diese Mutation zu einer translationalen Hochregulation von CELA3B führt. Nach der Sekretion und der Aktivierung durch Trypsin führt die Hochregulation zur unkontrollierten Proteolyse und dadurch zu rezidivierenden Pankreatitiden. Sequenzvergleiche zeigen, dass an Position 90 bei Cela3B die Aminosäure Arginin ist, während es sich bei den anderen Mitgliedern der Elastase-Familie an dieser Position typischer Weise um Leucin oder Isoleucin handelt. Es wird angenommen, dass eine einzelne Aminosäuremutation, nämlich von Arginin zu Cystein, zur Hochregulation von CELA3B führt. Interessanterweise verändert die Mutation nicht das katalytische Profil des Proteins, aber erhöht die Rate der Translation. Als Folge nimmt die Gesamtmenge der zur Verfügung stehenden aktiven Enzyme zu und somit das Pankreatitis Risiko (Moore et al. 2019).



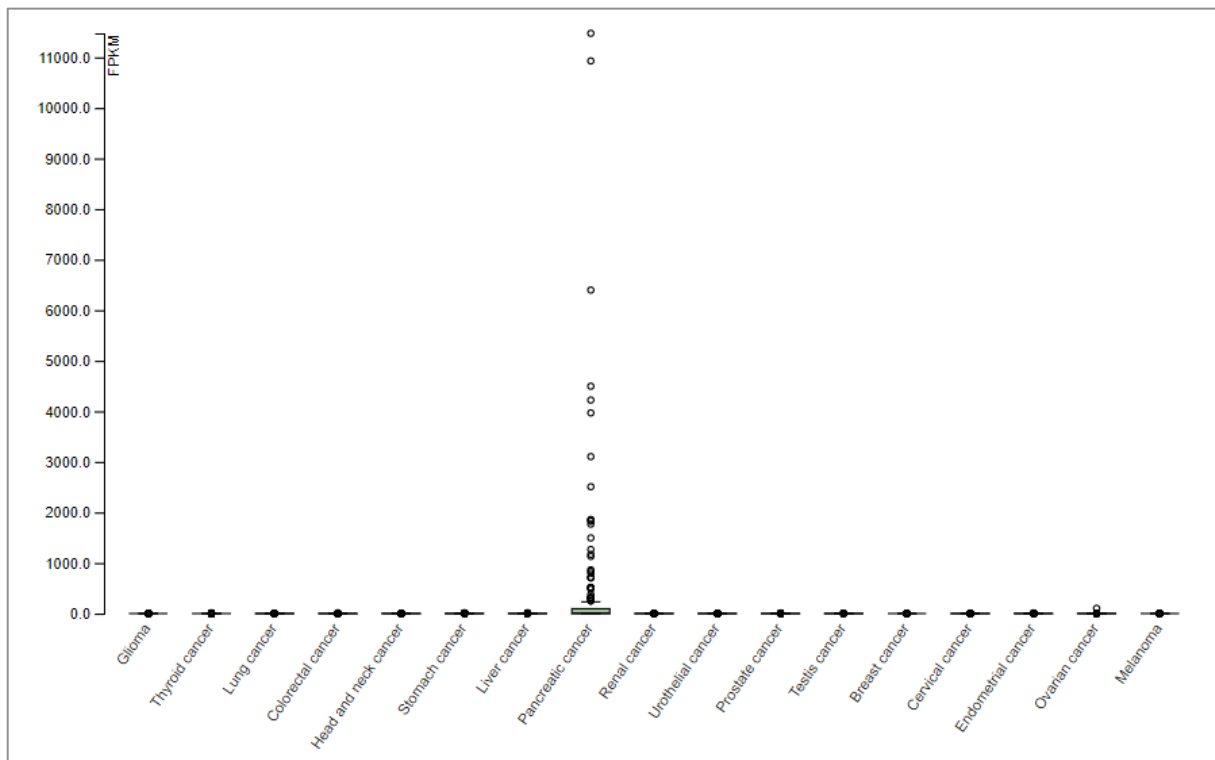
**Abbildung 9: Struktur von humanen CELA3B mit potentieller Mutationsstelle (modifiziert nach Moore et al. 2019)**

Dargestellter Aufbau von CELA3B mit potentieller Mutationsstelle, der Aminosäureposition 90.

Sziegoleit et al. zeigten in einer quantitativen Messung, dass CELA3B ca. 4-6% der Gesamtproteine des Pankreassekrets ausmacht (Sziegoleit 1984). CELA3B scheint während der Darmpassage nicht proteolytisch abgebaut zu werden. Aus diesem Grund kann das Protein in hoher Konzentration im Stuhl nachgewiesen werden (Sziegoleit et al. 1989). Zur Detektion der Stuhl-Elastase wurden verschiedene ELISA-Tests entwickelt und deren klinischer Nutzen konnte im Hinblick der Diagnostik bei der Pankreasinsuffizienz veranschaulicht werden (Domínguez-Muñoz et al. 2017; Hahn et al. 2005; Löser et al. 1996; Miendje et al. 2004). Ein in der Klinik gängig genutzter Test ist der ScheBo Pankreas Elastase Stuhltest (ScheBo Biotech, Gießen, Deutschland). Zwei monoklonale Antikörper gegen CELA3B werden gemessen, um den Enzymspiegel festzustellen. Nicht abschließend geklärt ist, inwieweit der Test auch andere Elastasen misst. Eine Untersuchung von Tóth et al. bestätigt, dass CELA3B das primäre Ziel des Tests darstellt. CELA3A konnte ebenfalls nachgewiesen werden, jedoch mit einer ca. vier Mal schwächeren Signalstärke (Tóth et al. 2017). Diagnostisch wird angenommen, dass Werte einer fäkalen Elastase unter 200 µg/g Stuhl auf eine exokrine Pankreasinsuffizienz hinweisen (Engjom et al. 2020).

#### 1.3.4 CELA3B und die Bedeutung in Tumoren

Eine Spezifität der CELA3B Expression im Pankreasgewebe wurde durch Daten aus einer RNA-Screening Studie veranschaulicht. Die Daten stammen aus dem „Cancer Genome Atlas Program“ (TCGA) und sind im Proteinatlas zusammengefasst (Human Protein Atlas, Stand 2021).



**Abbildung 10: Übersicht CELA3B RNA-Expression (The Human Protein Atlas o.D.)**  
 CELA3B RNA-Expression in unterschiedlichen Tumorentitäten.

Die Grafik in Abbildung 10 zeigt die CELA3B RNA-Expression in unterschiedlichen Tumorentitäten. Deutlich zu erkennen ist die Spezifität der RNS-Expression im Pankreaskarzinom (Human Protein Atlas, Stand 2021). Immunhistochemisch existieren bislang kaum Daten bezüglich der Expression des Proteins in menschlichen Tumoren.

Cavestro et al. untersuchten in einer Studie die Rolle der Elastase1 bei dem Pankreaskarzinom. Die Ergebnisse ergaben signifikant erniedrigte fäkale Elastase1-Level bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Zusätzlich entdeckten sie eine Korrelation zwischen der Höhe des Elastase1-Wertes und der Lokalisationen des Karzinoms. Elastase1-Werte waren bei Patienten mit einem Pankreaskopfkarzinom niedriger im Vergleich zu Patienten mit einem Pankreasschwanzkarzinom. Somit folgte die Annahme, dass Elastase1-Stuhlwerte in Zusammenhang mit der Lokalisation des Pankreaskarzinoms gebracht werden können (Cavestro GM, Nouvenne A, Merli R, Comparato G, Leandro G, Corrente V, Dalla Valle R 2004)

Proteine des Pankreassekrets könnten potentielle Biomarker für die Identifizierung des Pankreaskarzinoms darstellen. Aus diesem Grund untersuchte eine Forschungsgruppe das Pankreassekret von Patienten einschließlich der Diagnose des Pankreaskarzinoms, der chronischen Pankreatitis (CP) und der Choledocholithiasis (CDS). Proteine wurden selektiert und mittels Massenspektrometrie identifiziert. Zusätzlich wurden die mRNA-Level durch eine

PCR-Analyse in Pankreaskarzinom Zelllinien, -Gewebe und im angrenzenden Normalgewebe gemessen. Insgesamt waren vier Proteine im Pankreaskarzinom signifikant verändert im Vergleich zur CP und CDS. Zu einem deutlich herunterregulierten Protein zählt CELA3B. Auch der Vergleich der CELA3B mRNA im Karzinomgewebe und dem angrenzenden Normalgewebe ergab deutlich niedrigere Werte. Zusätzlich weist der CELA3B Genpromotor eine hohe Methylierung in Karzinomzelllinien auf. Gao et al. vermuten, dass die Methylierung mit der niedrigen CELA3B Genexpression korreliert (Gao et al. 2010).

Eine proteomische Analyse von pankreatischen intraepithelialen Neoplasie und Pankreaskarzinomen in Ratten-Modellen zeigte eine Hochregulation von CELA3B (Wang et al. 2011).

Eine aktuelle Transkriptom-weite Assoziationsstudie von Zhong et al. identifizierte neue Pankreaskarzinom Risiko Loci. Die Studie beinhaltet die Analyse von 9.040 Pankreaskarzinom Patientendaten und 12.496 Kontrolldaten. Als Ergebnis identifizierte die Forschungsgruppe 25 Gene, deren Expression statistisch signifikant mit dem Risiko für ein Pankreaskarzinom assoziiert ist. Hierzu zählt CELA3B. Zusätzlich wird vermutet, dass eine niedrige CELA3B-Expression mit einem entzündlichen Zustand in der Bauchspeicheldrüse assoziiert ist (Zhong et al. 2020).

## 1.4 Ziel dieser Arbeit

Die vorliegende Dissertation beinhaltet die Untersuchung der Expression von GP2 und CELA3B sowohl in Normalgeweben als auch in zahlreichen verschiedenen Tumoren. Auf diese Weise soll die diagnostische Nützlichkeit der beiden Proteine, hinsichtlich der Diagnose des Azinuszellkarzinoms des Pankreas, evaluiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Tissue Microarray-Technik

Das Tissue-Microarray Verfahren erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von hunderten Gewebefragmenten auf einem einzigen Objektträger. Die Methode ermöglicht eine erhebliche Beschleunigung von molekularen Untersuchungen, welche an Gewebeschnitten durchgeführt werden können. Zudem führt die gleichzeitige Untersuchung von beispielsweise 500 Gewebestücken auf einem Objektträger zu einer 500fachen Reduzierung der für eine Studie benötigten Reagenzien-Mengen und damit zu einer massiven Reduktion der Forschungskosten. Die Methode wurde 1998 von den Arbeitsgruppen von Professor Guido Sauter, damals Institution Pathologie des Universitätsspitals Basel (Schweiz) und Professor Olli Kallioniemi, damals National Human Genome-Research Institut (NHGRI) Bethesda (USA), entwickelt (Kononen et al. 1998).

Die hohe Effizienz der TMA-Methode ist erst dann gegeben, wenn geeignete TMAs vorliegen. Die Herstellung von TMAs verlangt allerdings einen hohen zeitlichen Aufwand. Die wesentlichen Schritte der TMA Herstellung sind:

*A. Identifizierung möglicherweise geeigneter Fälle und Vorselektion*

Am Institut der Pathologie des UKE werden geeignete Fälle durch eine Volltextsuche im Computersystem im Institut der Pathologie ermittelt. Durch Suchbegriffe wie beispielsweise „Kolon + Adenokarzinom“ können Kolonkarzinome identifiziert werden. Durch die Verwendung des zusätzlichen Parameters „pT1“, „pT2“, „pT3“ oder „pT4“ kann eine Einengung der Suche nach Operationspräparaten erfolgen, welche mit höherer Wahrscheinlichkeit ausreichend Tumorgewebe enthalten als Biopsien. Durch Sichtung der Pathologieberichte kann eine Vorselektion vorgenommen werden, wobei Fälle mit nicht eindeutiger Diagnose oder im Bericht erwähnten ausgedehnten Nekrosen oder therapiebedingten Tumorveränderungen ausgeschlossen werden können.

*B. Heraussuchen und markieren geeigneter Fälle*

Von allen identifizierten und potentiell geeigneten Fällen werden die Schnitte herausgesucht und von einem Pathologen inspiziert. Nur wenn ausreichend Tumor vorhanden ist (Grenze:  $>1\text{cm}^2$ ), wird das Tumorgewebe am HE-Schnitt mit einem Filzstift markiert. Fälle mit entweder wenig oder nekrotisch verändertem Tumor werden in dieser Phase des Projektes ausgeschlossen.

*C. Heraussuchen und Qualitätskontrolle der Tumor-Blöcke*

Von allen markierten Schnitten werden die dazugehörigen Paraffin-Blöcke aus dem Archiv der Pathologie herausgesucht und von einer erfahrenen MTA auf die Eignung für die TMA-Herstellung überprüft. Wichtigstes Kriterium für die Eignung ist eine möglichst hohe Tiefe/Dicke des Blockes; denn je dicker ein Paraffin-Block ist, desto länger sind die Zylinder, welche aus diesem Block entnommen werden können.

*D. Organisation der TMA-Herstellung*

Die geeigneten Fälle (mindestens  $1\text{cm}^2$  Tumor, mindestens 2mm tiefer Gewebblock) werden dann in einer festgelegten Reihenfolge zusammen sortiert, nach welcher die Reihenfolge der Einbringung der Tumoren in den TMA erfolgt. Hierfür wird bereits vor der TMA-Herstellung der Aufbau des TMAs und die exakte Position, an der jeder einzelne Tumor deponiert werden soll, festgelegt. Die am UKE hergestellten TMAs haben grundsätzlich immer dieselbe Struktur (Abbildung 12). Sie enthalten maximal 6 Sektoren (markiert mit Großbuchstaben A-F), in welchen die Zeilen mit Zahlen (1-9)

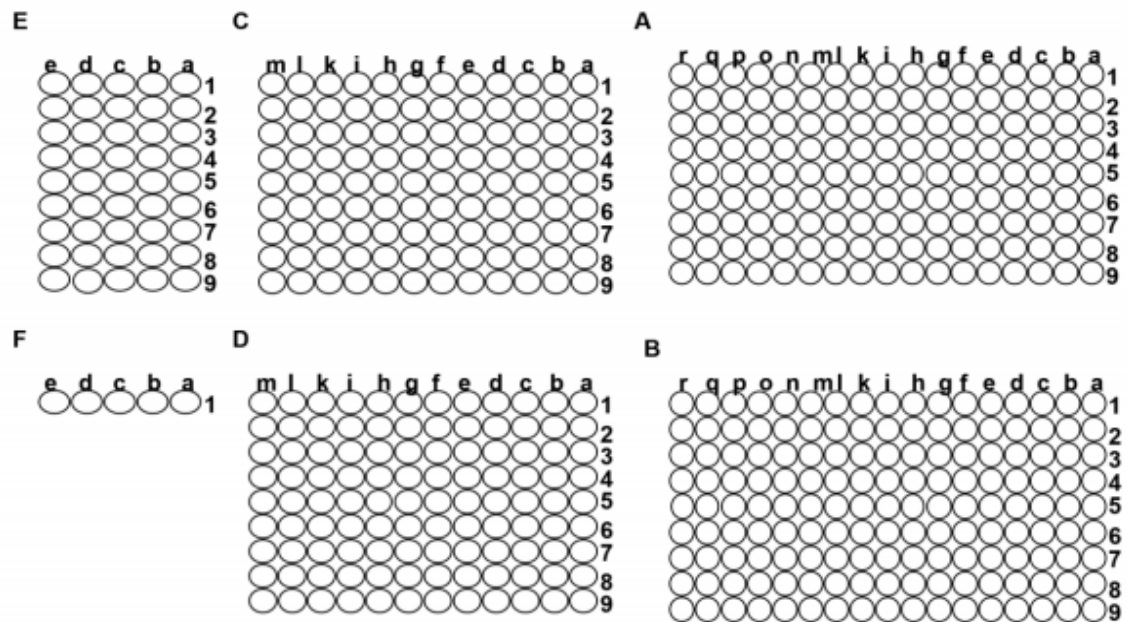
und die Spalten mit Kleinbuchstaben (a bis maximal r) bezeichnet sind. Die Sektoren sind zur Sicherstellung der Orientierung ungleich groß und asymmetrisch angeordnet.

#### E. *TMA-Herstellung*

Um den Aufwand der Schritte A-D bestmöglich zu nutzen, wird jeder TMA in mehreren Replikaten hergestellt (mindestens 4, meistens 8 und seltener >8). Die Herstellung erfolgt mittels eines von Mitarbeitern des UKE (Martina und Chris Mirlacher) entwickelten Gerätes, dessen Kernelement eine Vorrichtung ist, die es erlaubt an identischer Position entweder mit einem Bohrer ein Loch in einen leeren „Empfänger Paraffin-Block“ zu bohren oder aber mit einer Hohlzylinder aus einem „Spender-Block“ zu entnehmen und danach in das vorgefertigte Bohrloch im „Empfänger-Block“ einzusetzen. Die parallele Herstellung multipler Replikate eines TMAs wird durch einen Mehrfachblockhalter sichergestellt, der dafür sorgt, dass weitere „Empfänger Paraffin-Blöcke“ an einer genau identischen Stelle, wie dies beim ersten Replikat erfolgte, eine weitere Stanze aus dem gleichen „Spender-Block“ aufnehmen können. Nach der Befüllung von beispielsweise acht Replikaten eines TMA-Blocks mit Gewebezylindern eines bestimmten „Spender-Blocks“ wird die Bohrer-/Stanzeinrichtung durch einen elektrischen Schrittmotor automatisch auf die nächste Koordinatenposition verschoben. Die Schritte der TMA-Herstellung und die verwendeten Geräte sind in Abbildungen 13 dargestellt.

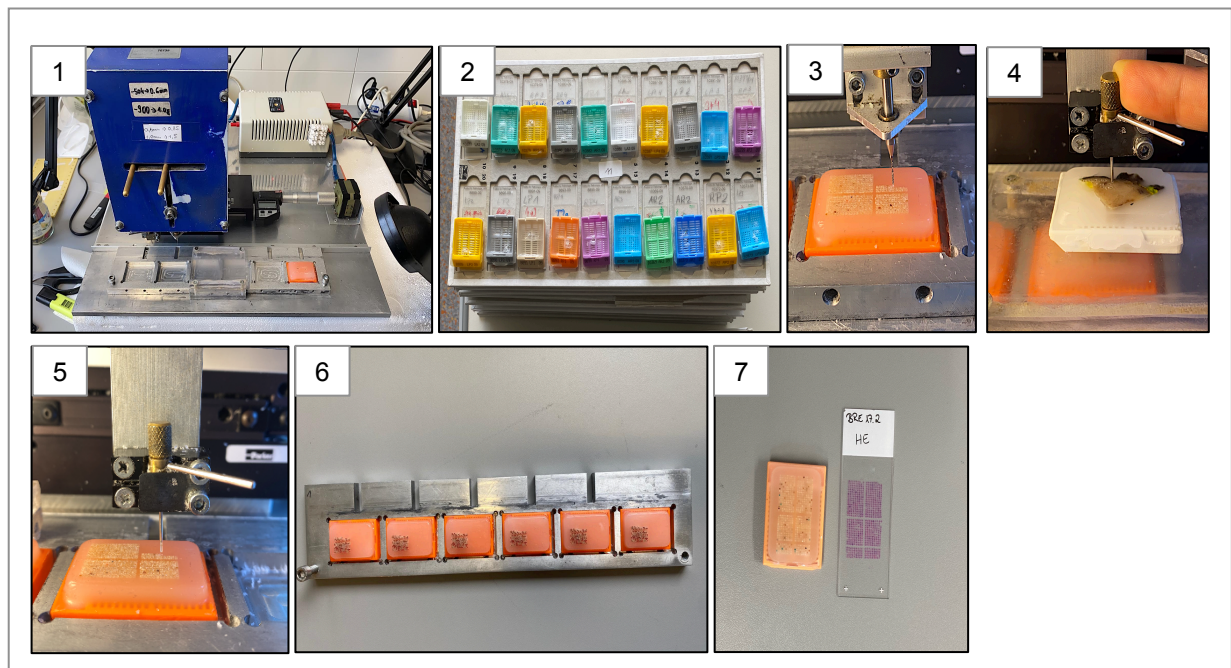
Es ist eine wesentliche Stärke der TMA-Methode, dass das Verfahren die Umsetzung von Vorgaben des Datenschutzes in optimaler Weise ermöglicht. Die Biopsie-Nummer, welche die Schnitte und Blöcke eines Pathologie-Archivs definieren, könnten mit Patienten Klarnamen in Verbindung gebracht werden, wenn es gelingen würde in das Informationssystem der Pathologie einzudringen. Diese Daten werden allerdings nur für die Herstellungsphase eines TMAs benötigt. Danach sind die einzelnen Gewebestücke durch ihre Position im TMA (Koordinate) definiert (Tabelle 1). Die für die Herstellung verwendeten Biopsienummern können nach der TMA-Herstellung entweder ausgeblendet (Pseudonymisierung) oder aber definitiv gelöscht werden (Anonymisierung).

# MTA 6.2 A



**Abbildung 12: Struktur eines am UKE hergestellten TMAs**

Grundsätzlich ist der Aufbau der TMAs identisch. Sie enthalten maximal sechs Sektoren (gekennzeichnet mit Großbuchstaben A-F). Die Zeilen sind mit Zahlen (1-9) und die Spalten mit Kleinbuchstaben bezeichnet (a bis maximal r). Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



**Abbildung 13: Vorgang der Erstellung eines TMAs**

Dargestellt ist ein semiautomatischer Arrayer erstellt durch Mitarbeiter des UKEs (1). Die Gewebe-Blöcke und Schnitte liegen sortiert vor (2). Ein Loch wird in einen leeren Empfänger Paraffin-Block gebohrt (3). Es folgt die Entnahme eines Gewebezylinders aus einem Spender-Block (4). Dies wird in das vorgefertigte Bohrloch im Empfänger-Block eingesetzt (5). Die parallele Herstellung multipler Replikate erfolgt durch einen Mehrfachblockhalter (6). Block und passender HE-Schnitt (7). Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten selbstständig erstellt.



PAN-TMA														
Array-Part	Koordinate	Entität	E-Nummer	Tumorgröße (cm)	pT	pN	positive LK	untersuchte LK	pM	L	V	UICC	R	Grading
A	A1a	Adenokarzinom	E/XXXX/XXX XXX	2	pT2	pN1	1	11	x	1	0	IIB	R0	G2
A	A1b	Adenokarzinom	E/XXXX/XXX XXX	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	G2
A	A1c	Adenokarzinom	E/XXXX/XXX XXX	10	pT3	pN1	1	11	x	1	0	IIB	R0	G2
A	A1d	Adenokarzinom	E/XXXX/XXX XXX	x	pT3	pN1	10	15	x	1	1	IIB	R0	G2
A	A1e	Adenokarzinom	E/XXXX/XXX XXX	x	pT3	pNX	x	x	1	1	1	IV	RX	G2
A	A1f	Adenokarzinom	E/XXXX/XXX XXX	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	G1
A	A1g	Adenokarzinom	E/XXXX/XXX XXX	x	pT3	pN1	4	17	x	1	0	IIB	R0	G2
A	A1h	Adenokarzinom	E/XXXX/XXX XXX	x	pT2	pN0	0	18	x	1	0	IB	R0	G2
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

**Tabelle 1: Beispiel eines Tissue-Microarray Datenfiles**

Dargestellt ist ein Tissue-Microarray Datenfile. Abgebildet sind der Array-Part, die Koordinate auf dem TMA, die Entität, die Eingangsnummer (in dieser Grafik anonymisiert), die ausgemessene Tumorgröße, die Stadien (pT, pN, Angabe der positiven und untersuchten Lymphknoten, M, L, V), die UICC-Klassifizierung, der R-Status und das Grading. Bei nicht vorhandenen Daten wird in der Tabelle ein x eingetragen. Diese Tabelle wurde aus eigenen Daten selbstständig erstellt.

## 2.2 Für die Studie verwendete TMA-Blöcke

Für das Projekt dieser Doktorarbeit wurde ein Normalgewebe-Array und ein Set von Tumor-TMAs verwendet. Der Normalgewebe TMA enthielt jeweils acht Gewebeproben von acht verschiedenen Patienten von 76 verschiedenen Normalgewebe-Kategorien. Die Zahl von acht verschiedenen Proben für jedes einzelne Organ wurde festgelegt, um mögliche fixationsbedingte Färbeprobleme einer Probe oder interindividuelle Färbeunterschiede zu kompensieren und auch um mit Sicherheit auch nur verstreut in einem Organ vorkommende Strukturen, wie beispielsweise Glomeruli der Niere oder Langerhans-Inseln des Pankreas, beurteilen zu können. Die genaue Zusammensetzung des Normalgewebe TMAs ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Normalgewebe Tissue-Microarray**

Gewebeproben sortiert nach der Reihenfolge auf dem Normalgewebe Tissue-Microarray. Angegeben sind das Organ und der Gewebetyp. Diese Tabelle wurde aus eigenen Daten selbstständig erstellt.

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, Brunner-Drüse
10.	Ileum, muskuläre Wand	48.	Niere, Kortex
11.	Colon descendes, 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 paranasalis
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 unterina, 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 descendes, Mukosa	76.	Hypophyse, Vorderlappen

Die in dieser Studie verwendeten Tumor-TMAs beinhalteten für CELA3B und GP2 jeweils 15.099 Tumorgewebsproben von 132 verschiedenen Tumorkategorien und –subkategorien, welche aus insgesamt 39 TMA-Blöcken vorlagen. Die genaue Zusammensetzung der Tumoren ist in Tabelle 3 zusammengestellt.

**Tabelle 3: Auflistung des untersuchten Tumorkollektivs, CELA3B und GP2**

Auflistung des untersuchten Tumorkollektivs. Die Einteilung erfolgt nach der Tumorgruppe, den Tumortypen bzw. –subtypen und der Anzahl der Tumoren. Diese Tabelle wurde aus eigenen Daten selbstständig erstellt.

\* für GP2 und CELA3B wurden die selben TMAs gefärbt.

Tumorgruppe	Tumortyp/ -subtyp	(n) pro TMA *
Hauttumoren	Pilomatrixom	35
	Basalzellkarzinom	88
	Benigner Naevus	29
	Plattenepithelkarzinom der Haut	90

	Malignes Melanom	48
	Merkelzellkarzinom	46
<b>Tumoren des Hals und Nackens</b>	Larynx, Plattenepithelkarzinom	110
	Pharynx, Plattenepithelkarzinom	60
	Mundboden, Plattenepithelkarzinom	130
	Glandula Parotis, pleomorphes Adenom	50
	Glandula Parotis, Warthin Tumor	104
	Adenokarzinom, NOS (Papilläres Zystadenokarzinom)	14
	Speichelgangkarzinom	15
	Azinuszellkarzinom, Speicheldrüse	181
	Adenokarzinom, NOS, Speicheldrüse	109
	Adenoidzystisches Karzinom, Speicheldrüse	180
	Basalzellkarzinom, Speicheldrüse	25
	Basalzelladenom, Speicheldrüse	101
	Epitheliales-myoeitheliales Karzinom, Speicheldrüse	53
	Mukoepidermoides Karzinom, Speicheldrüse	343
	Myoeitheliales Karzinom, Speicheldrüse	21
	Myoeitheliom, Speicheldrüse	11
	Onkozystisches Karzinom, Speicheldrüse	12
	Pleomorphes Adenokarzinom, low grade, Speicheldrüse	41
Pleomorphes Adenom, Speicheldrüse	53	
<b>Tumoren der Lunge, Pleura Thymus</b>	Adenokarzinom, Lunge	196
	Plattenepithelkarzinom, Lunge	80
	Kleinzelliges Karzinom, Lunge	16
	Mesotheliom, epitheloid	39
	Mesotheliom, anderer Typ	76
	Thymom	29
<b>Tumoren des weiblichen Genitaltraktes</b>	Vagina, Plattenepithelkarzinom	78
	Vulva, Plattenepithelkarzinom	130
	Zervix, Plattenepithelkarzinom	129
	Endometrium, endometroides Karzinom	236
	Endometrium, seröses Karzinom	82
	Uterus, Karzinosarkom	48
	Endometriumkarzinom, high grade, G3	13
	Endometrium, klarzelliges Karzinom	8
	Ovarialkarzinom, endometroid	110
	Ovarialkarzinom, serös	559
	Ovarialkarzinom, muzinös	96
	Ovarialkarzinom, klarzellig	50
	Ovar, Karzinosarkoma	47
	Brenner Tumor	9
<b>Tumoren der Mamma</b>	Invasives Mammakarzinom, kein spezieller	80

	Typ	
	Mammakarzinom, lobulär	122
	Mammakarzinom, medullär	15
	Mammakarzinom, tubulär	18
	Mammakarzinom, muzinöse	22
	Phyllodes Tumor der Mamma	50
<b>Tumoren des Verdauungs-Systems</b>	Polyp, adenomatös, low-grade Dysplasie	50
	Polyp, adenomatös, high-grade Dysplasie	50
	Kolon, Adenokarzinom	1882
	Magen Adenokarzinom, diffuser Typ	176
	Magen Adenokarzinom, intestinaler Typ	174
	Magen Adenokarzinom, gemischter Typ	62
	Adenokarzinom, Ösophagus	83
	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	75
	Plattenepithelkarzinom des Anal-Kanals	89
	Cholangiokarzinom	113
	Hepatozelluläres Karzinom	50
	Ductales Adenokarzinom, Pankreas	612
	Ampulläres Adenokarzinom, Pankreas	89
	Azinuszellkarzinom, Pankreas	16
	Gastrointestinaler Stromatumor (GIST)	50
<b>Tumoren des Harntrakts</b>	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2, low grade	177
	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2, high grade	141
	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa, G3	187
	Urothelkarzinom, pT2-4 G3	1206
	Neuroendokrines Karzinom, kleinzellig, Harnblase	20
	Nierenzellkarzinom	857
	Renalzellkarzinom, papillär	255
	Klarzelliges Renalzellkarzinom, papillär (tubular)	21
	Chromophobes Nierenzellkarzinom	131
	Onkozytom	177
	<b>Tumoren des männlichen Genitaltrakts</b>	Adenokarzinom, Prostata, Gleason 3+3
Adenokarzinom, Prostata, Gleason 4+4		80
Adenokarzinom, Prostata, Gleason 5+5		85
Adenokarzinom, Prostata (Rezidiv)		258
Neuroendokrines kleinzelliges Prostatakarzinom		19
Seminom		621
Embryonales Karzinom, Hoden		50
Dottersack Tumor, Hoden		50
Teratom		50

	Plattenepithelkarzinom, Penis	80
<b>Tumoren des endokrinen Systems</b>	Adenom, Schilddrüse	114
	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	392
	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	154
	Medulläres Schilddrüsenkarzinom	111
	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	45
	Nebennierenrinden Adenom	50
	Nebennierenmarkskarzinom	26
	Phäochromozytom	50
	Pankreas, neuroendokriner Tumor (NET)	22
	Kolorektal, neuroendokriner Tumor (NET)	12
	Ileum, neuroendokriner Tumor (NET)	49
	Lunge, neuroendokriner Tumor (NET)	19
	Pankreas, neuroendokriner Tumor (NET)	97
	Kolorektal, neuroendokrines Karzinom (NEC)	12
	Gallenblase, neuroendokrines Karzinom (NEC)	4
	Pankreas, neuroendokrines Karzinom (NEC)	14
<b>Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes</b>	Hodgkin Lymphom	103
	Klein lymphatisches Lymphoma, B-cell Typ (B-SLL/B-CLL)	50
	Diffuses großes B-Zell-Lymphom (DLBCL)	114
	Follikuläres Lymphom	88
	T-Zell Non-Hodgkin Lymphom	24
	Mantelzell Lymphom	18
	Marginalzonen Lymphom	16
	Diffuses großes B-Zell Lymphom (DLBCL) des Hodens	16
	Burkitt Lymphom	5
<b>Tumoren; Knochen, Weichteile</b>	Tendosynovialer Riesenzelltumor	45
	Granulosazelltumor	53
	Leiomyom	50
	Leiomyosarkom	87
	Liposarkom	132
	Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST)	13
	Myofibrosarkom	26
	Angiosarkom	73
	Angiomyolipom	91
	Dermatofibrosarkom protuberans	21
	Ganglioneurom	14
	Kaposi Sarkom	8
	Neurofibrom	117
	Sarkom, nicht spezifiziert (NOS)	74
	Paragangliom	41
	Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)	23

	Rhabdomyosarkom	6
	Schwannom	121
	Synovial Sarkom	12
	Osteosarkom	43
	Chondrosarkom	38
	<b>Summe</b>	<b>15.099</b>

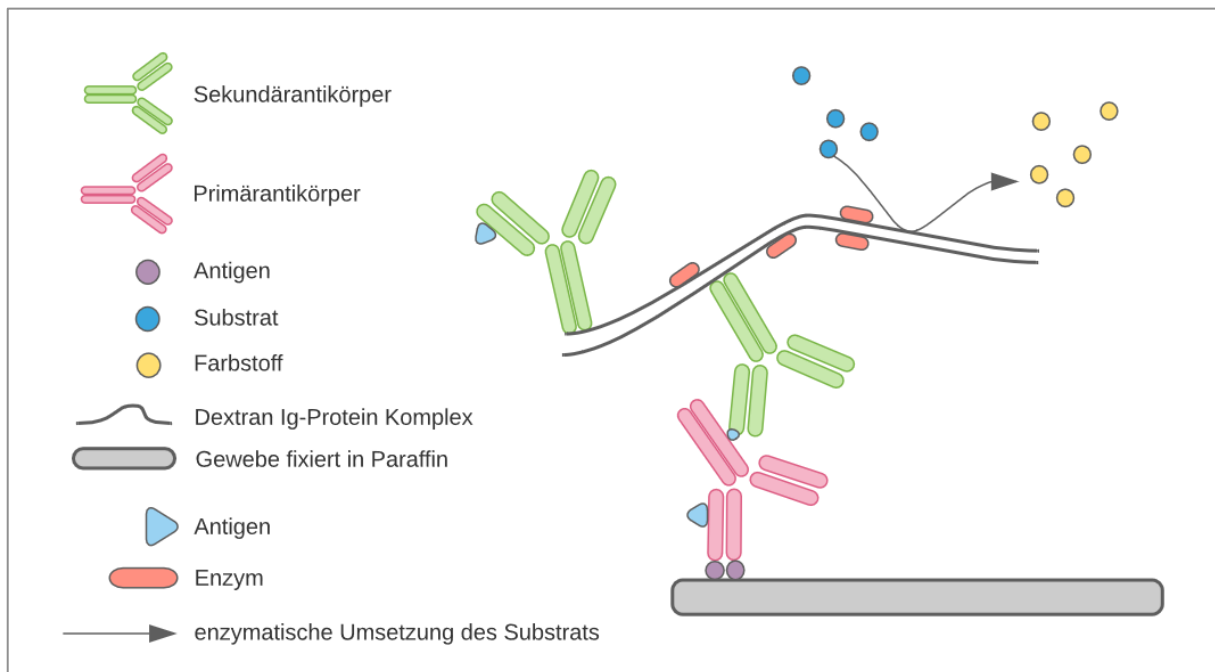
## 2.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren zur Visualisierung von ausgewählten Proteinen auf einem Gewebe-Schnitt (Sternberger et al. 1970). Hierzu werden Antikörper verwendet, welche gegen das Zielprotein auf dem Gewebeschnitt gerichtet sind (Deller 2018). Für die Immunhistochemie geeignete Antikörper stammen typischerweise aus Tieren wie beispielsweise Mäusen, Kaninchen, Ratten oder Hamstern (Kurosawa et al. 2012). Die Tiere werden mit den Zielproteinen „geimpft“. Zum Zeitpunkt der maximalen Antikörperproduktion kann beispielsweise Serum des Tieres gewonnen werden (polyklonaler Antikörper). Eine andere Möglichkeit ist es dem getöteten Tier aus der Milz Antikörper produzierende Zellen zu entnehmen. Durch eine Fusionierung mit einer immortalisierten Tumorzelllinie können monoklonale Antikörper entwickelt werden (Howanitz 1988; Nakamura 1983; Kapadia et al. 2003).

Da Spezies im Falle einer Immunreaktion immer eine breite Palette unterschiedlicher Antikörper gegen ein Zielprotein entwickeln, entstehen im Prozess der Antikörperherstellung eine Vielzahl verschiedener Antikörper, die sich in ihren Bindungseigenschaften unterscheiden (Saper 2009; Lu et al. 2020; Forthal 2014). Unterschiedlich sind insbesondere die Bindungsaffinität und die Spezifität. Aus diesem Grund unterscheiden sich die zahlreichen verschiedenen kommerziell erhältlichen Antikörper gegen ein bestimmtes Zielprotein in ihren Färbereigenschaften teilweise erheblich, was eine umfassende Validierung von Antikörpern notwendig macht, falls diese für wissenschaftliche Experimente oder gar diagnostisch eingesetzt werden sollen (Bordeaux et al. 2010; Rathanaswami et al. 2008; Bostrom et al. 2009; Butko et al. 2014; Delia et al. 1991).

Da Antikörper per se farblos sind, beinhaltet die immunhistochemische Färbung neben der Aufbringung eines Antikörpers zusätzliche Schritte. Zur Visualisierung von gebundenen Primärantikörpern werden Sekundärantikörper verwendet, welche mit einem Färbesystem konjugiert sind. Sekundärantikörper sind prinzipiell in einer anderen Spezies (als der Primärantikörper) hergestellte Antikörper, die sich gegen den Fc-Teil von Antikörpern der Primärantikörper-Spezies richten und sich damit an die gebundenen Antikörper binden, sodass sich diese in der Folge durch das Färbungssystem visualisieren lassen.

Typischerweise verwendete Färbesysteme sind die direkte und indirekte Methode (Ramos-Vara und Miller 2014). Bei der direkten Methode ist der Primärantikörper direkt mit einem Enzym oder Fluorophor konjugiert (Nakane und Pierce 1966; Im et al. 2019; Nakane und Kawaoi 1974). Der Antikörper wird hinzugegeben und reagiert mit dem zu untersuchenden Antigen. Das Reaktionsprodukt wird mit einem anschließend zugegebenen Substrat/ Chromogen gefärbt. Bei der indirekten Methode erfolgt die Bindung des Antigens an einem unkonjugierten Primärantikörper (Im et al. 2019). Ein zweiter Antikörper (Sekundärantikörper) ist mit einem Enzym (Peroxidase) konjugiert und bindet spezifisch an den Primärantikörper (Heyderman 1979). Der Sekundärantikörper ist mit einem Enzym gekoppelt. Die Enzym-Substrat-Reaktion löst die Farbentstehung aus (DeLellis et al. 1979). In der Regel kommt zusätzlich ein Signalverstärkungselement zum Einsatz (Ramos-Vara und Miller 2014). Eine Darstellung der immunhistochemischen Färbung ist in Abbildung 14 schematisch dargestellt. Ein wesentlicher Aspekt der Immunhistochemie an formalinfixierten Geweben ist die Tatsache, dass die Zielproteine der immunhistochemischen Reaktion im Rahmen der Fixierung verändert werden. Bei Formalinfixierung erfolgt ein sogenanntes „Cross-linking“. Dies bedeutet, dass die Fixierung zu einer Vernetzung von Proteinen führt. Die Epitope, an die die Antikörper binden sollen, werden folglich selbst verändert oder durch Konformationsänderungen der Proteine sind diese nicht mehr zugänglich (Shi et al. 1991). Viele Antikörper funktionieren deswegen nicht oder nur sehr eingeschränkt an formalinfixierten Geweben. Durch die Methode der hitzeinduzierten Epitop-Demaskierung (Heat induced Epitop Retrieval, HIER) ist dieser Prozess teilweise reversibel. Das HIER-Verfahren beinhaltet eine massive Erhitzung (90-120 Grad) der für die Immunhistochemie vorgesehenen Schnitte in flüssiger Lösung, wobei je nach Protein ein leicht saurer (pH 6) oder basischer (pH 9) pH-Wert die Antigendemaskierung optimieren kann (Shi et al. 1991).



**Abbildung 14: Mechanismus einer immunhistochemischen Färbung – indirekte Methode (modifiziert nach Ramos-Vara und Miller 2014)**

Der Primärantikörper bindet ein spezifisches Antigen. Der Sekundäreantikörper bindet ein spezifisches Antigen. Dieses ist auf dem Primärantikörper lokalisiert. Die Dextran-Membran dient als Verstärkungselement, dort ist ein Enzym gebunden (beispielsweise die Meerrettichperoxidase). Das Enzym oxidiert ein bestimmtes Substrat (Diaminobenzidin zu einem braunen Farbstoff). Somit lässt die Färbung des Gewebes Rückschluss auf das Vorkommen des Proteins zu. Das Protein gehört zu dem spezifischen Antigen.

## 2.4 Immunhistochemische Untersuchungen im Rahmen der Studie

Der immunhistochemische Färbeprozess ist in in Tabelle 4 dargestellt. Die angefertigten TMA-Schnitte (Mikrotom-Technologie; Schnittdicke 2,5 µm) wurden am gleichen Tag in einem Experiment immunhistochemisch gefärbt. Die Schnitte wurden zunächst mittels einer Xylol-Behandlung (3\*5 Min.) entparaffiniert. Anschließend folgte die Rehydrierung mittels einer absteigenden Alkoholreihe und im Anschluss wurde mit Aqua destillata gespült. Nun wurden die Schnitte insgesamt 5 Minuten lang in einem Autoklav bei 121 Grad und einem pH-Wert von 7,8 (DakoTarget Retrieval Solution™ (Agilent, CA, USA; #S2367)) einer hitzeinduzierten Antigengewinnung ausgesetzt. Es erfolgte die zweifache Spülung mit Aqua destillata, die Inkubation in einem Brutschrank und die Spülung mit einem TBS-T-Puffer für zweimal 5 Minuten. Die endogene Peroxidase-Aktivität wurde mit einer Dako Peroxidaseblock-Lösung (Agilent, CA, USA; #52023) blockiert (10 Minuten) und anschließend zweimal 5 Minuten in einem Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Spülung mit dem TBS-T-Puffer. Die für CELA3B spezifischen Primärantikörper (Kaninchen rekombinant, MS Validated Antibodies, Hamburg, Germany, MSVA-410M) und die für GP2 spezifischen Primärantikörper (Maus rekombinant, MS Validated Antibodies, Hamburg, Germany, MSVA-475M) wurden für 60 Minuten bei 37 Grad mit einer Verdünnung (GP2 von



1:450 und CELA3B von 1:1800) aufgetragen und anschließend mit TBS-T-Puffer gespült (2\*5 Minuten). Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 30 Minuten bei 37 Grad und anschließend die Spülung mit einem TBS-T-Puffer (2\*5 Minuten). Es folgte für 10 Minuten die Zugabe des Chromogens (DAB-Chromogen, DaKo) und eine einmalige Spülung mit Aqua destillata. Gebundene Antikörper wurden mit dem EnVision Kit™ gemäß den Angaben des Herstellers sichtbar gemacht. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (3 Min.) und das Bläuen mit Leitungswasser (5 Min.). Die Einbettung gelang durch eine Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe bis Xylol. Der letzte Schritt war die Deckelung jedes einzelnen Objektträgers. Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 15 dargestellt.

Für das Normalgewebe wurde die Färbintensität positiver Zellen semiquantitativ bestimmt (+, ++, +++). Für das Tumorgewebe wurde der Prozentsatz positiver neoplastischer Zellen geschätzt und die Färbintensität wurde ebenfalls semiquantitativ bestimmt (0, 1+, 2+, 3+).

**Tabelle 4: Arbeitsschritte des Färbeprozesses der TMA-Schnitte**

Dargestellt sind die verschiedenen Schritte des Färbeprozesses. Diese Tabelle wurde aus eigenen Daten selbstständig erstellt.

Ziel	Reagenzien und Arbeitsschritte	Dauer und Bedingung
1. Vorbereitung Objektträger	Von jedem TMA-Block wird ein 2,5 µm dicker Schnitt hergestellt	
2. Entparaffinierung	Xylol-Behandlung	3*5 Min.
	Rehydrierung mittels einer absteigenden Alkoholreihe → Spülung mittels Aqua destillata	
3. Demaskierung der Antigene	Inkubation mit Tris-EDTA-Citrat-Puffer (pH 7,8) im Autoklav → Target Retrieval Solution Buffer, DAKO)	5 Min., 121 Grad
	Spülen mit Aqua destillata	2*
	Inkubation im Brutschrank und Spülung mit TBS-T-Puffer	2*5 Min.
4. Peroxidaseblock	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Behandlung (Peroxidase Blocking Solution) → Vermeidung der nicht spezifischen Antikörperbindung	10 Min.
	Inkubation im Brutschrank und Spülung mit TBS-T-Puffer	2*5 Min.
5. Inkubation mit dem Primärantikörper	Inkubation mit Primärantikörper; CELA3B: MSVA-410M; Verdünnung: 1:1800 GP2: MSVA-475M; Verdünnung: 1:450	60 Min., 37 Grad
	Inkubation im Brutschrank und Spülung mit TBS-T-Puffer	2*5 Min.
6. Inkubation mit dem Sekundärantikörper	Zugabe des Sekundärantikörpers (Dako Real EnVision Detection System)	30 Min., 37 Grad
	Inkubation im Brutschrank und Spülung mit TBS-T-Puffer	2*5 Min.

7. Chromogenprozess	Zugabe des Chromogens (DAB-Chromogen, Dako)	10 Min.
	Spülen mit Aqua destillata	1*
8. Gegenfärbung	Hämatoxylin	3 Min.
	Bläuen mit Leitungswasser	5 Min.
8. Einbettung	Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe bis Xylol → Folgt die Deckung jedes Objektträgers	

## 2.5 Auswertung der Färbung am Tumor TMA

Für jeden einzelnen Gewebe-Spot wurde im Falle einer Anfärbung der prozentuale Anteil der gefärbten Tumorzellen und die Färbeintensität auf einer semiquantitativen Skala von 1-3 festgelegt. Die einzelnen Tumoren wurden dann nach einem vorher festgelegten System auf Grund der prozentualen Menge positiver Tumorzellen und der Färbeintensität in die vier Kategorien negativ, schwach positiv, moderat positiv und stark positiv eingeteilt. Tumoren ohne jegliche Färbung wurden als negativ angesehen. Tumoren mit einer Färbeintensität von 1+ in  $\leq 70\%$  der Tumorzellen oder einer Intensität von 2+ in  $\leq 30\%$  der Tumorzellen wurden als schwach positiv angesehen. Tumoren mit einer Färbeintensität von 1+ in  $> 70\%$  der Tumorzellen, 2+ Intensität in 31-70% der Tumorzellen oder 3+ - in  $\leq 30\%$  der Tumorzellen wurden als mäßig positiv angesehen. Tumoren mit einer Intensität von 2+ in  $> 70\%$  der Tumorzellen oder 3+ - in  $> 30\%$  der Tumorzellen wurden als stark positiv bewertet. Die hierfür verwendeten Einteilungskriterien sind in Tabelle 5 dargestellt.

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

**Tabelle 5: Klassifikationssystem**

Dargestellt ist das für die Studie verwendete Klassifikationssystem zur Interpretation der immunhistochemischen Färbung. Diese Tabelle wurde aus eigenen Daten selbstständig erstellt.

## 2.6 Statistik

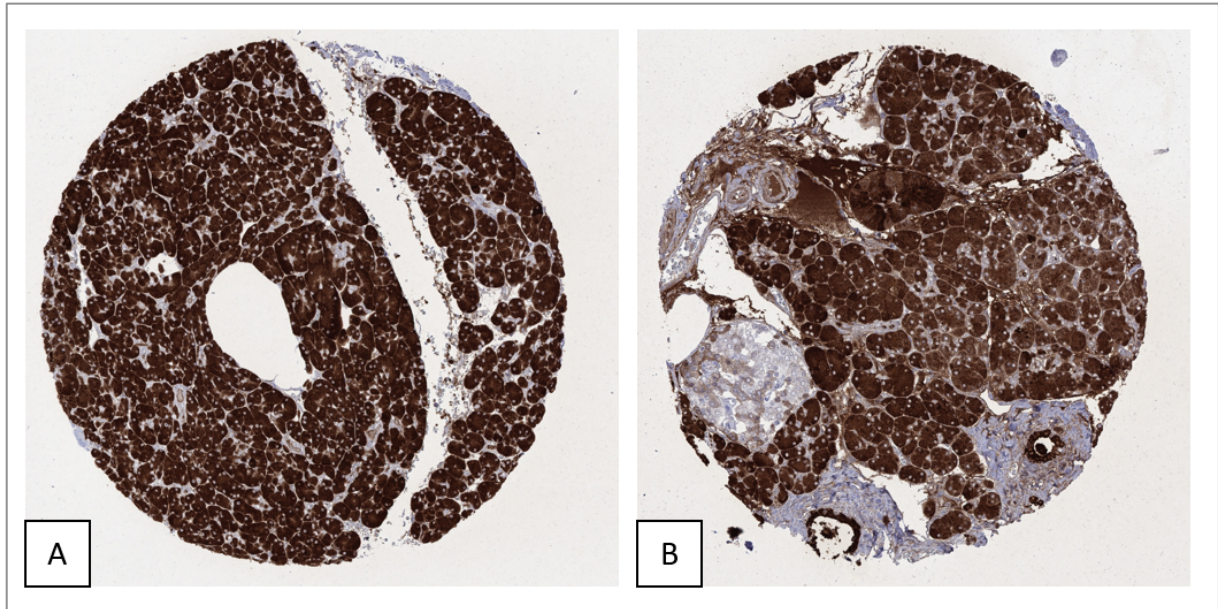
Die statistischen Berechnungen wurden mit der Software JPM 12 (SAS Institute Inc., NC, USA) durchgeführt. Kontingenztabellen und der  $\chi^2$ -Test wurden durchgeführt, um nach Assoziationen zwischen molekularen Parametern und Tumorphänotyp zu suchen.

## 3 Ergebnisse

### 3.3 CELA3B

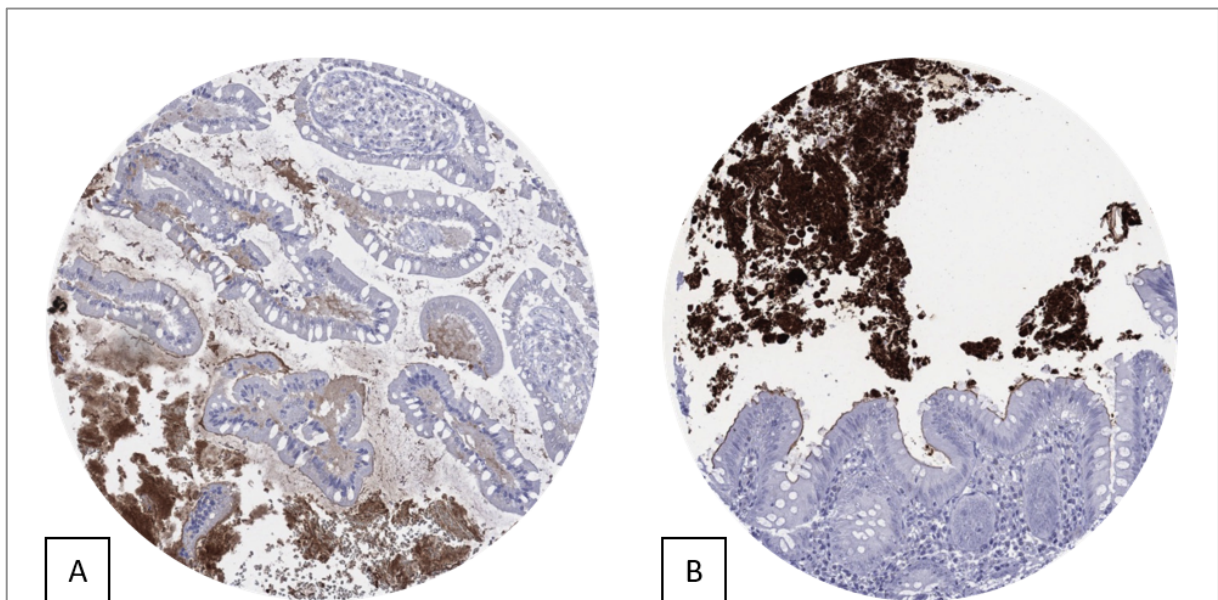
#### 3.3.1 CELA3B in Normalgeweben

In der Bauchspeicheldrüse wurde eine starke zytoplasmatische CELA3B-Immunfärbung in allen Azinuszellen und in einer Fraktion von Duktuszellen beobachtet. Im Ileum und im Kolorektum wurde in einer Fraktion von Proben mit variabler Intensität eine deutliche Färbung der apikalen Membranen von Oberflächenepithelzellen beobachtet (Abbildung 15 und 16). Eine CELA3B-Färbung fehlte vollständig in folgenden Gewebekategorien: quergestreifte Muskulatur, Herzmuskel, glatte Muskulatur, Myometrium der Gebärmutter, Corpus spongiosum des Penis, Ovar (Stroma), Fett, Haut, Haarfollikel, Mundschleimhaut der Lippe, Mundhöhle, Oberflächenepithel der Tonsillen und Übergangsschleimhaut des Analkanals, Ektozervix, Plattenepithel der Speiseröhre, Urothel des Nierenbeckens und der Harnblase, Dezidua, Trophoblasten-Zellen der Plazenta, Lymphknoten, Milz, Thymus, Tonsille, Oberflächenschleimhaut des Magens und der Gallenblase, Leber, Parotis, Glandula submandibularis und sublingualis, Niere, Prostata, Samenbläschen, Nebenhoden, Hoden, respiratorisches Epithel, Lunge, Brust, Endozervix, Eileiter, Gelbkörper und Follikelzyste des Ovars, Nebenschilddrüse, Kleinhirn, Großhirn und Neurohypophyse. Repräsentative Bilder sind in Abbildung 17 bis 20 dargestellt.



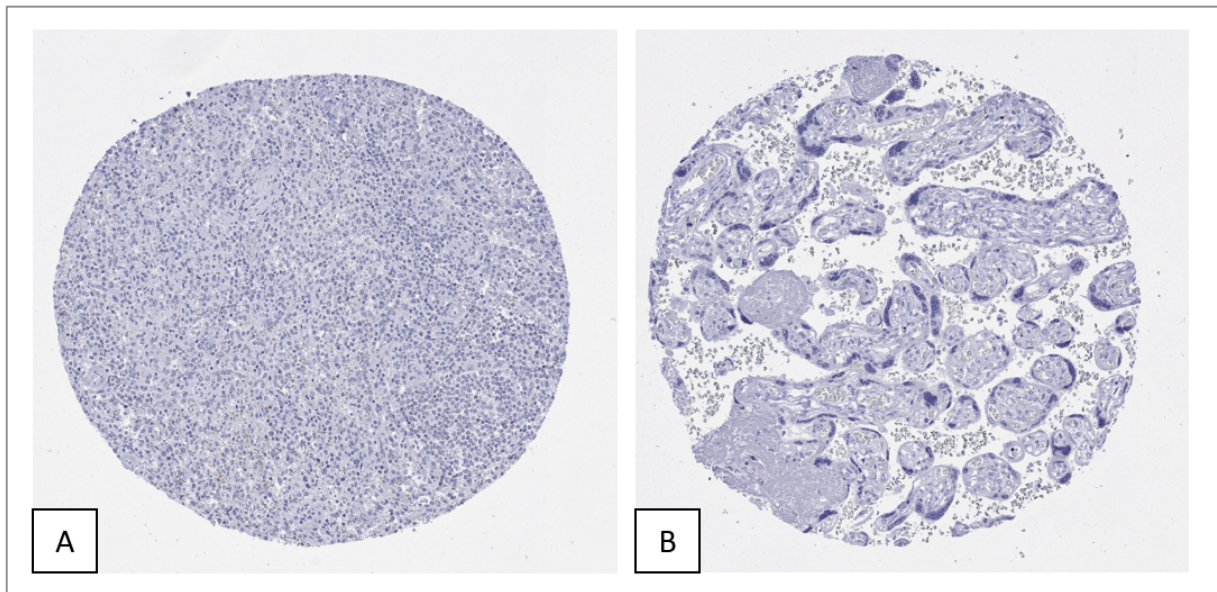
**Abbildung 15: Abbildung von zwei Gewebestanzten aus dem Normalgewebe-Array**

A: Normalgewebe des Pankreas mit einer „stark positiven“ zytoplasmatischen CELA3B Immunfärbung des Gewebes. B: Gewebestanze aus dem Normalgewebe des Pankreas mit einer ebenfalls „stark positiven“ CELA3B Immunfärbung des Gewebes, im Gangepithel und fokale schwache zytoplasmatische Färbung in einigen Zellen der Langerhans Inseln. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



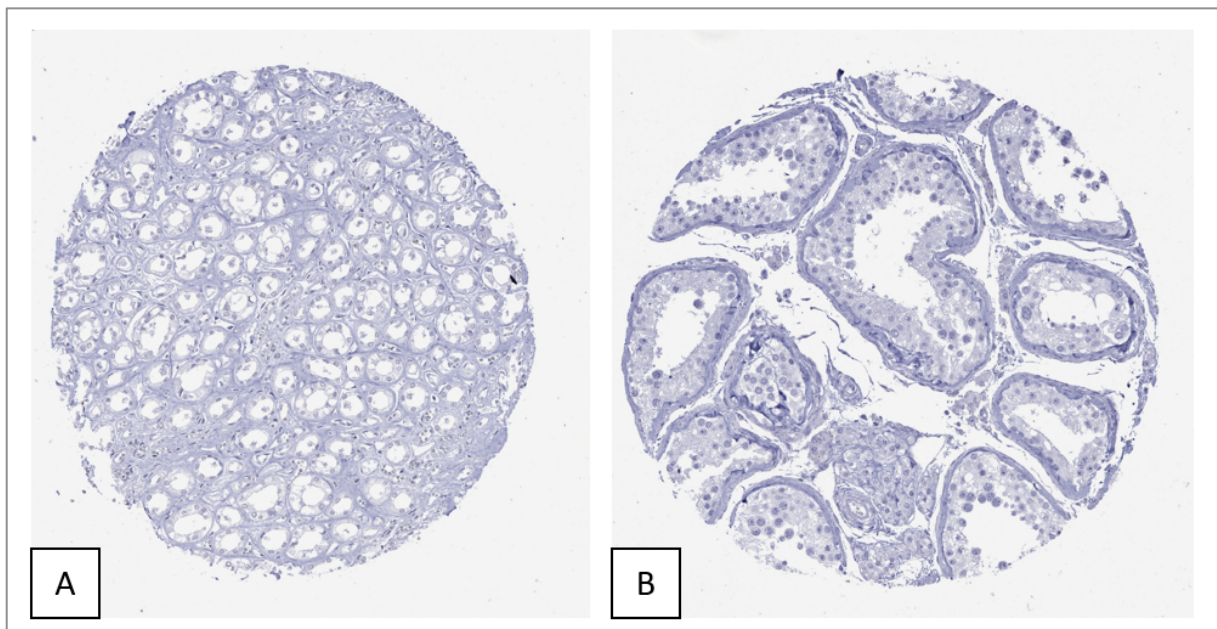
**Abbildung 16: Abbildung von zwei Gewebestanzten aus dem Normalgewebe-Array**

A: Fokale apikale „membranöse“ CELA3B Immunfärbung innerhalb des Bürstensaumes des Ileums, sowie eine positive Färbung in extrazellulärem Muzin und Debris. B: Fokale apikale „membranöse“ Färbung des Kolons, sowie stark positive Immunfärbung in extrazellulärem Debris/ Kot. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



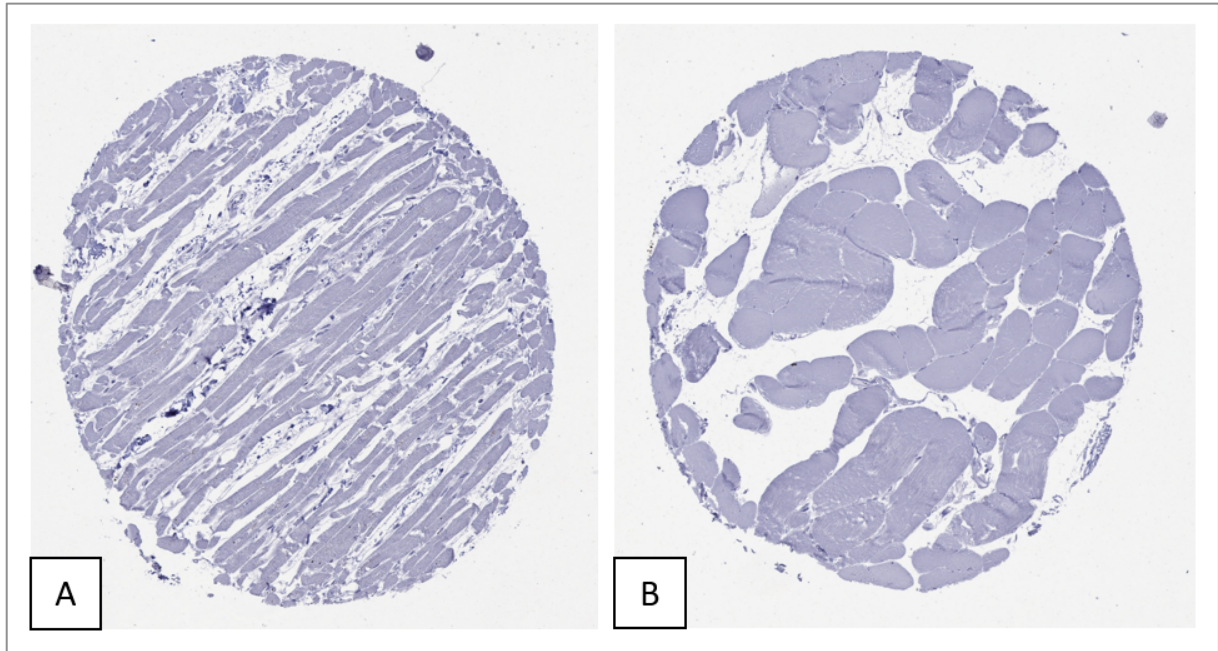
**Abbildung 17: Abbildung von zwei Gewebestanzten aus dem Normalgewebe-Array**

Abgebildet sind zwei Gewebestanzten, wobei es sich bei A: um Gewebe der Milz und B: um Gewebe der reifen Plazenta handelt. Beide Gewebe sind ohne nachweisbare CELA3B Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



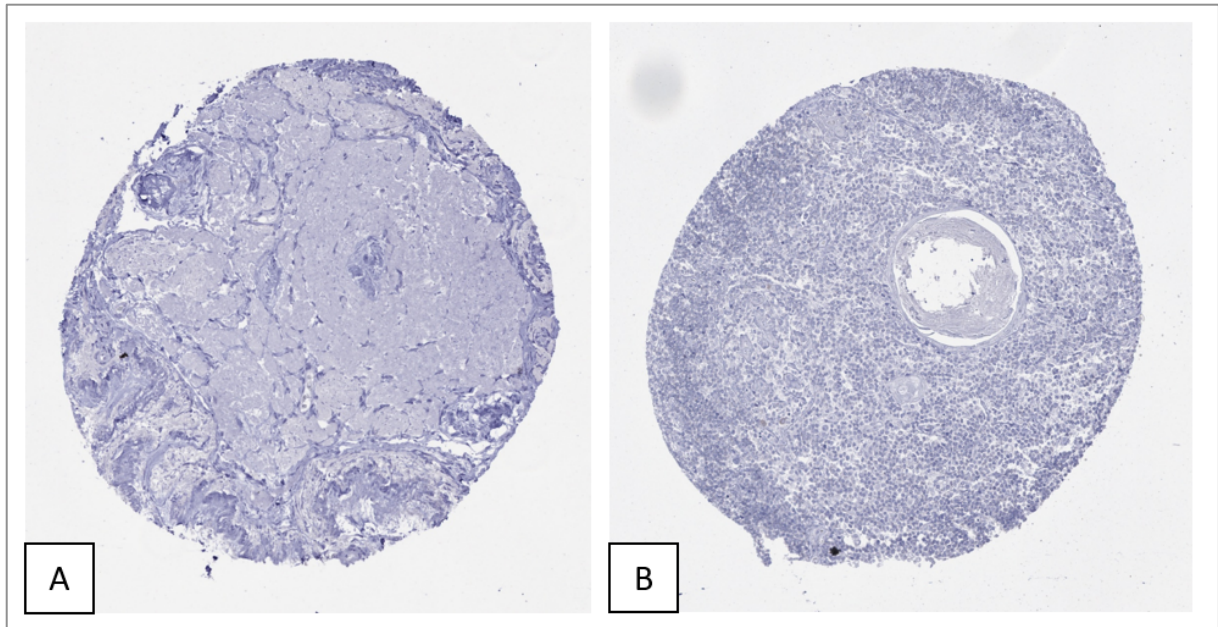
**Abbildung 18: Abbildung von zwei Gewebestanzten aus dem Normalgewebe-Array**

Abgebildet sind zwei Gewebestanzten, wobei es sich bei A: um Gewebe des Nierenmarks und B: um Gewebe des Hodengewebes handelt. Beide Gewebe sind ohne nachweisbare CELA3B Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



**Abbildung 19: Abbildung von zwei Gewebestanzen aus dem Normalgewebe-Array**

Abgebildet sind zwei Gewebestanzen, wobei es sich bei A: um Gewebe des Herzens und B: um Gewebe der gestreiften Muskulatur handelt. Beide Gewebe sind ohne nachweisbare CELA3B Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.

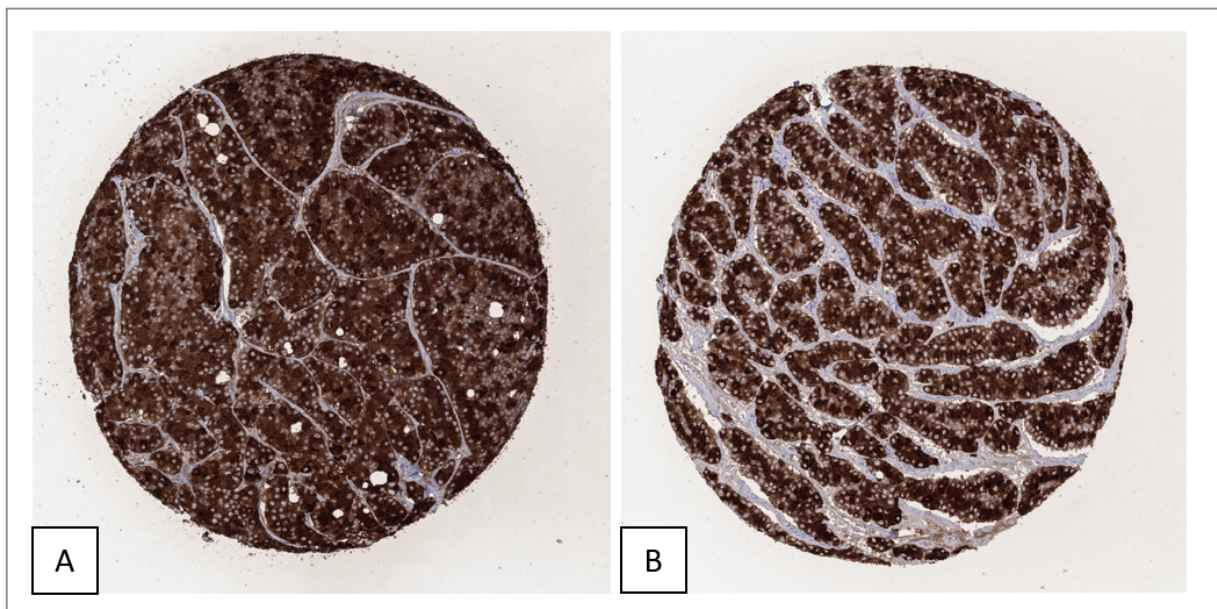


**Abbildung 20: Abbildung von zwei Gewebestanzen aus dem Normalgewebe-Array**

Abgebildet sind zwei Gewebestanzen, wobei es sich bei A: um Gewebe des Ovars (Stroma) und B: um Gewebe des Thymus handelt. Beide Gewebe sind ohne nachweisbare CELA3B Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.

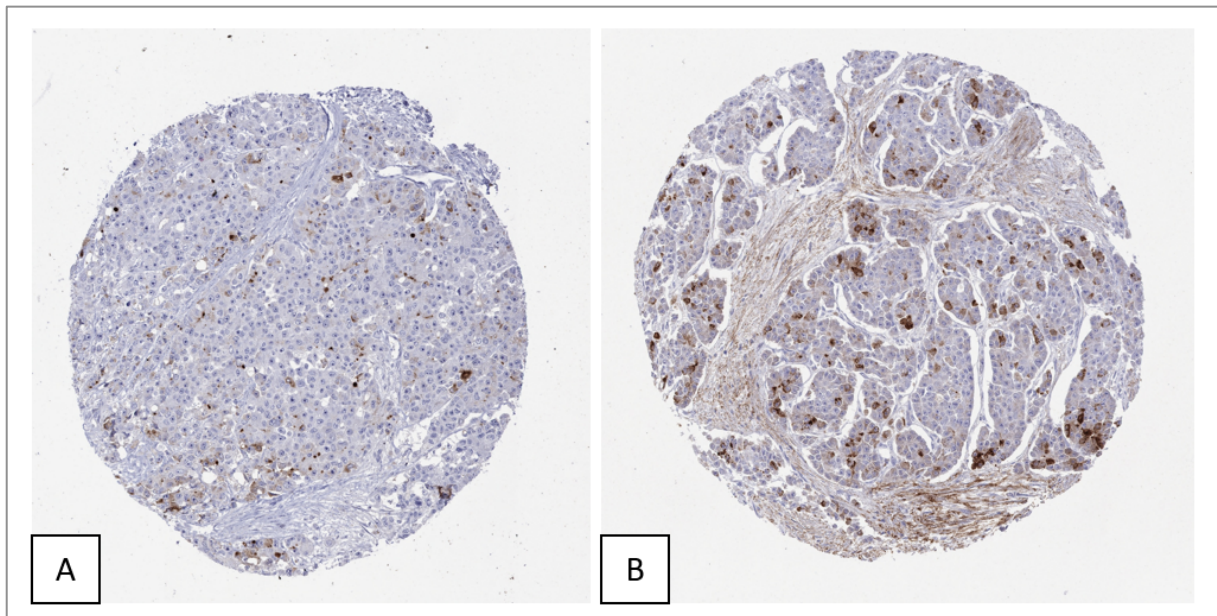
### 3.1.2 CELA3B in Tumorgeweben

Eine CELA3B-Immunfärbung wurde bei 23 von 13.223 erfolgreich analysierten Tumoren beobachtet. Die 23 Tumoren gehören alle zu nur 5 von insgesamt 132 analysierten Tumorkategorien. Eine zytoplasmatische CELA3B-Positivität wurde am häufigsten beim Azinuszellkarzinom des Pankreas (75% von 16 Spots positiv, 37,5% stark positiv) beobachtet (Abbildung 21 bis 23). Bei Speicheldrüsentumoren (1,2% mukoepidermoid Karzinom, 1,1% adenoidzystisches Karzinom und 0,8% Azinuszellkarzinom) wurde in Einzelfällen eine schwache bis mäßige zytoplasmatische Färbung beobachtet (Abbildung 24 bis 26). Bei 0,3% der 1.765 Adenokarzinome des Kolons wurde eine schwache bis mäßige Färbung im intra- und extrazellulärem Muzin/Debris mit einer stärkeren Färbung hin zum Kolonlumen gefunden (Abbildung 27). Bei weiteren 10.978 ausgewerteten Tumoren aus 127 verschiedenen Tumorarten und -subtypen fehlte die CELA3B-Immunfärbung vollständig. Repräsentative Bilder sind in Abbildung 28 und 29 dargestellt.



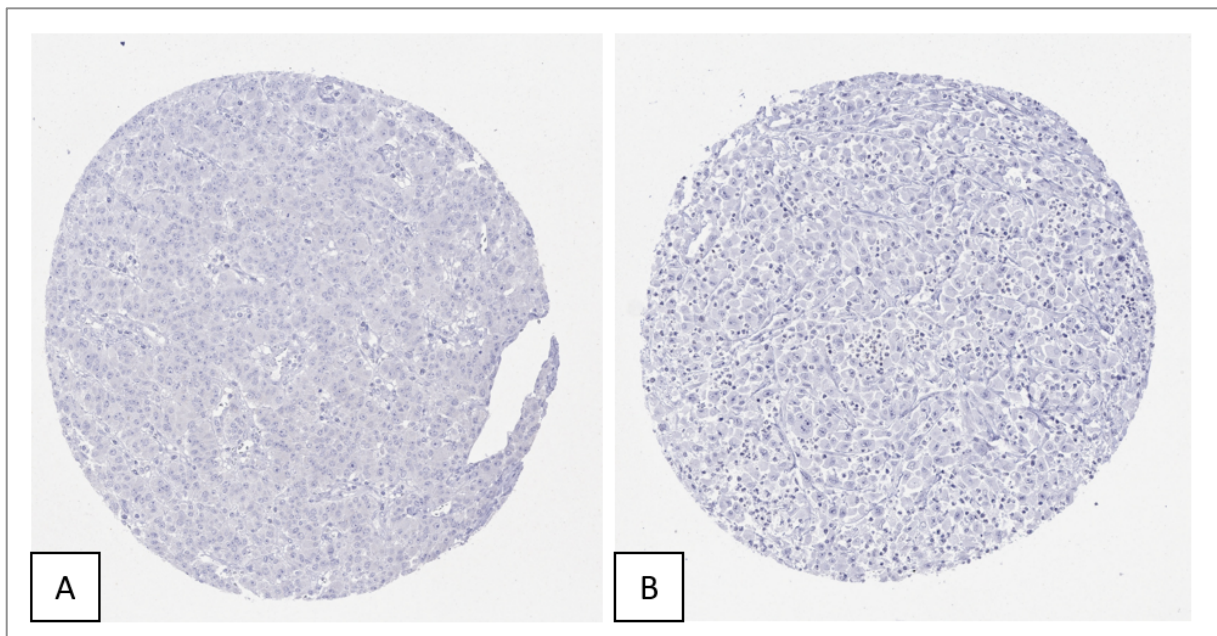
**Abbildung 21: Abgebildet sind zwei Gewebestanzten aus dem TMA)**

A: Gewebe eines Azinuszellkarzinoms des Pankreas mit einer „stark positiven“ CELA3B Immunfärbung in 100% der Tumorzellen. B: Gewebe eines Azinuszellkarzinoms des Pankreas mit einer homogenen „stark positiven“ CELA3B Immunfärbung in 100% der Tumorzellen. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



**Abbildung 22: Abgebildet sind zwei Gewebestanzten aus dem TMA**

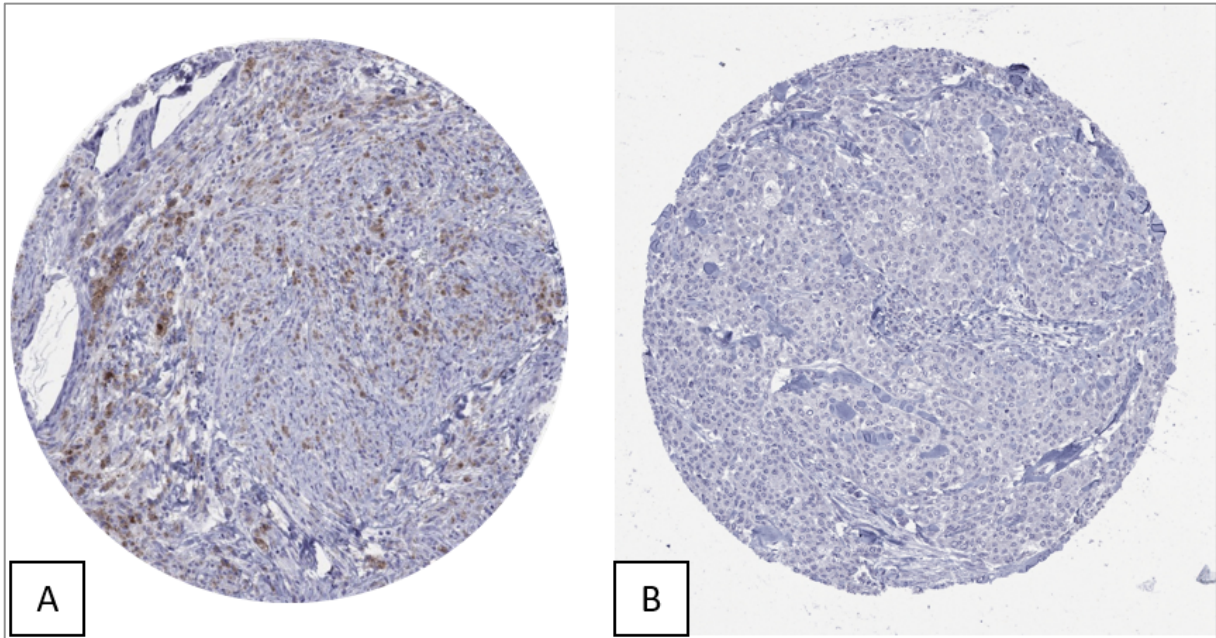
A: Gewebe eines Azinuszellkarzinoms des Pankreas mit einer „schwachen positiven“ CELA3B Immunfärbung in ca. 30% der Tumorzellen. B: Gewebe eines Azinuszellkarzinoms des Pankreas mit einer fokal schwachen bis vereinzelt starken zytoplasmatischen Färbung in einzelnen Tumorzellen. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



**Abbildung 23: Abgebildet sind zwei Gewebestanzten aus dem TMA**

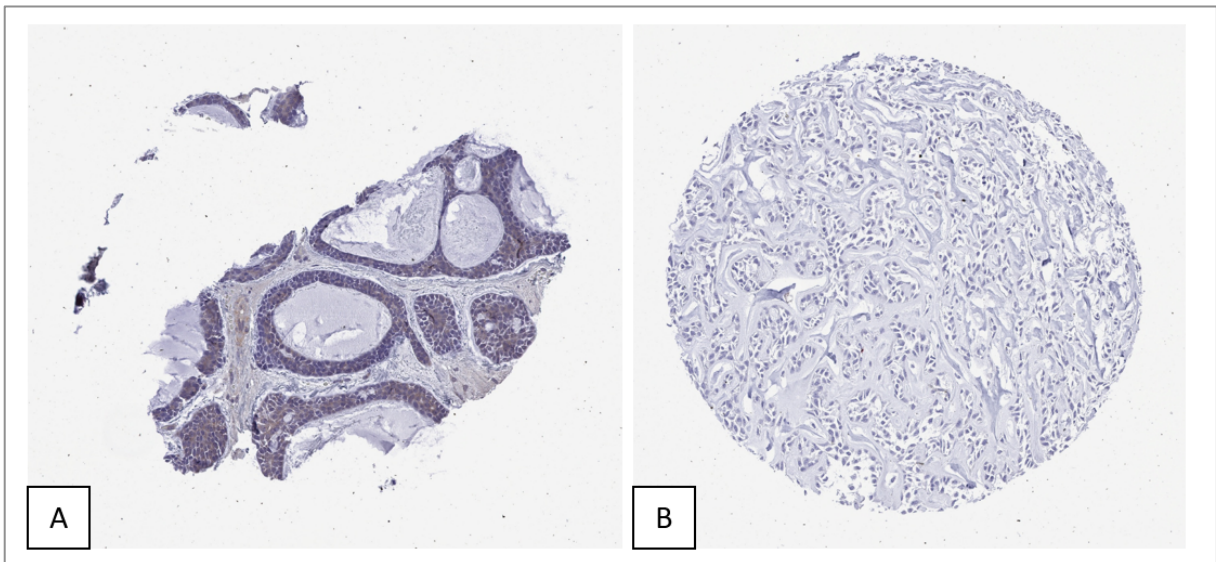
Abgebildet sind zwei Gewebestanzten, wobei es sich bei A und B um Gewebe eines Azinuszellkarzinoms des Pankreas handelt. Beide Gewebe sind ohne nachweisbare CELA3B Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.





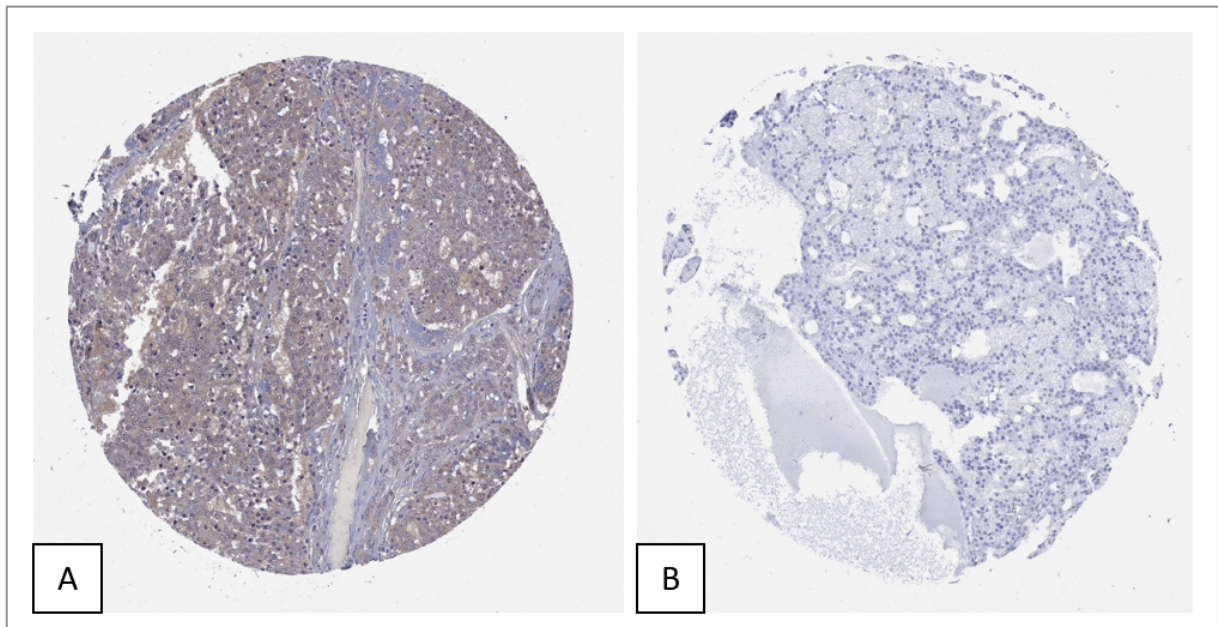
**Abbildung 24: Abgebildet sind zwei Gewebestanzes aus dem TMA**

A: Gewebe eines mucoepidermoid Karzinoms mit einer schwachen bis moderaten zytoplasmatischen CELA3B Immunfärbung der Tumorzellen. B: Gewebe eines mucoepidermoid Karzinoms ohne nachweisbare CELA3B Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.

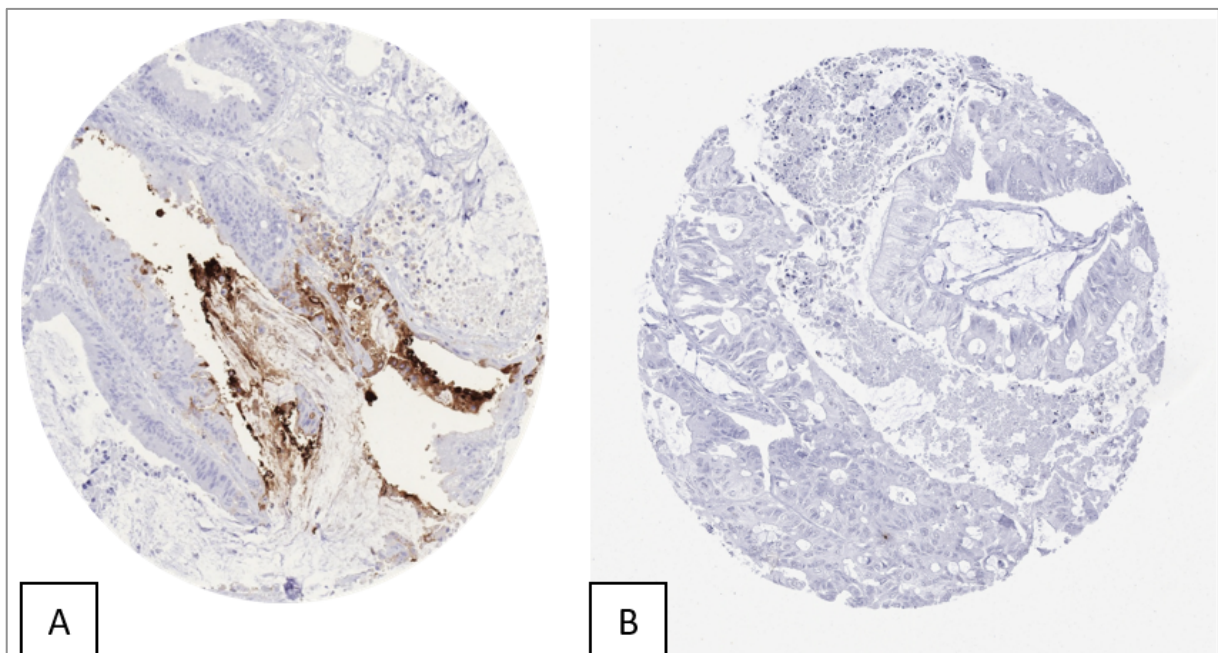


**Abbildung 25: Abgebildet sind zwei Gewebestanzes aus dem TMA**

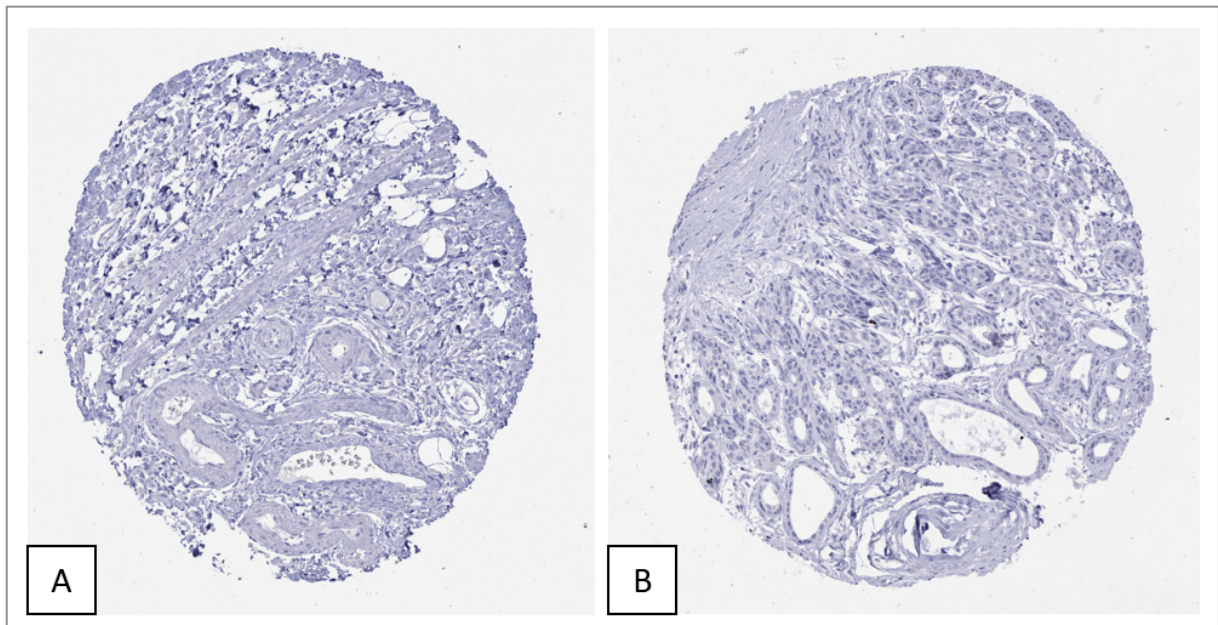
A: Gewebe eines adenoidcystischen Karzinoms mit einer „moderat positiven“ CELA3B Immunfärbung in 100% der Tumorzellen. B: Gewebe eines adenoidcystischen Karzinoms ohne nachweisbare CELA3B Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



**Abbildung 26: Abgebildet sind zwei Gewebestansen aus dem TMA (Verwendung eigener Daten)**  
 A: Gewebe eines Azinuszellkarzinoms der Speicheldrüse mit einer „moderat positiven“ CELA3B Immunfärbung in 100% der Tumorzellen. B: Gewebe eines Azinuszellkarzinoms der Speicheldrüse ohne nachweisbare CELA3B Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.

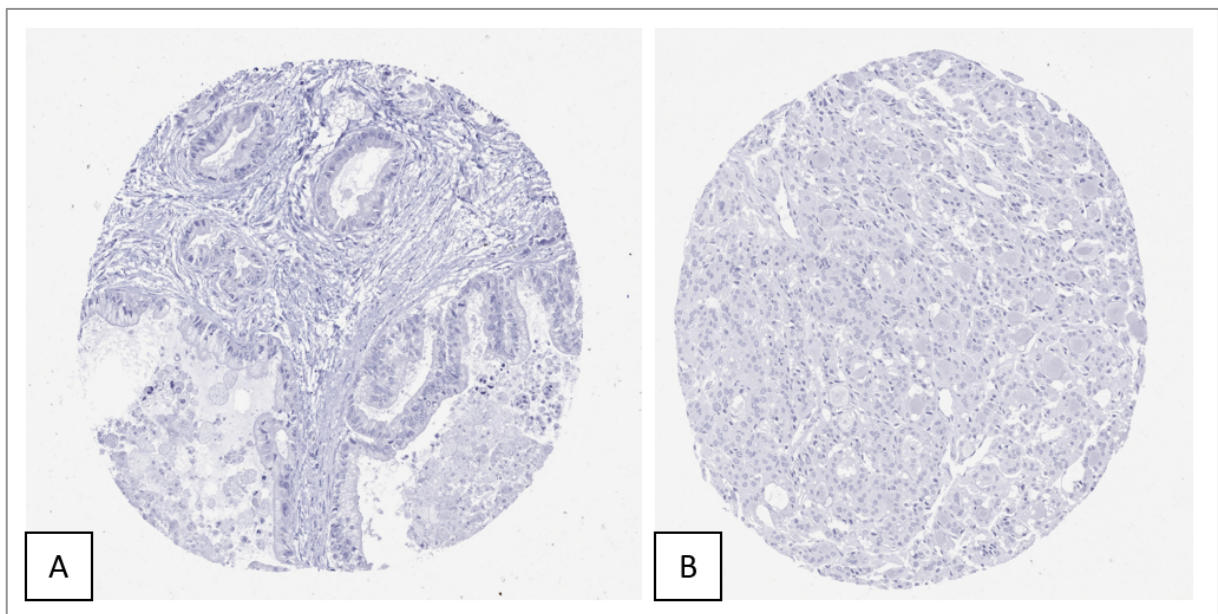


**Abbildung 27: Abgebildet sind zwei Gewebestansen aus dem TMA**  
 A: Fokale apikale membranöse oder muzinöse CELA3B Immunfärbung und fokale zytoplasmatische Färbung von Tumorzellen in einem kolorektalen Karzinom B: Gewebe eines Adenokarzinoms des Kolons ohne nachweisbare CELA3B Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



**Abbildung 28: Abgebildet sind zwei Gewebestanzten aus dem TMA**

A: Gewebe eines Magenkarzinoms „diffuser Typ“ ohne nachweisbare CELA3B Immunfärbung. B: Gewebe eines lobulären Mammakarzinoms ohne nachweisbare CELA3B Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



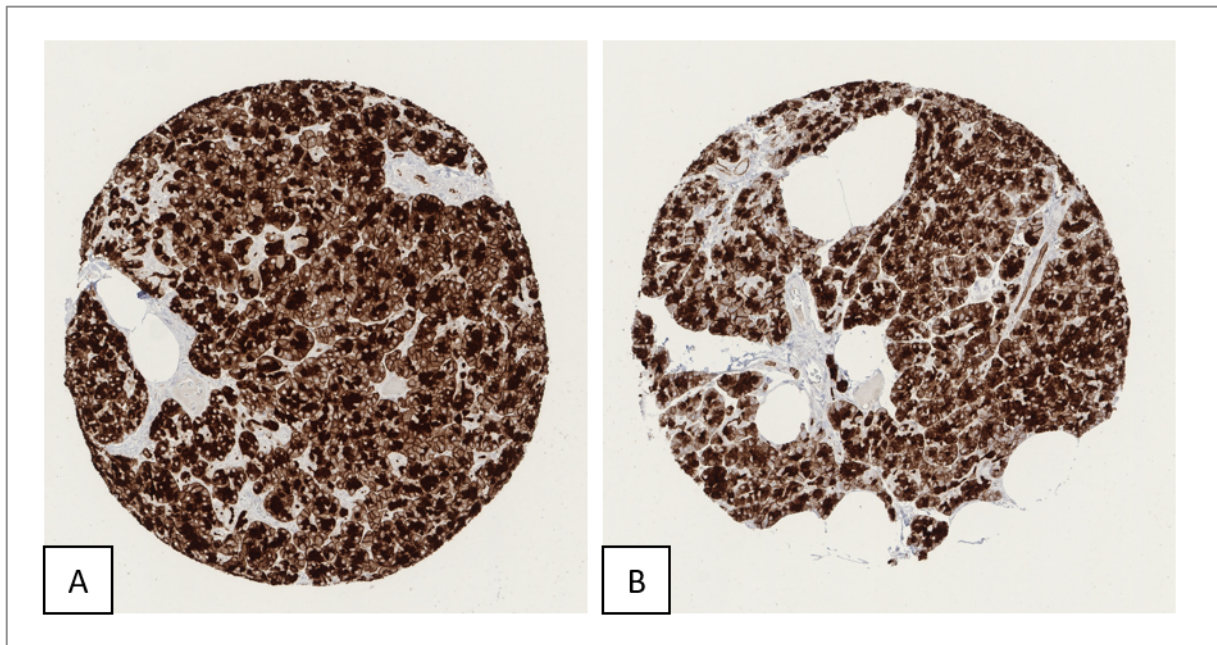
**Abbildung 29: Abgebildet sind zwei Gewebestanzten aus dem TMA**

A: Gewebe eines duktaalen Adenokarzinoms des Pankreas ohne nachweisbare CELA3B Immunfärbung. B: Gewebe eines Adenokarzinoms der Schilddrüse ohne nachweisbare CELA3B Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.

## 3.4 GP2

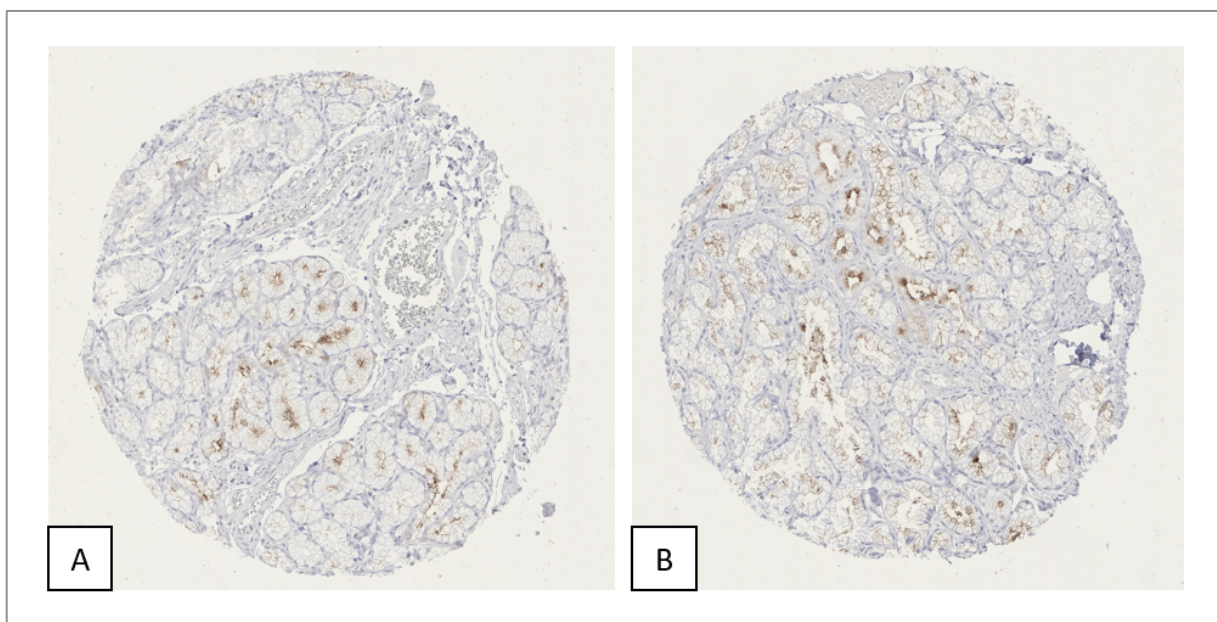
### 3.4.1 GP2 in Normalgeweben

In Azinuszellen des Pankreas trat sowohl eine starke zytoplasmatische als auch eine membranöse GP2-Färbung auf. Bei diesen Zellen zeigte die Färbung oft eine Dominanz an den apikalen Membranen (Abbildung 30). Eine deutlich schwächere zytoplasmatische GP2-Färbung mit überwiegender Färbung der apikalen Membran wurde regelmäßig im Zytoplasma des Duodenums (Brunner-Drüse) (Abbildung 31) und - in einem Bruchteil der Proben - auch in Drüsen des Magenantrums, des Gallenblasenepithels, in wenigen serösen Zellen der Bronchien und in einigen endometrialen Drüsen beobachtet (Abbildung 32 und 33). Die GP2-Färbung fehlt vollständig in den folgenden Gewebekategorien: quergestreifte Muskulatur, Herzmuskel, glatte Muskulatur, Myometrium der Gebärmutter, Corpus spongiosum des Penis, Ovar (Stroma), Fett, Haut (einschließlich der Haarfollikel und Talgdrüsen), Mundschleimhaut der Lippe, Mundhöhle, Oberflächenepithel der Tonsillen und Übergangsschleimhaut des Analkanals, Ektozervix, Plattenepithel der Speiseröhre, Urothel des Nierenbeckens und der Harnblase, Dezidua, Plazenta trophoblastische Zellen, Lymphknoten, Milz, Thymus, Tonsille, Oberflächenschleimhaut des Duodenums, Ileum, Appendix, Dickdarm, Rektum, Leber, Parotis, Glandula submandibularis und sublingualis, Niere, Prostata, Samenbläschen, Nebenhoden, Hoden, respiratorisches Epithel, Lunge, Brust, Endozervix, Eileiter, Gelbkörper, Follikelzyste des Eierstocks, Nebenniere, Nebenschilddrüse, Kleinhirn, Großhirn und Hypophyse. Repräsentative Bilder sind in den Abbildungen 34 bis 36 dargestellt.



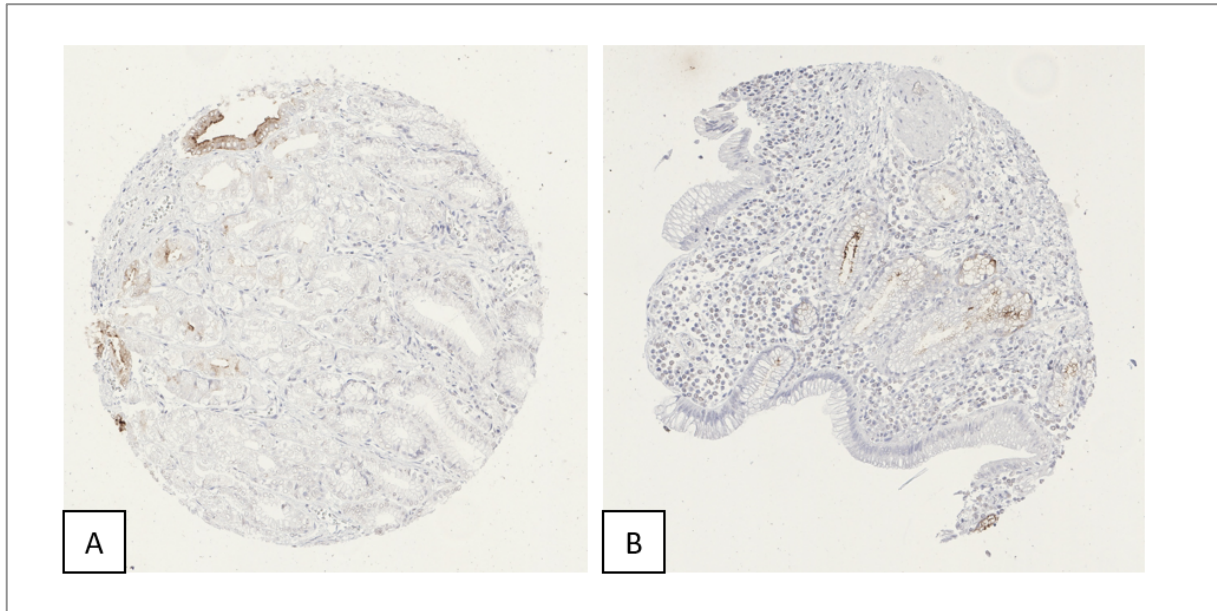
**Abbildung 30: Abbildung von zwei Gewebestanzten aus dem Normalgewebe-Array**

A: Normalgewebe des Pankreas mit einer „stark positiven“ sowohl zytoplasmatischen als auch membranösen GP2 Immunfärbung azinärer Pankreasdrüsen. B: Gewebestanze aus dem Normalgewebe des Pankreas mit einer ebenfalls „stark positiven“ sowohl zytoplasmatischen als auch membranösen GP2 Immunfärbung azinärer Pankreasdrüsen. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



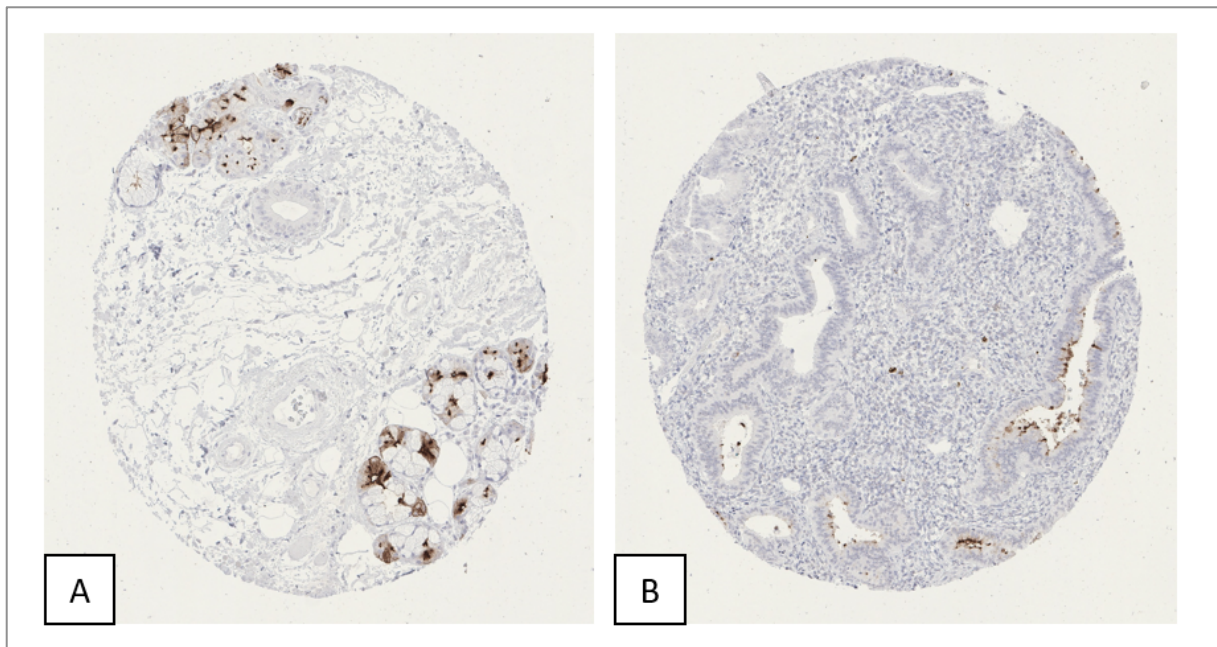
**Abbildung 31: Abbildung von zwei Gewebestanzten aus dem Normalgewebe-Array**

A: Normalgewebe des Duodenums (Brunner-Drüsen) mit einer weitestgehend schwachen apikal betonten zytoplasmatischen GP2 Immunfärbung der Brunner-Drüsen. B: Normalgewebe des Duodenums (Brunner-Drüsen) mit einer schwachen und in in Einzelzellen auch einer moderat apikal betonten membranösen GP2 Immunfärbung der Brunner-Drüsen. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



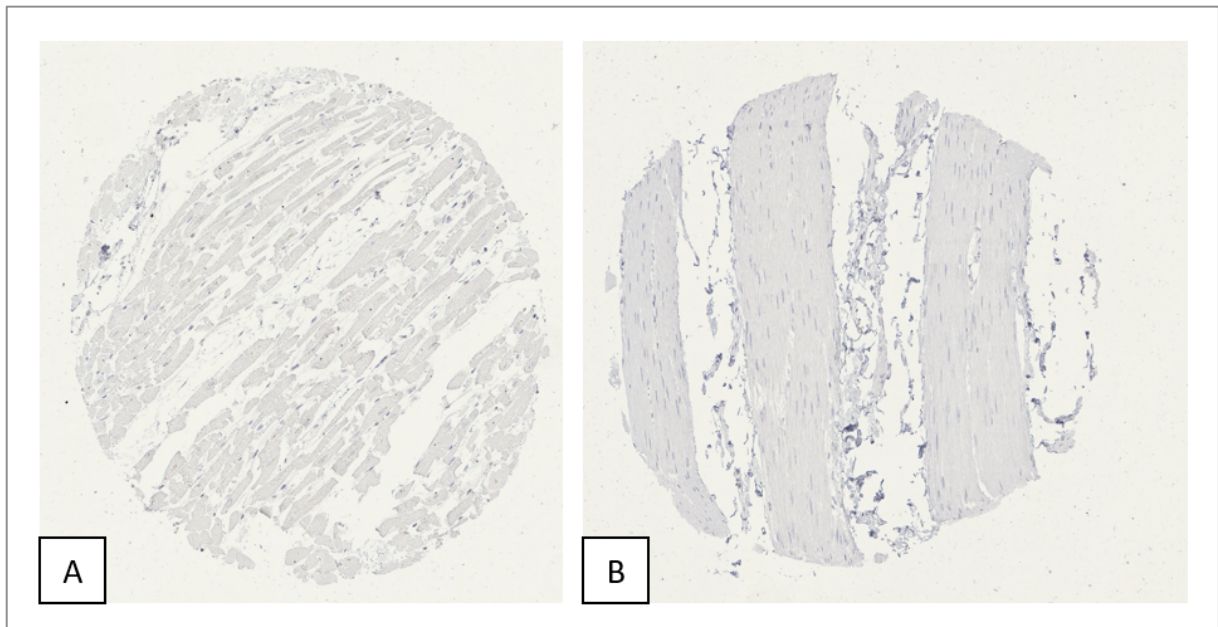
**Abbildung 32: Abbildung von zwei Gewebestanzten aus dem Normalgewebe-Array**

A: Normalgewebe des Magenantrum mit einer fokal apikal betonten schwachen membranösen und teils zytoplasmatischen GP2 Immunfärbung von einzelnen Drüsen. B: Normalgewebe der Gallenblase mit einer apikal betonten schwachen bis moderaten membranösen und zum Teil auch zytoplasmatischen GP2 Immunfärbung einzelner Epithelien. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



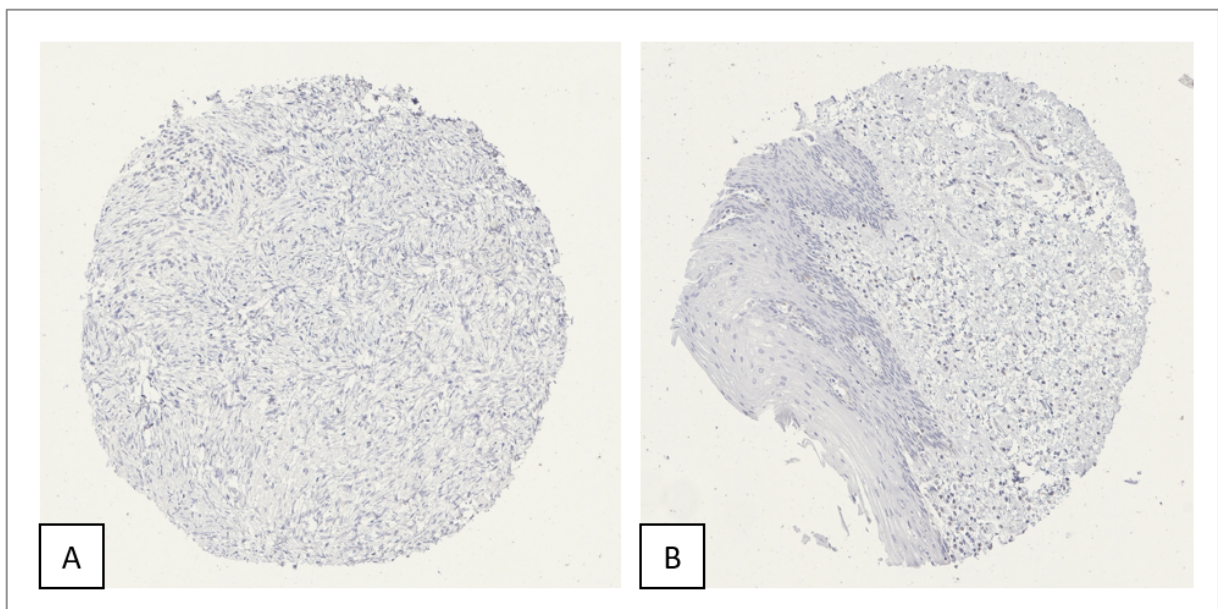
**Abbildung 33: Abbildung von zwei Gewebestanzten aus dem Normalgewebe-Array**

A: Normalgewebe des Bronchus (Drüse) mit fokal apikal betonter moderater bis starker teils zytoplasmatischer und membranöser GP2 Immunfärbung einzelner peribronchialer Drüsen. B: Normalgewebe des Endometriums (Sekretionsphase) mit einer überwiegend apikal betonten schwachen bis moderaten eher membranösen GP2 Immunfärbung einzelner Drüsen. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



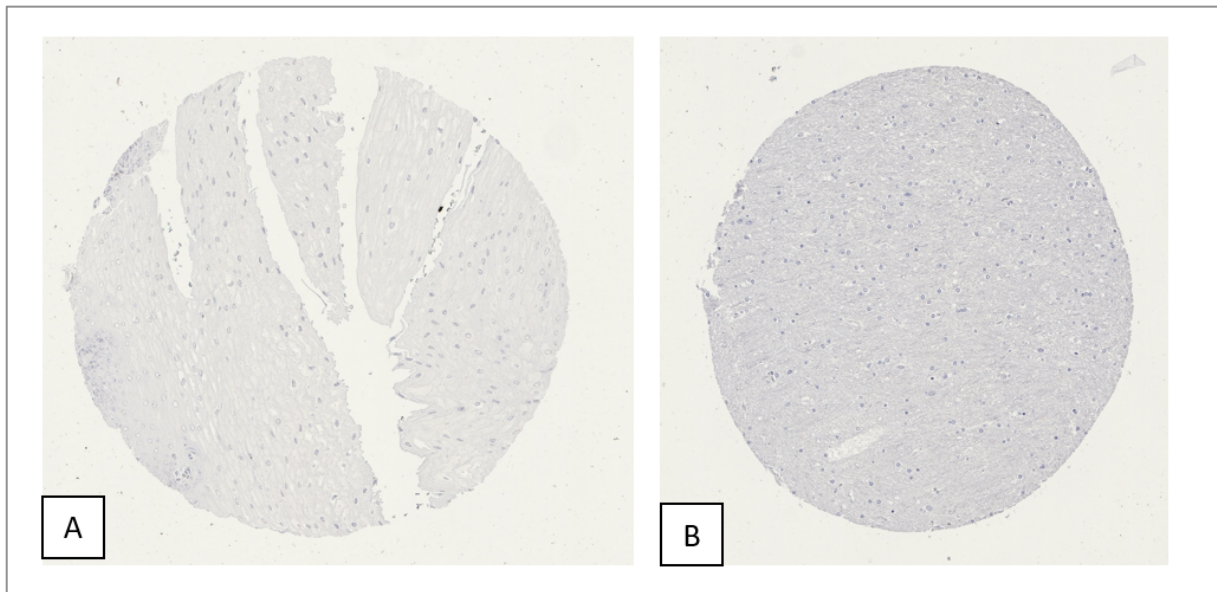
**Abbildung 34: Abbildung von zwei Gewebestanzten aus dem Normalgewebe-Array**

Abgebildet sind zwei Gewebestanzten, wobei es sich bei A: um Herzmuskulatur und B: um glatte Muskulatur im Bereich der Ileumwandung handelt. Beide Gewebe sind ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



**Abbildung 35: Abbildung von zwei Gewebestanzten aus dem Normalgewebe-Array**

Abgebildet sind zwei Gewebestanzten, wobei es sich bei A: um Gewebe des Ovars (Stroma) und B: um Gewebe der Mundhöhle handelt. Beide Gewebe sind ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



**Abbildung 36: Abbildung von zwei Gewebestücken aus dem Normalgewebe-Array**

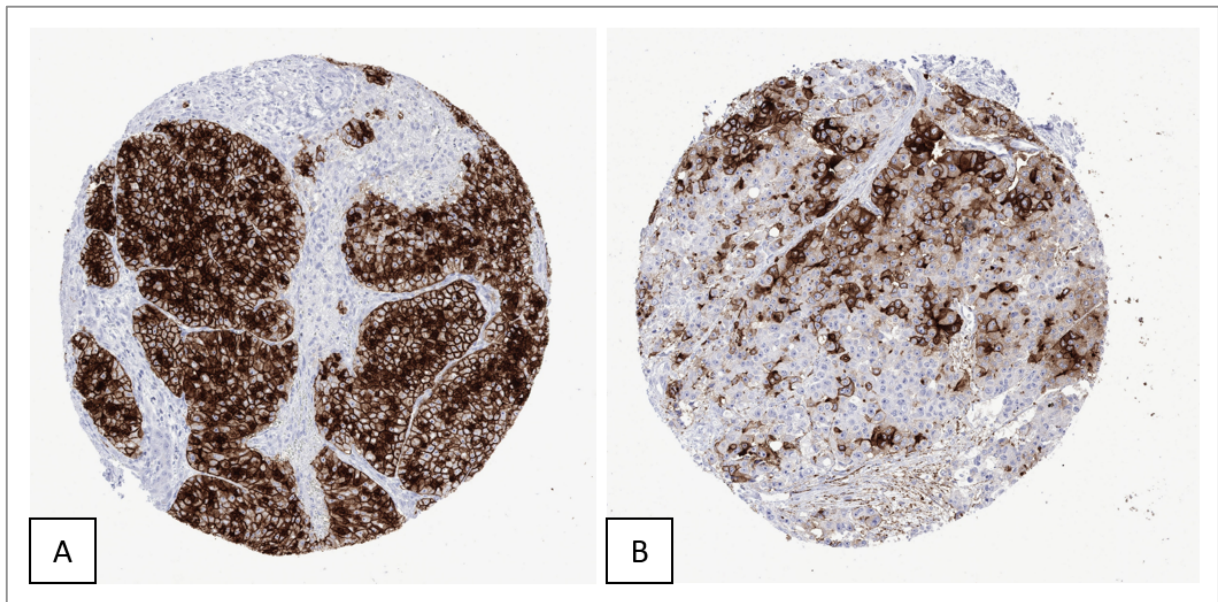
Abgebildet sind zwei Gewebestücken, wobei es sich bei A: um Gewebe des Ösophagus und B: um Gewebe des Cerebrums (graue Substanz) handelt. Beide Gewebe sind ohne nachweisbare GP2-Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.

### 3.2.2 GP2 in Tumorgeweben

Eine GP2-Immunfärbung war in 137 (1,4%) der 13.218 analysierbaren Tumoren nachweisbar, einschließlich 112 (81,75%) mit schwacher-, 11 (8,03%) mit moderater- und 14 (10,22%) mit starker Immunfärbung. Insgesamt zeigten 25 (18,94%) von 132 Tumorkategorien eine nachweisbare GP2-Expression, wobei 6 (4,55%) Tumorkategorien zumindest in einem Fall eine starke Positivität zeigten. Repräsentative Bilder von GP2-positiven Tumoren sind in Abbildung 37 bis 51 dargestellt. Die höchste Rate der positiven Färbung wurde bei Azinuszellkarzinomen der Bauchspeicheldrüse gefunden, gefolgt von mehreren Typen neuroendokriner Neoplasien, Prostata-Adenokarzinomen, verschiedenen anderen Adenokarzinomen und verschiedenen Arten von gutartigen und bösartigen Speicheldrüsen-Tumoren. Eine starke GP2-Positivität wurde lediglich in 6 Tumorkategorien beobachtet, darunter 50% der 16 Azinuszellkarzinome des Pankreas, 11,8% der 17 neuroendokrinen Tumoren der Lunge, 1,3% der 80 Prostatakarzinome (primär Gleason 4+4) und 0,6% von 181 rezidivierenden Prostatakarzinomen sowie 0,8% von 133 Adenokarzinomen der Lunge, 0,4% von 240 Mukoepitheloidkarzinomen der Speicheldrüse.

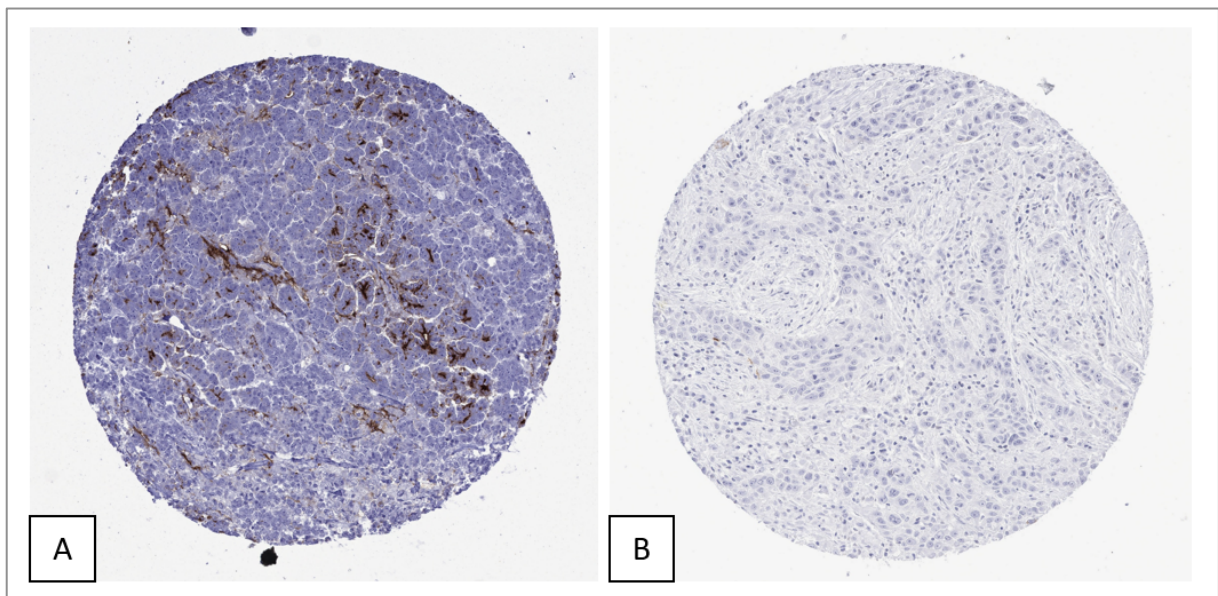
Bei weiteren 13.081 ausgewerteten Tumoren fehlte die GP2-Immunfärbung vollständig. Repräsentative Bilder sind in Abbildung 52 bis 55 dargestellt.





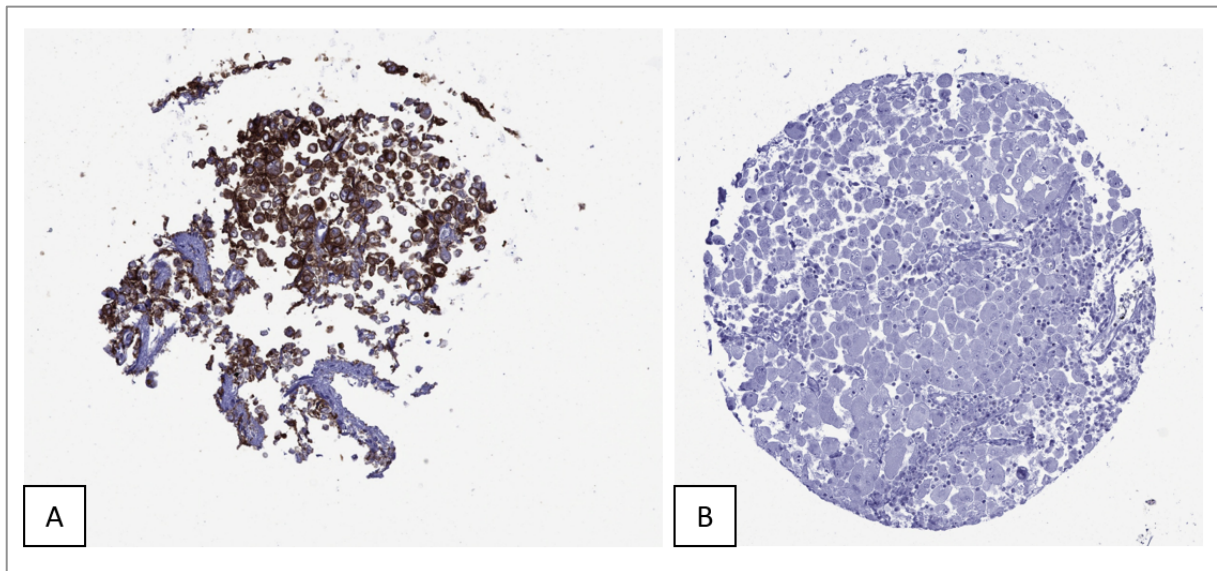
**Abbildung 37: Abgebildet sind zwei Gewebestanzes aus dem TMA**

A: Gewebe eines Azinuszellkarzinoms des Pankreas mit einer „stark positiven“ GP2 Immunfärbung in 100% der Tumorzellen. B: Gewebe eines Azinuszellkarzinoms des Pankreas mit einer „moderat positiven“ GP2 Immunfärbung in ca. 50% der Tumorzellen. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



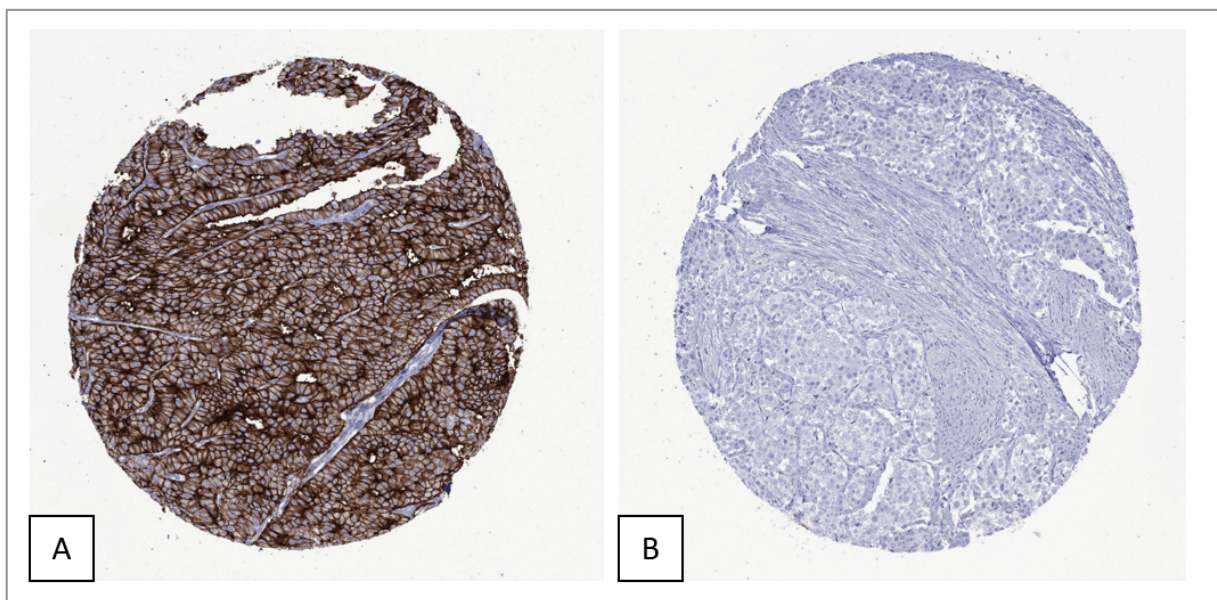
**Abbildung 38: Abgebildet sind zwei Gewebestanzes aus dem TMA**

A: Gewebe eines Azinuszellkarzinoms des Pankreas mit einer „schwachen positiven“ GP2 Immunfärbung in ca. 20% der Tumorzellen. B: Gewebe eines Azinuszellkarzinoms des Pankreas ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



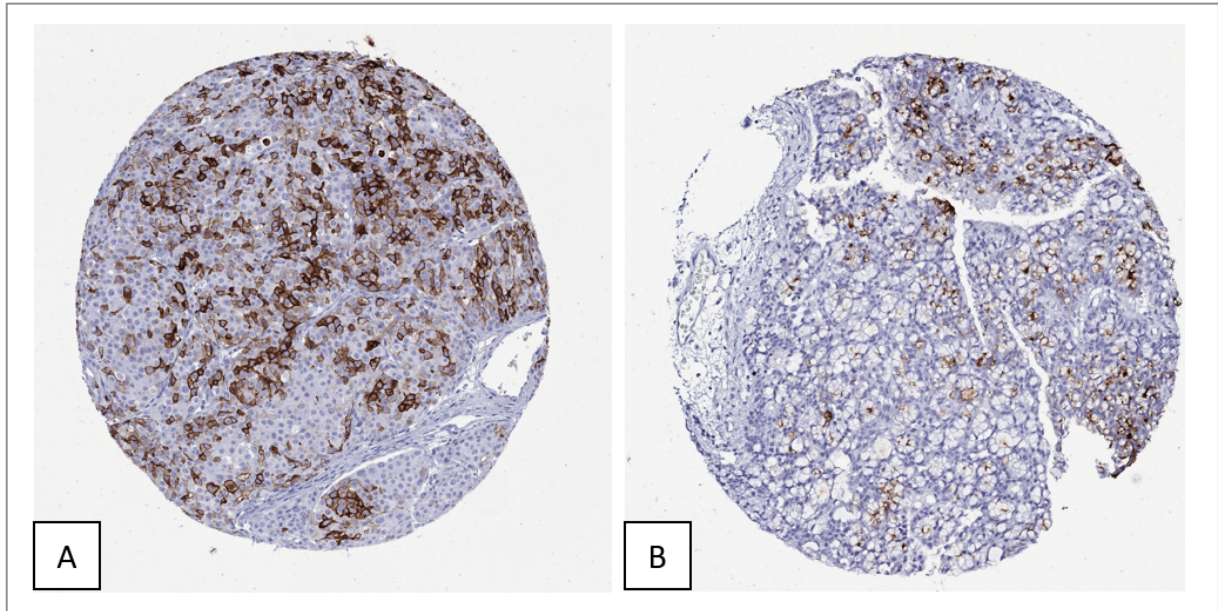
**Abbildung 39: Abgebildet sind zwei Gewebestanzes aus dem TMA**

A: Gewebe eines Adenokarzinom der Lunge mit einer „stark positiven“ GP2 Immunfärbung in 100% der Tumorzellen. B: Gewebe eines Adenokarzinom der Lunge ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



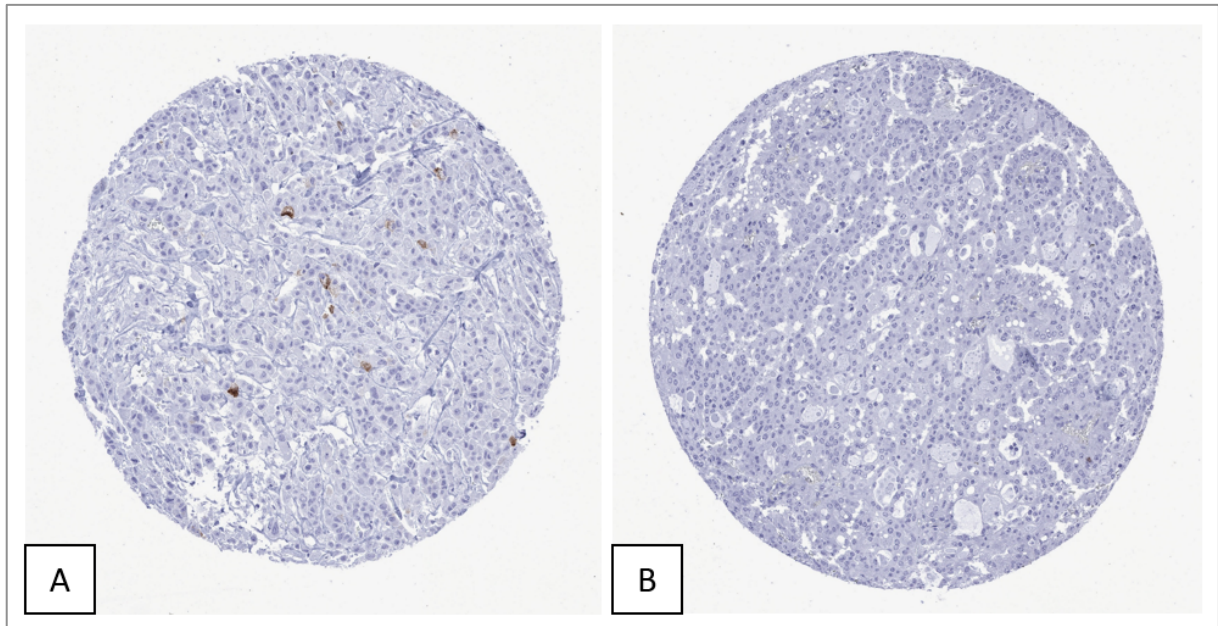
**Abbildung 40: Abgebildet sind zwei Gewebestanzes aus dem TMA**

A: Gewebe eines neuroendokrinen Tumors der Lunge mit einer „stark positiven“ GP2 Immunfärbung in 100% der Tumorzellen. B: Gewebe eines neuroendokrinen Tumors der Lunge ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



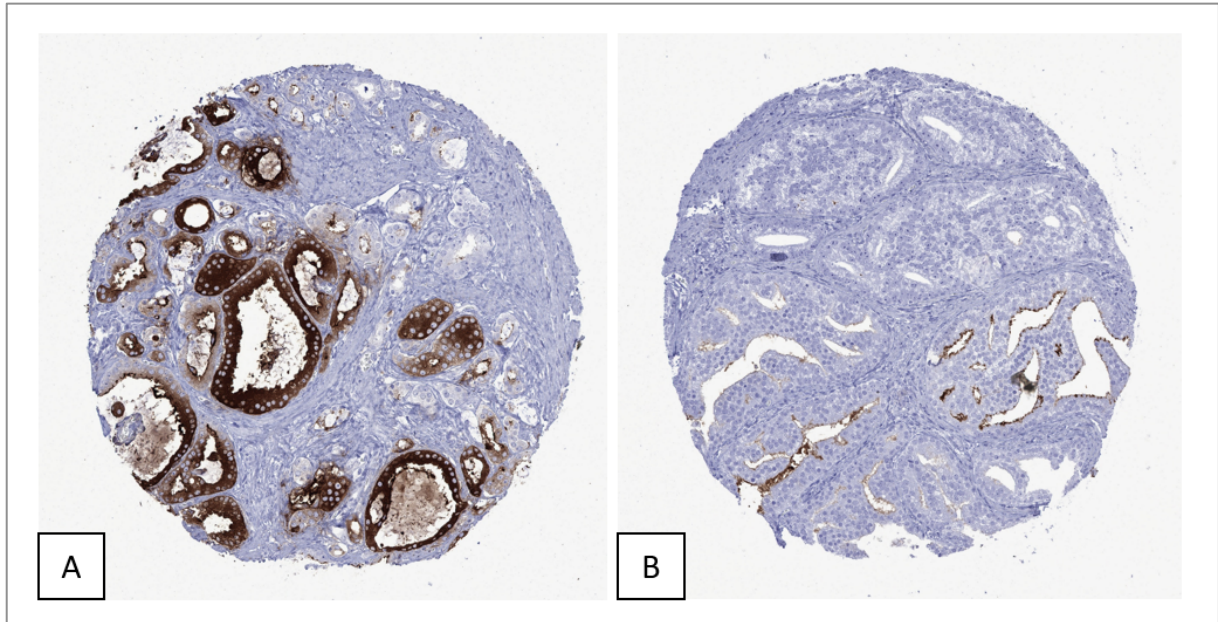
**Abbildung 41: Abgebildet sind zwei Gewebestanzten aus dem TMA**

A: Gewebe eines mukoepidermoiden Karzinoms mit einer „stark positiven“ GP2 Immunfärbung in ca. 50% der Tumorzellen. B: Gewebe eines mukoepidermoiden Karzinoms mit einer „moderat positiven“ GP2 Immunfärbung in ca. 50% der Tumorzellen. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



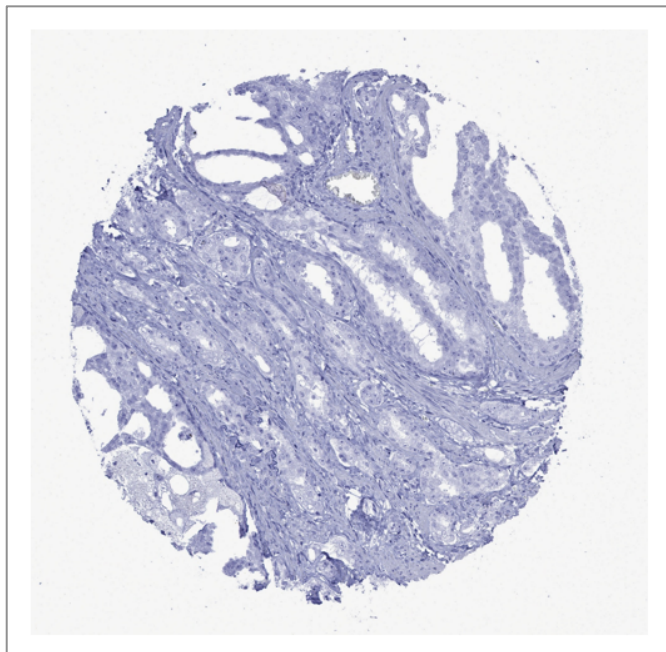
**Abbildung 42: Abgebildet sind zwei Gewebestanzten aus dem TMA**

A: Gewebe eines mukoepidermoiden Karzinoms mit einer „schwach positiven“ GP2 Immunfärbung in ca. 5% der Tumorzellen. B: Gewebe eines mukoepidermoiden Karzinoms ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



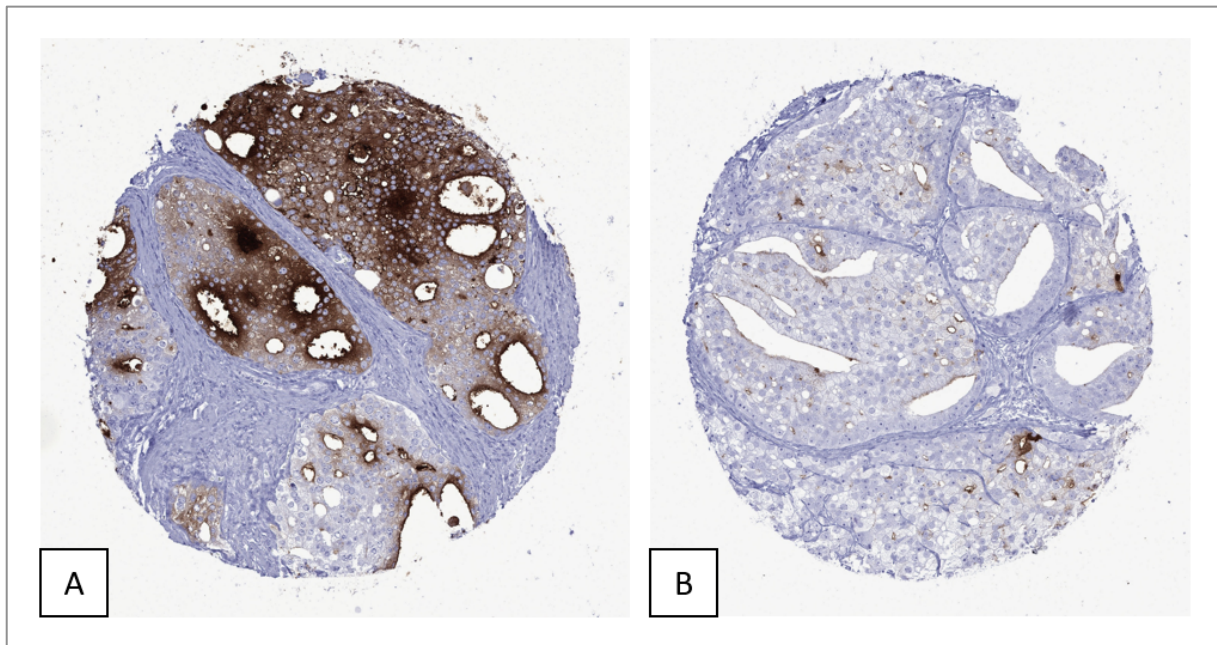
**Abbildung 43: Abgebildet sind zwei Gewebestanzten aus dem TMA**

A: Gewebe eines Adenokarzinoms der Prostata (Gleason 4+4) mit einer „stark positiven“ GP2 Immunfärbung in ca. 70% der Tumorzellen. B: Gewebe eines Adenokarzinoms der Prostata (Gleason 4+4) mit einer „schwach positiven“ GP2 Immunfärbung in ca. 20% der Tumorzellen. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



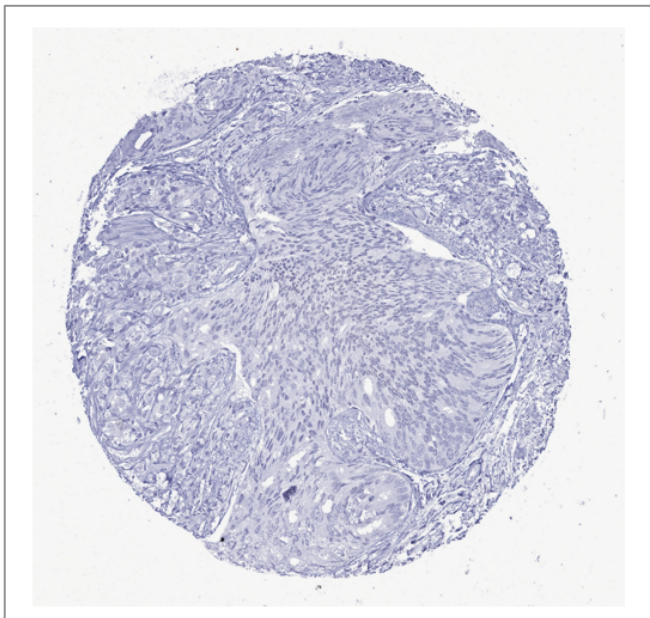
**Abbildung 44: Abgebildet ist eine Gewebestanze aus dem TMA**

Gewebe eines Adenokarzinoms der Prostata (Gleason 4+4) ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



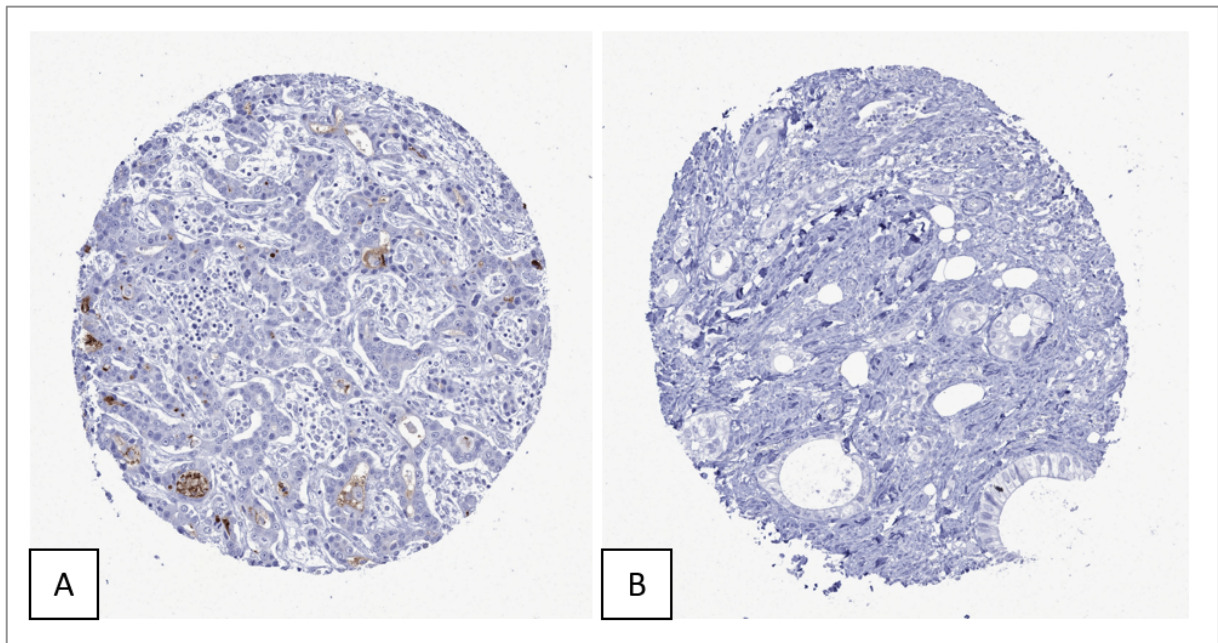
**Abbildung 45: Abgebildet sind zwei Gewebestanzes aus dem TMA**

A: Gewebe eines Adenokarzinoms der Prostata (Rezidiv) mit einer „stark positiven“ GP2 Immunfärbung in ca. 80% der Tumorzellen. B: Gewebe eines Adenokarzinoms der Prostata (Rezidiv) mit einer „schwachen positiven“ GP2 Immunfärbung in ca. 5% der Tumorzellen. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



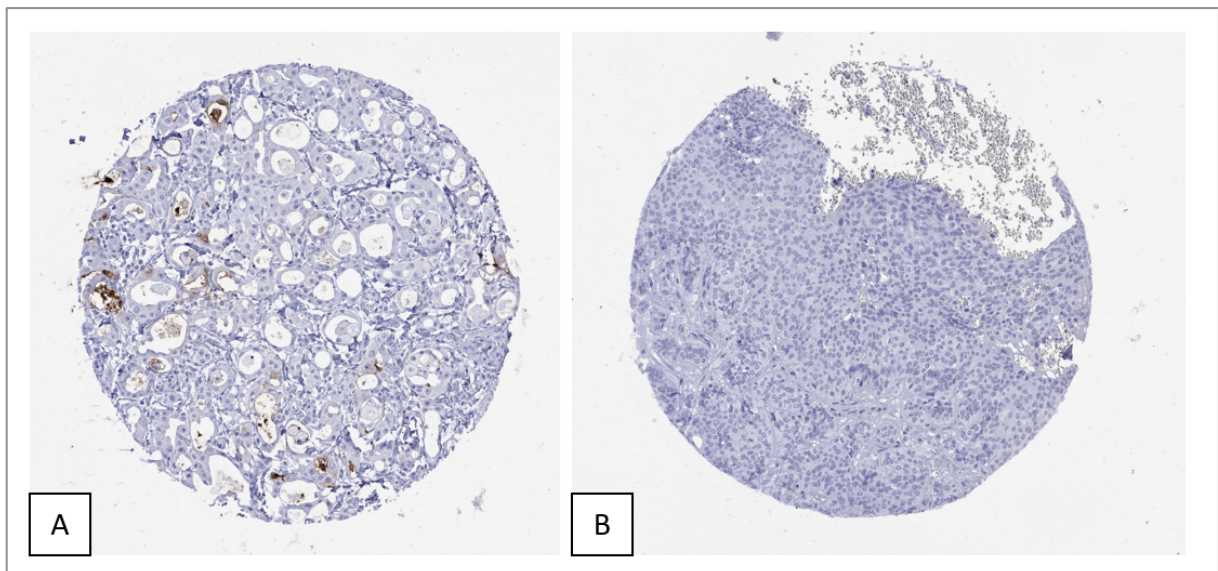
**Abbildung 46: Abgebildet ist eine Gewebestanze aus dem TMA**

Gewebe eines Adenokarzinoms der Prostata (Rezidiv) ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



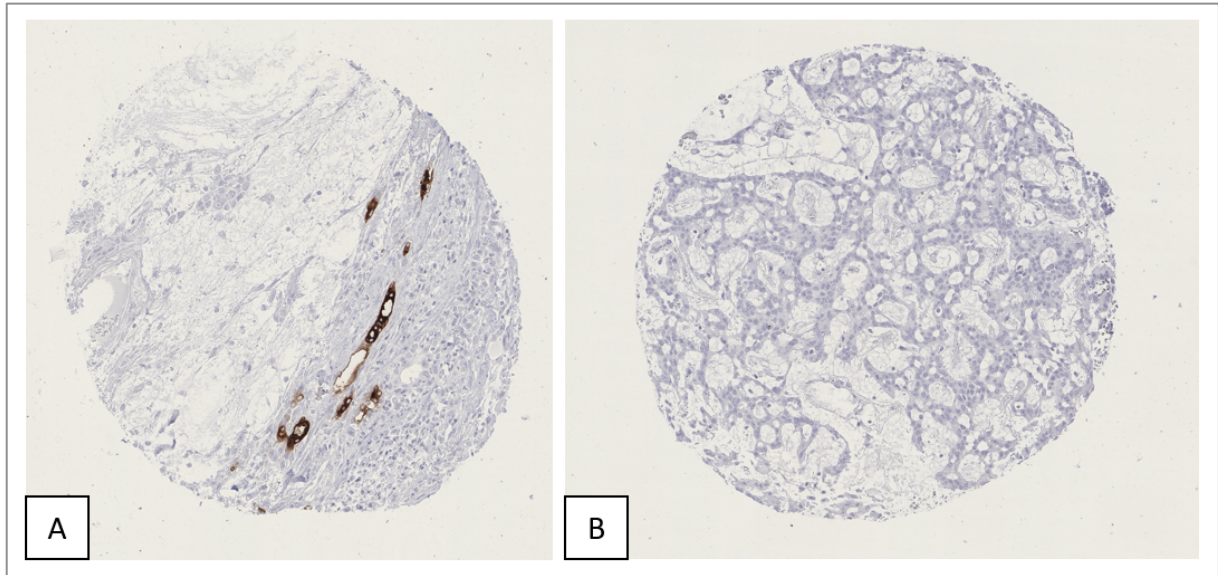
**Abbildung 47: Abgebildet sind zwei Gewebestanden aus dem TMA**

A: Gewebe eines Magenkarzinoms „intestinaler Typ“ mit einer „schwachen positiven“ GP2 Immunfärbung in ca. 5% der Tumorzellen. B: Gewebe eines Magenkarzinoms „intestinaler Typ“ ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



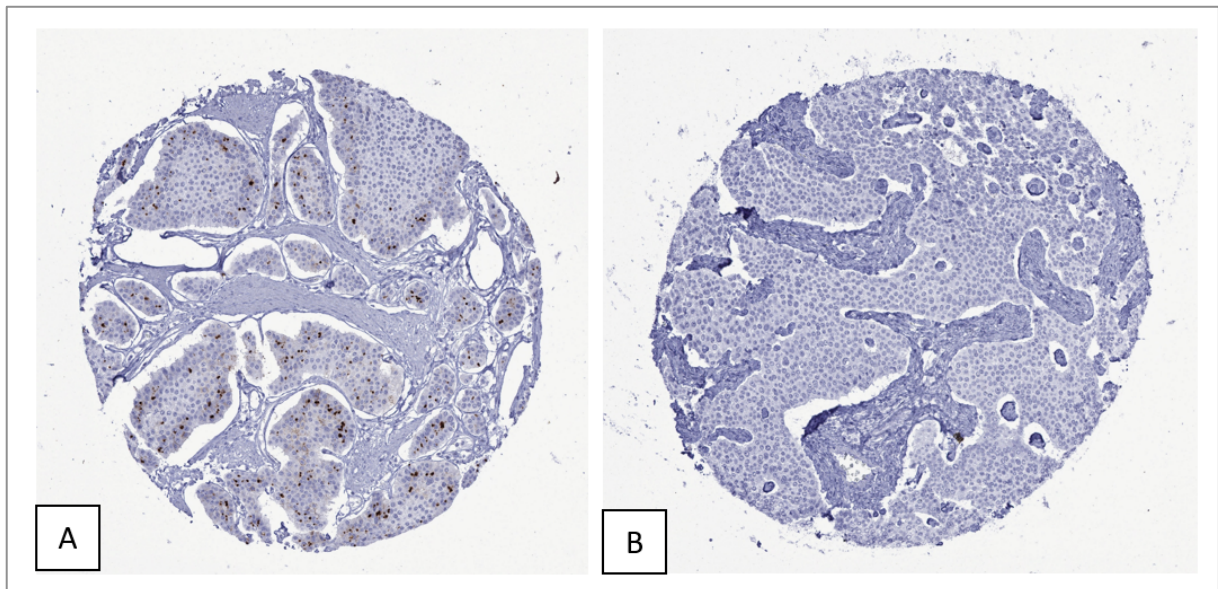
**Abbildung 48: Abgebildet sind zwei Gewebestanden aus dem TMA**

A: Gewebe eines Adenokarzinoms (NOS) der Speicheldrüse mit einer „schwachen positiven“ GP2 Immunfärbung in ca. 10% der Tumorzellen. B: Gewebe eines eines Adenokarzinoms (NOS) der Speicheldrüse ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



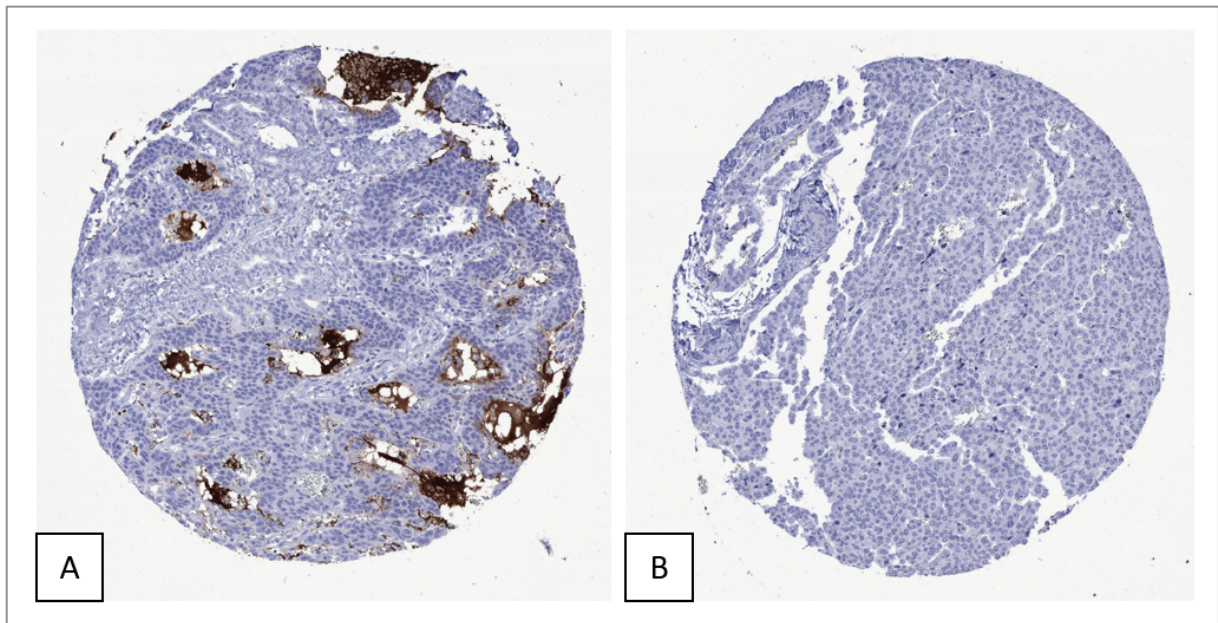
**Abbildung 49: Abgebildet sind zwei Gewebestänzen aus dem TMA**

A: Gewebe eines pleomorphen Adenoms der Parotis mit einer „moderat positiven“ GP2 Immunfärbung in ca. 20% der Tumorzellen. B: Gewebe eines pleomorphen Adenoms der Parotis ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



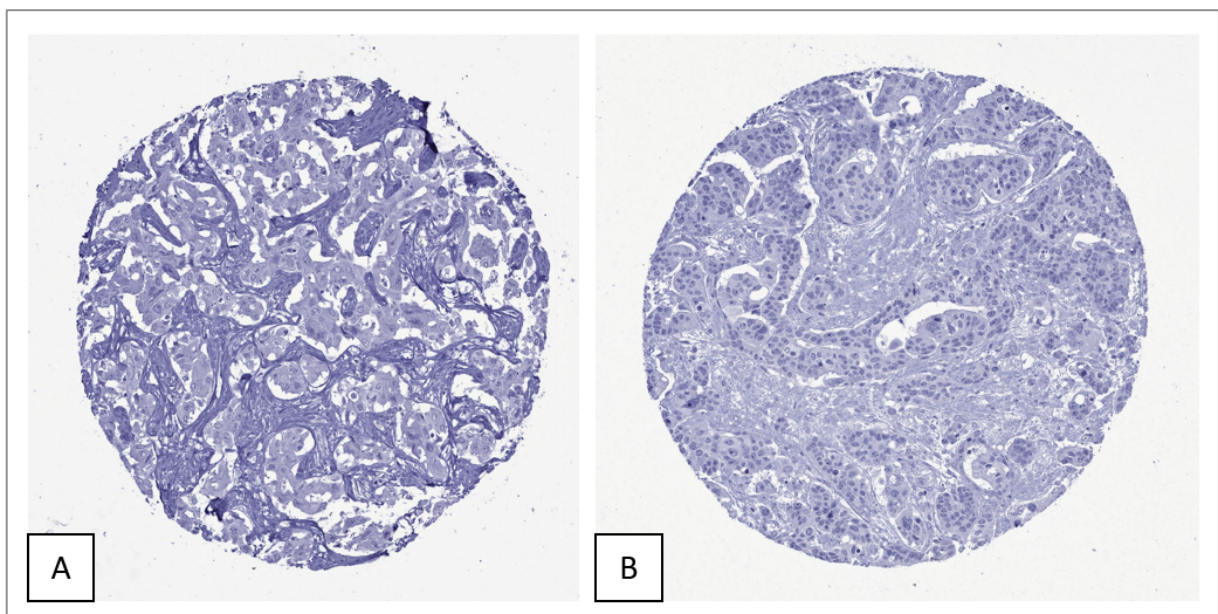
**Abbildung 50: Abgebildet sind zwei Gewebestänzen aus dem TMA**

A: Gewebe eines neuroendokrinen Tumors des Ileums mit einer „schwach positiven“ GP2 Immunfärbung in ca. 10% der Tumorzellen. B: Gewebe eines neuroendokrinen Tumors des Ileums ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



**Abbildung 51: Abgebildet sind zwei Gewebestanzten aus dem TMA**

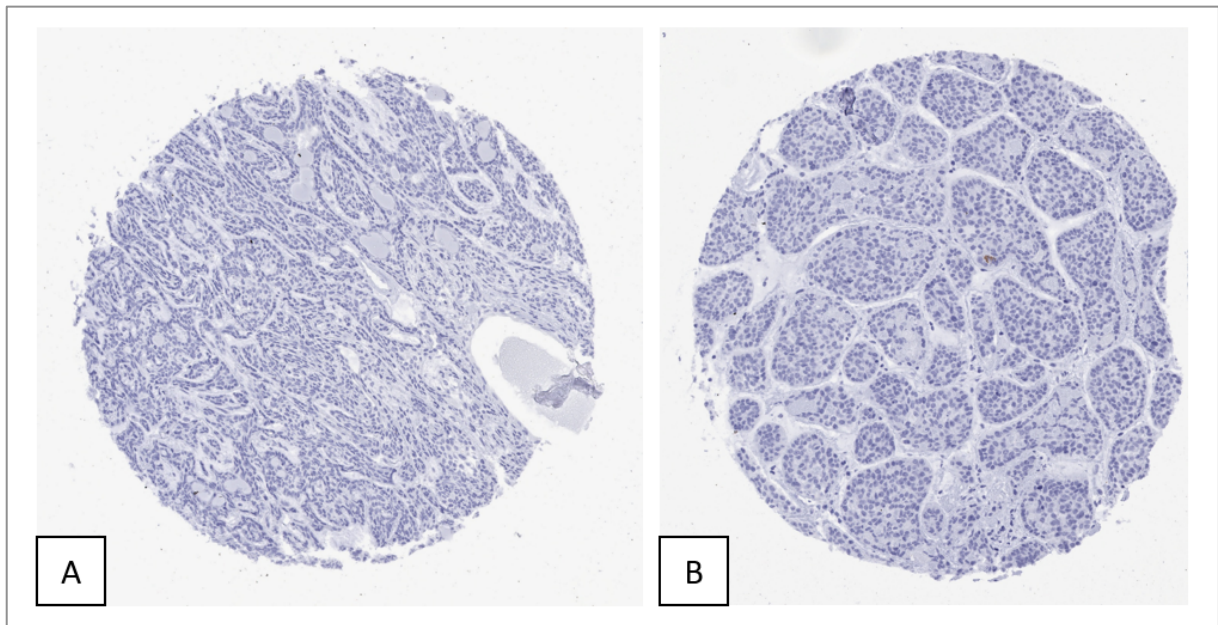
A: Gewebe eines neuroendokrinen Tumors des Pankreas mit einer „schwach positiven“ GP2 Immunfärbung in ca. 5% der Tumorzellen. B: Gewebe eines neuroendokrinen Tumors des Pankreas ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



**Abbildung 52: Abgebildet sind zwei Gewebestanzten aus dem TMA**

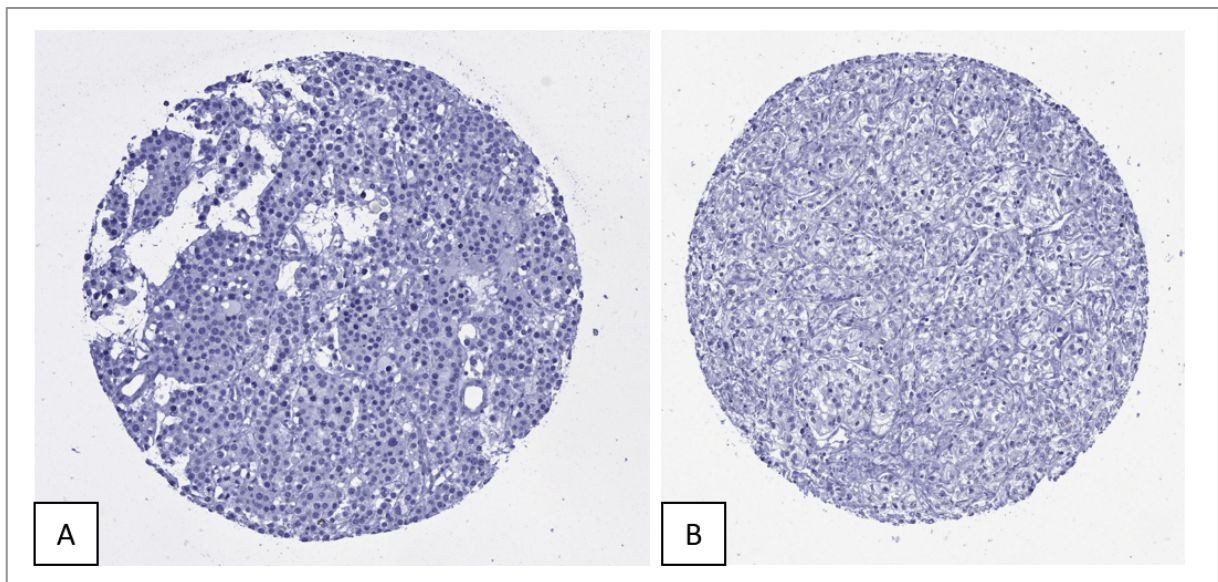
A: Gewebe eines Cholangiokarzinoms ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. B: Gewebe eines serösen Ovarialkarzinoms ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.





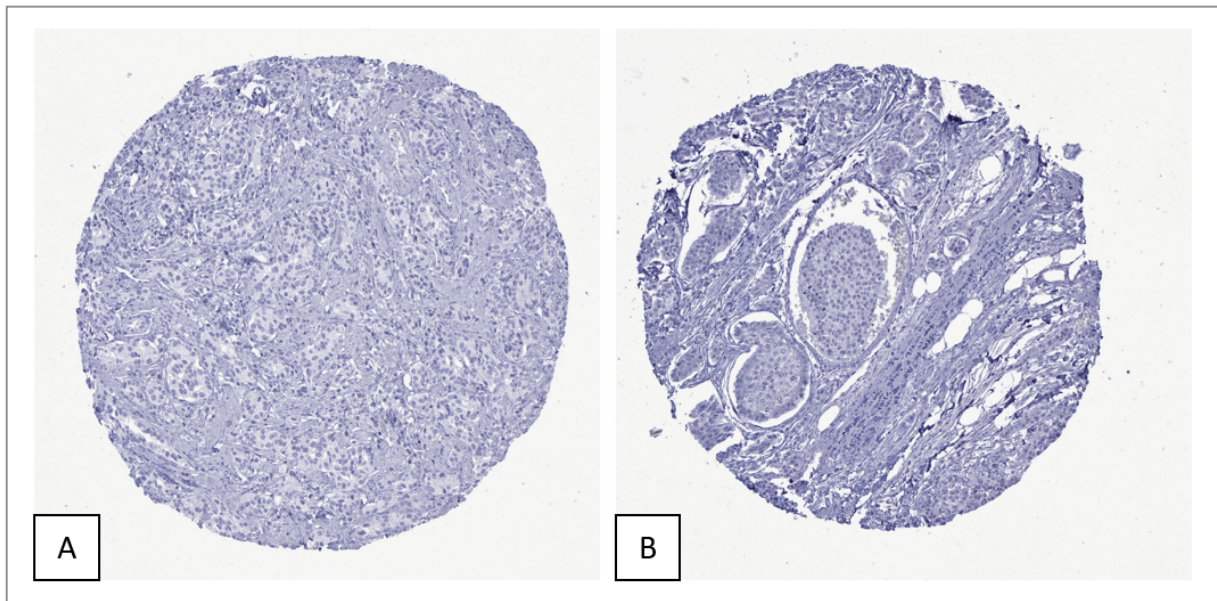
**Abbildung 53: Abgebildet sind zwei Gewebestanzten aus dem TMA**

A: Gewebe eines Basalzellkarzinoms der Speicheldrüse ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. B: Gewebe eines adenozytischen Karzinoms der Speicheldrüse ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



**Abbildung 54: Abgebildet sind zwei Gewebestanzten aus dem TMA**

A: Gewebe eines Seminoms ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. B: Gewebe eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms der Speicheldrüse ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



**Abbildung 55: Abgebildet sind zwei Gewebestanzungen aus dem TMA**

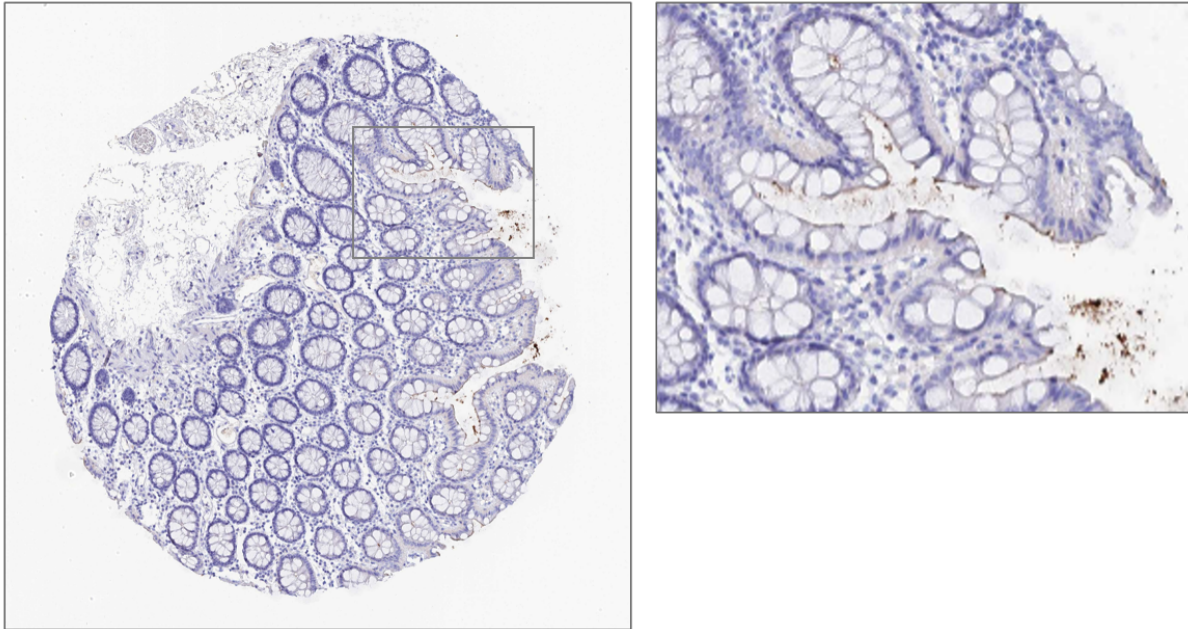
A: Gewebe eines neuroendokrinen Tumors des Magens ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. B: Gewebe eines neuroendokrinen Tumors des Kolons ohne nachweisbare GP2 Immunfärbung. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.

## 4. Diskussion

Aufgrund der ungewöhnlichen Dimension der hier vorliegenden Studie, bei der 13.223 Karzinome von 132 verschiedenen Tumortypen und -subtypen untersucht wurden, wurde ein besonderes Augenmerk auf die Validierung der verwendeten Antikörper und Färbeprotokolle gelegt. Da die Zielproteine von immunhistochemischen Färbungen im Rahmen des Fixierungsprozesses verändert werden sind traditionelle Antikörper-Validierungsverfahren wie Western-Blot, ELISA oder Protein-Arrays nicht aussagekräftig genug um sicherzustellen, dass das verwendete Färbesystem an Formalin-fixierten Geweben funktionieren wird. Die internationale Arbeitsgruppe für Antikörper Validierung (International working group for antibody validation, IWGAV) hält in ihren Empfehlungen deswegen daran fest, dass die Validierung von Antikörper-Methoden spezifisch erfolgen muss (Uhlen et al. 2016). Für die Immunhistochemie an Formalin-fixierten Geweben wurde vorgeschlagen, dass die Validierung entweder einen Vergleich der immunhistochemischen Färbeargebnisse mit Expressionsdaten beinhalten sollte, welche mit einer anderen Methode erhoben worden sind, oder aber den Vergleich mit einem anderen, unabhängigen Antikörper (Saper 2005; Bordeaux et al. 2010). Da es bei der Validierung der Einsatzfähigkeit eines Antikörpers nicht nur darum geht sicherzustellen, dass ein Antikörper sein Zielprotein am Formalin-fixierten Gewebe auch erkennt, sondern auch darum sicherzustellen, dass er keine Kreuzreaktivitäten

mit anderen Geweben ausweist, ist es wichtig, die Antikörper-Validierung an einer möglichst breiten Palette von Geweben durchzuführen. Je mehr verschiedene Gewebe für die Antikörper-Validierung zum Einsatz kommen, umso größer ist die Zahl der verschiedenen Proteine, welche dem getesteten Antikörper für eine Bindung angeboten werden (Uhlen et al. 2016; Edfors et al. 2018). Das in dieser Studie verwendete Kollektiv von 76 verschiedenen Normalgewebekategorien erlaubte eine ungewöhnlich umfassende Suche nach Kreuzreaktivitäten. Die Breite dieses Normalgewebekollektivs dürfte sicherstellen, dass praktisch alle in adulten Geweben vorkommenden Proteine in unserem Kontrollexperiment vertreten waren. Da unsere Kontrollgewebe aber alle von adulten Personen stammen ist es nicht auszuschließen, dass Proteine, welche nur in der embryonalen- oder fetalen Entwicklungsphase zur Expression kommen, nicht erkannte Ziele von Kreuzreaktivitäten unserer beiden Antikörper sein könnten. Als Verleichsverfahren für die Messung der CELA3B und GP2 Expression verwendeten wir die RNA Quantifizierung der entsprechenden Gene. Umfassende Daten zur RNA Expression dieser und anderer Gene liegen in verschiedenen öffentlich zugänglichen Datenbanken vor. Konkret wurden für das Projekt RNA Expressiondaten des human Proteinatlas (HPA) RNA-seq Datensatz (The Human Protein Atlas o.D.), des Fantom5 Projektes (Lizio et al. 2019; Lizio et al. 2015) und des Genotype-Tissue Expression (GTEx) Projektes (Consortium GT 2013) verwendet. Diese 3 Datenbanken sind auch im human Proteinatlas zusammengefasst dargestellt (The Human Protein Atlas o.D.).

Für CELA3B wurde die Spezifität unseres Antikörpers durch eine fast perfekte Übereinstimmung unserer Färbeergebnisse mit den RNA-Daten unterstützt. Das Pankreas war das einzige Organ, für welches in den 3 RNA-Datenbanken eine RNA Expression festgestellt worden war. Auch immunhistochemisch war die CELA3B Expression fast ausschließlich im Pankreas nachweisbar. Einzige Ausnahmen waren feine membranöse Färbungen, welche mit unserem Antikörper MSVA-410M in einigen Oberflächenmembranen von Dünn- und Dickdarm gefunden werden konnten. Dass es sich hier um eine echte CELA3B Färbung handelt wird dadurch unterstützt, dass der Antikörper HPA045650, welcher für die CELA3B Untersuchung im Rahmen des human Proteinatlas Projektes verwendet worden war auf einzelnen publizierten Bildern ebenfalls eine schwache Membranfärbung im Darmtrakt zeigte (Abbildung 56).



**Abbildung 56: Abgebildet ist eine Gewebestanze des Kolons, Normalgewebe (The Human Protein Atlas o.D.)**

Immunfärbung im Normalgewebe mittel des Antikörpers HPA045650. Fokal apikale „membranöse“ Färbung des Kolons.

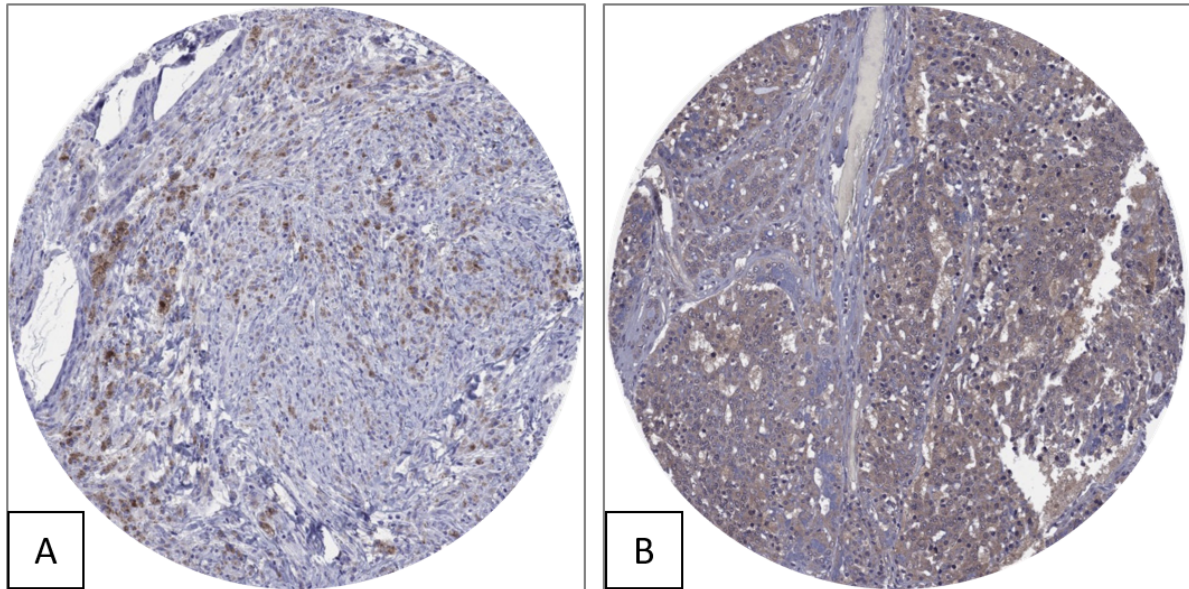
Angesichts der geringen Menge von CELA3B angefärbten Zellen in Dünndarm und Dickdarm wäre es ohne weiteres denkbar, dass bei einer RNA Untersuchung von „Dickdarm“ oder „Dünndarm“ eine RNA Expression dieser intestinalen Oberflächenepithelien nicht nachgewiesen würde, da diese Zellen einen zu geringen Anteil der gesamten untersuchten Zellmasse ausmachen. Da CELA3B von dem Pankreas in großer Menge in den Darm sezerniert wird, ergibt sich allerdings eine alternative Erklärung für die CELA3B Positivität von intestinalen Oberflächenmembranen. Da CELA3B im Darmtrakt nicht proteolytisch abgebaut wird (Fritz et al. 2002) und in hoher Konzentration im Stuhl nachweisbar ist (Sziegoleit et al. 1989), wäre es denkbar, dass das immunhistochemisch detektierte CELA3B des Darmepithels aufgelagertem pankreatischen CELA3B entspricht, welches somit nicht von den angefärbten Zellen selber sezerniert worden wäre. Zu dieser Hypothese passt auch, dass die bekannten Merkmale von CELA3B nicht zu einem klassischen Membranprotein passen. Aufgrund seiner hohen Stabilität im Darmtrakt wird CELA3B klinisch für den Nachweis einer exokrinen Pankreasinsuffizienz verwendet (Domínguez-Muñoz et al. 2017; Hahn et al. 2005; Löser et al. 1996; Miendje et al. 2004; Engjom et al. 2020). Eine exokrine Pankreasinsuffizienz geht mit einer verminderten CELA3B Produktion einher und somit mit verminderten CELA3B Stuhlwerten (Engjom et al. 2020). Der ScheBo Pankreas Elastase1 Stuhltest (ScheBo Biotech, Gießen, Deutschland) ist ein klinisch häufig verwendeter Assay zur Quantifizierung von CELA3B im Stuhl mittels eines ELISA-Verfahrens (Tóth et al. 2017).

Die erfolgreiche Analyse von 13.223 Tumoren von 132 verschiedenen Tumortypen und -subtypen ergab eine enge Beziehung zwischen der Expression von CELA3B und dem Vorliegen eines Azinuszellkarzinoms des Pankreas. 12 von 16 Azinuszellkarzinomen (75%) waren CELA3B positiv, während eine CELA3B Expression in keinem von 448 duktalem Adenokarzinomen des Pankreas, 69 Adenokarzinomen der Ampulla Vateri und 95 neuroendokrinen Tumoren bzw. Karzinomen des Pankreas auftraten. Das Azinuszellkarzinom ist ein seltener Subtyp des Pankreaskarzinoms, welcher von den Azinuszellen ausgeht und ungefähr an die 2% aller pankreatischen Neoplasien ausmacht (Holen et al. 2002; Klimstra und Adsay 2016). Angesichts der eindeutigen CELA3B Färbung in epithelialen Zellen von nicht neoplastischen Pankreasausführungsgängen und der früheren Beobachtung anderer Forscher, dass in pankreatischen intraepithelialen Neoplasien und in Pankreaskarzinomen von Ratten eine CELA3B Hochregulierung beobachtet werden konnte (Wang et al. 2011), waren diese Befunde nicht zu erwarten gewesen. Das völlige Fehlen einer CELA3B Expression in neoplastischen Zellen von 448 duktalem Pankreaskarzinomen stellt allerdings ein starkes Argument gegen eine relevante CELA3B Produktion in diesen Zellen dar. Da letztlich große Mengen von CELA3B Proteinen durch die exkretorischen Pankreasgänge transportiert werden, kann postuliert werden, dass es sich bei den in diesen Zellen nachweisbaren CELA3B Proteinen um resorbiertes, aus Azinuszellen stammendes CELA3B handeln könnte.

In einer früheren Studie am gleichen TMA Kollektiv hatte die Arbeitsgruppe im Institut für Pathologie des UKE kürzlich herausgefunden, dass die Carboxypeptidase A1 (CPA1) ein Protein darstellt, dessen immunhistochemischer Nachweis mit hoher Sensitivität (100%) und beinahe vollständiger Spezifität (99,5% ohne Revision einzelner Diagnosen, 100% nach Revision einzelner Diagnosen) für das Azinuszellkarzinom des Pankreas darstellt (Uhlir R. et al. 2021). Hierbei ist zu beachten, dass CELA3B eng mit CPA1 interagiert. ProCELA3B bildet Komplexe mit ProCPA1, wodurch eine gesteigerte Stabilität beider Proteine erreicht wird (Párniczky et al. 2016). Obwohl die Sensitivität von CELA3B (75%) geringer war als für CPA1 (100%), kann basierend auf unseren Daten dennoch eine gemeinsame Verwendung von CPA1 und CELA3B für die Azinuszellkarzinom Diagnostik empfohlen werden. Zum einen waren sämtliche Tumoren unseres Kollektivs, bei denen sowohl eine CPA1 als auch eine CELA3B Expression nachweisbar waren, pankreatische Azinuszellkarzinome. Zum anderen ist die gleichzeitige Verwendung mehrerer Antikörper für die Sicherung wichtiger Diagnosen grundsätzlich anzuraten, da nie ausgeschlossen werden kann, dass eine Färbung aus technischen Gründen nicht zum gewünschten Ergebnis führt. Gerade für die Diagnose des Azinuszellkarzinoms des Pankreas bzw. seine schwierige Abgrenzung von neuroendokrinen Neoplasien des Pankreas und duktalem Adenokarzinomen des Pankreas

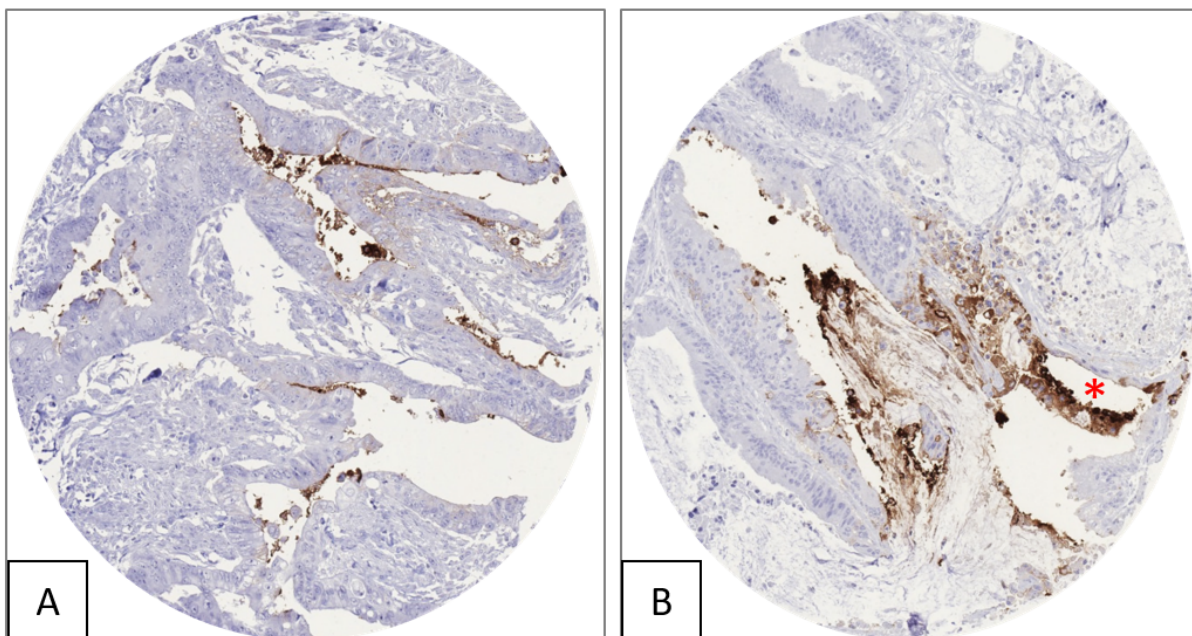
sind immunhistochemische Untersuchungen unerlässlich. Wegen der zahlreichen verschiedenen morphologischen Muster, welche Azinuszellkarzinome annehmen können, und der ausgesprochenen Seltenheit ihres Vorkommens (Holen et al. 2002; Klimstra und Adsay 2016; Klimstra 2007; La Rosa et al. 2012), macht die Diagnose eines Azinuszellkarzinoms regelmäßig Schwierigkeiten. Selbst Experten in gastrointestinaler Pathologie sehen Azinuszellkarzinome des Pankreas nur selten. In einer retrospektiven Studie an der John-Hopkins-Universität, Baltimore, Maryland, wurden in einer Zeitperiode von 18 Jahren nur 14 Azinuszellkarzinome des Pankreas diagnostiziert (Seth et al. 2008). Zahlreiche Studien hatten darauf hingewiesen, dass wegen der Seltenheit des Tumors und seiner variablen morphologischen Befunde regelmäßig Fehldiagnosen in Zusammenhang mit Azinuszellkarzinomen des Pankreas auftreten (Basturk et al. 2014; La Rosa et al. 2012; Sigel und Klimstra 2013). Beispielsweise hatten Basturk et al. in einer Nachuntersuchung 17 von 107 initial als wenig differenzierte neuroendokrine Karzinome klassifizierte Pankreastumoren in entweder reine Azinuszellkarzinome (n=5) oder gemischt azinär neuroendokrine Karzinome (n=12) reklassifiziert (Basturk et al. 2014).

Die ausgesprochene Spezifität der CELA3B Immunfärbung für pankreatische Azinuszellkarzinome passt auch zu den RNA Expressionsdaten der TCGA/ICGC Datenbank (National Cancer Institute o.D.). Die systematische Untersuchung von 17 verschiedenen Tumortypen unter Berücksichtigung von 7.932 einzelnen Tumorproben ergab eine signifikante CELA3B Expression lediglich in Pankreastumoren, wobei 144 von 176 untersuchten Tumoren eine signifikante CELA3B Expression aufwiesen. Basierend auf unseren Daten kann davon ausgegangen werden, dass diese CELA3B positiven Tumoren aus Azinuszellkarzinomen des Pankreas und aus anderen Tumorarten des Pankreas zusammengesetzt sind, wobei die Proben dieser „anderen Pankreas-Tumorarten“ sehr wahrscheinlich auch normales Pankreasgewebe beinhaltet haben dürfte. Nur 11 nicht Azinuszellkarzinome des Pankreas hatten in unserer Studie eine CELA3B Positivität gezeigt, wobei diese Positivität in allen Fällen nur gering bis mäßiggradig und häufig auch nicht ganz eindeutig war. Bilder der als positiv klassifizierten nicht Azinuszellkarzinome sind in Abbildung 57 bis 58 dargestellt.



**Abbildung 57: Abgebildet sind zwei Gewebestanzes aus dem TMA**

Nicht ganz eindeutige CELA3B Immunfärbung in Tumoren. A: Fokal schwache bis moderate zytoplasmatische fein granuläre Immunfärbung eines mukoepidermoiden Karzinoms der Speicheldrüse. B: Homogen schwache bis moderate „Braunfärbung“ eines Azinuszellkarzinoms der Speicheldrüse. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.



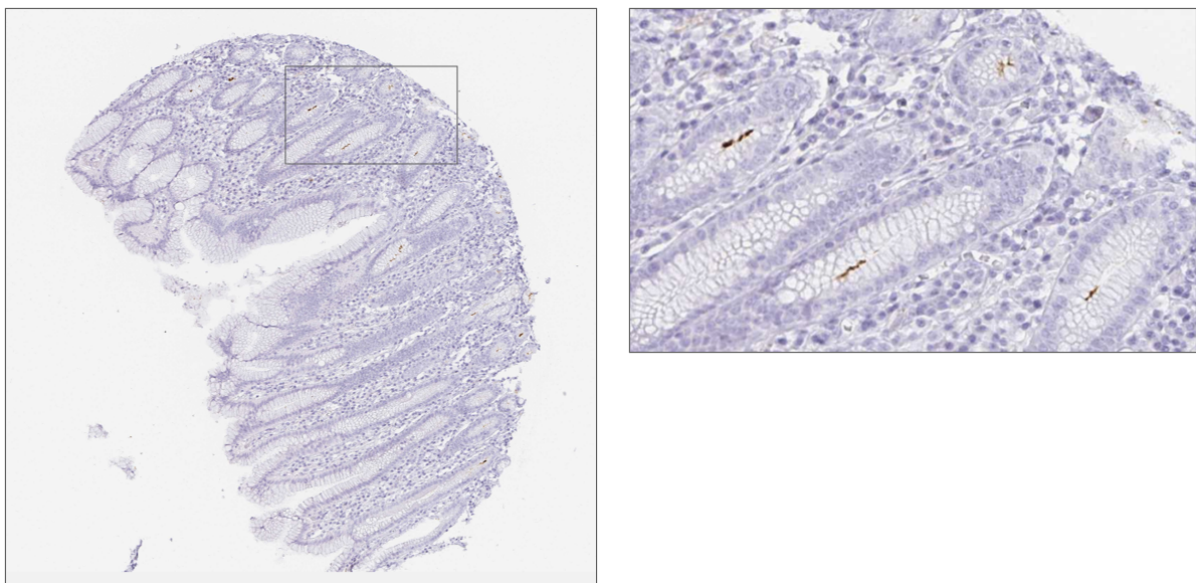
**Abbildung 58: Abgebildet sind zwei Gewebestanzes aus dem TMA**

Nicht ganz eindeutige CELA3B Immunfärbung in Tumoren. A: Fokal apikale „membranöse“ oder „muzinöse“ Immunfärbung eines kolorektalen Karzinoms. B: Fokal apikale „membranöse“ oder „muzinöse“ Immunfärbung und fokal zytoplasmatische Immunfärbung von Tumorzellen (\*) eines kolorektalen Karzinoms. Diese Abbildung wurde aus eigenen Daten entnommen.

Es ist durchaus denkbar, dass bei zumindest einigen dieser Tumoren die Färbung durch eine unspezifische Färbereaktion oder einen anderen Artefakt bedingt gewesen ist. Gerade bei

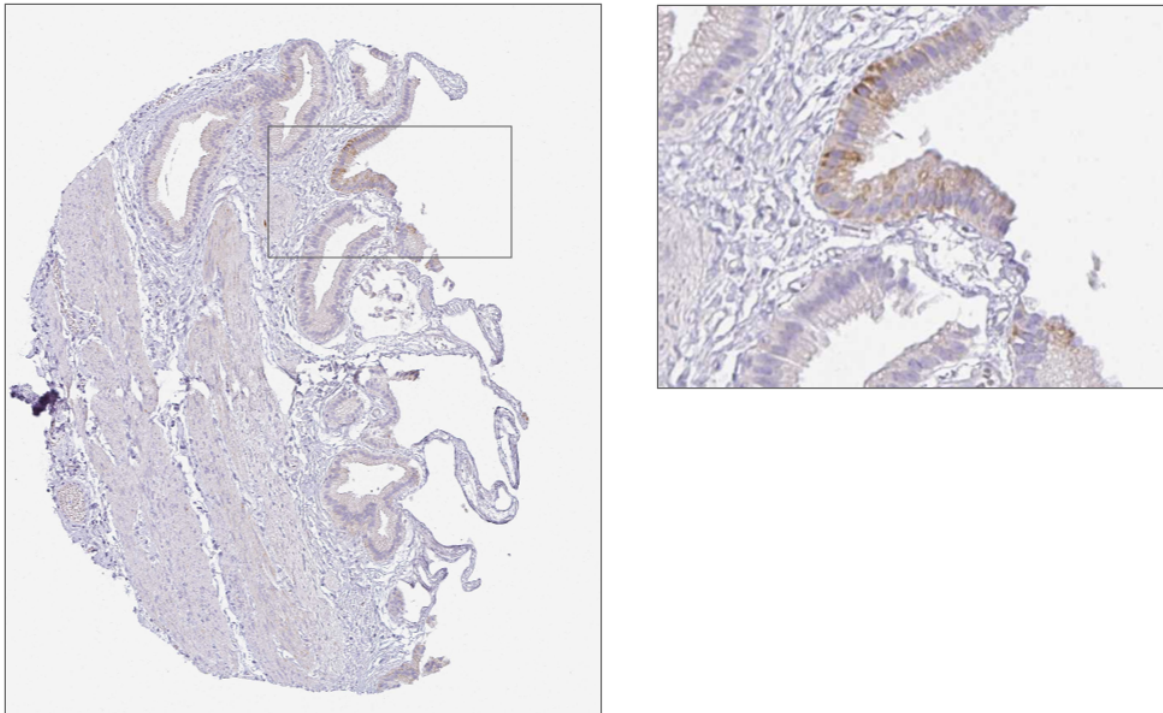
den CELA3B Kolonkarzinomen war die Anfärbung häufig auf die oberen Zelllagen beschränkt, wo Tumorzellen dicht vermischt mit Schleimmassen vorlagen. In diesen Zellen wäre es denkbar, dass die CELA3B Färbung im Tumor, analog zu den Befunden im Normalgewebe, durch eine Durchdringung des Tumorgewebes mit aus dem Pankreas stammenden im Stuhl nicht abgebauten CELA3B Protein, verursacht worden war.

Auch für GP2 hatten die zur Validierung der Färbeergebnisse herangezogenen RNA Expressionsdatenbanken ausschließlich im normalen Pankreas einen Nachweis von GP2 RNA ergeben (The Human Protein Atlas o.D.). Dazu passend fand sich auch für GP2 die mit Abstand stärkste Anfärbung von Normalgeweben in Pankreasgeweben. Dass eine GP2 RNA Expression in anderen Organen, bei denen ein positiver Immunhistochemischer Befund gezeigt hatte, auf RNA Ebene nicht nachweisbar war, könnte wiederum durch die relativ geringen Anteile der jeweiligen GP2 positiven Zelltypen in den betroffenen Organen bedingt sein. Eine Unterrepräsentierung von GP2 exprimierenden Zelltypen in der gesamt RNA von Organproben für RNA Untersuchungen könnte zu falsch negativen Befunden in RNA Datenbanken geführt haben. Tatsächlich gibt es viele Hinweise darauf, dass die in unserer Studie gefundenen extrapancreatischen GP2 Färbungen durch echtes GP2 bedingt sein dürfte. Eine echte Expression von GP2 in Magenantrum Drüsen und Gallenblasenepithel wird beispielsweise durch identische Befunde mit dem unabhängigen Antikörper HPA016668 aus dem human Proteinatlas unterstützt (The Human Proteinatlas o.D.). Die entsprechenden Befunde sind in Abbildung 59 bis 60 dargestellt.



**Abbildung 59:** Abgebildet ist eine Gewebestanze aus dem Normalgewebe (The Human Protein Atlas o.D.) Immunfärbung im Normalgewebe mittels des Antikörpers HPA016668. Fokal apikal betonte membranöse teils auch zytoplasmatische Immunfärbung einzelner Drüsen des Magens.





**Abbildung 60: Abgebildet ist eine Gewebestanze aus dem Normalgewebe (The Human Protein Atlas o.D.)** Immunfärbung im Normalgewebe mittels des Antikörpers HPA016668. Normalgewebe der Gallenblase mit apikal betonter moderater membranöser und teilweise auch zytoplasmatischer Immunfärbung einzelner Epithelien.

Die Echtheit der GP2 Expression in Brunner-Drüsen, Bronchialdrüsen und Drüsen des Endometriums, welche im human Proteinatlas nicht abgebildet sind, wird durch Befunde früherer Studien, welche GP2 in Brunner-Drüsen und mehreren anderen, selten untersuchten Drüsen beschreiben, jedoch unterstützt (Kimura et al. 2016; Sakumoto et al. 2015).

Die erfolgreiche immunhistochemische Untersuchung von GP2 an 13.218 Tumoren von 132 verschiedenen Tumortypen und -subtypen identifizierte GP2 als ein weiteres Protein, welches bevorzugt im Azinuszellkarzinom des Pankreas exprimiert wird. Allerdings zeigen die Befunde, dass GP2 für die Abgrenzung des Azinuszellkarzinoms des Pankreas von seinen wichtigsten Differentialdiagnosen, dem neuroendokrinen Karzinom bzw. dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas, weniger geeignet ist als CPA1 und CELA3B. Dies weil sowohl das neuroendokrine Karzinom wie auch das duktales Adenokarzinom des Pankreas zu der kleinen Gruppe von Tumoren gehören, welche zumindest in einem kleinen Teil der Fälle eine GP2 Anfärbung zeigen. Angesichts der Tatsache, dass die kombinierte Analyse von CPA1, CELA3B und GP2 nur bei Azinuszellkarzinomen des Pankreas eine Positivität

von 2 oder 3 Markern ergab kann allerdings auch GP2 als ein weiteres Instrument für die Sicherung der Diagnose eines Azinuszellkarzinoms des Pankreas genutzt werden (Tabelle 6).

	CPA1 *	CELA3B *	GP2 *	2 Marker (CPA1 und CELA3B) Positiv in %	3 Marker positiv in %
<b>Azinuszellkarzinom des Pankreas</b>	14/14 (100%)	12/16 (75%)	14/16 (87,5%)	12/14 (85,7%)	12/14 (85,7%)
<b>Duktales Adeno- Karzinom des Pankreas</b>	0/449 (0,0%)	0/448 (0,0%)	6/507 (1,2%)	0/448 (0,0%)	0/448 (0,0%)
<b>Neuroendokrine Neoplasien des Pankreas</b>	0/101 (0,0%)	0/95 (0,0%)	2/95 (2,4%)	0/95 (0,0%)	0/95 (0,0%)
<b>Andere Tumoren</b>	0/11.799 (0,0%)	7/12.664 (0,1%)	120/13.029 (0,9%)	0/11.799 (0,0%)	0/11.799 (0,0%)

**Tabelle 6: Vergleich der Spezifitäten von CPA1, CELA3B und GP2 sowie Kombinationen**

Positivitäten in % (\*). Diese Tabelle wurde aus eigenen Daten selbstständig erstellt.

Die Gesamtanzahl der auswertbaren Tumoren ist Abhängig von der Anfärbung und Auswertbarkeit der Gewebe-Spots. Somit unterscheidet sich die Gesamtzahl der auswertbaren Tumoren.

Die Identifikation einer zumindest in Einzelfällen vorkommenden GP2 Expression in Tumoren, welche sich von GP2 negativen Vorläuferzellen herleiten, deutet darauf hin, dass es in Tumoren unter bestimmten Umständen zu einer GP2 Neo Expression kommen kann. Die in unserem Kollektiv besonders hohe Zahl von extra-pankreatischen GP2 positiven Karzinomen von Prostata, Lunge, Mamma, Magen und Kolorektum passt zu den zusammengefassten Werten der RNA Expressions Daten von Tumoren, welche in der Datenbank des TCGA/ICGC Projektes identifiziert wurden (The Cancer Genome Atlas Program o.D.). Dass die überwiegende Mehrzahl der GP2 exprimierenden „nicht-pankreatischen Tumoren“, entweder neuroendokrine Neoplasien oder Adenokarzinome waren, würde für eine wichtige Rolle des GP2 Proteins für die Sekretion bzw. Freigabe von zellulären Produkten in die Blutbahn oder Lumina von Organen sprechen. Die generelle Rolle von GP2 ist nach wie vor nicht bekannt. Studien an GP2 Knockout Mäusen und pankreatischen Azinuszelllinien mit forcierter Überexpression von GP2 haben gezeigt, dass die Sekretion von Pankreasenzymen prinzipiell unabhängig von dem Vorhandensein und der interzellulären Menge von GP2 ist (Yu et al. 2004b; Yu et al. 2004a). Insbesondere basierend auf der Homologie von GP2 mit dem Protein Uromodulin (Hoops und Rindler 1991; Fukuoka et al. 1992) wurde ursprünglich vorgeschlagen, dass GP2 eine Rolle bei der Abwehr mikrobieller Infektionen spielen könnte (Yu und Lowe 2009). Uromodulin wird in der Niere exprimiert und ebenso wie GP2 sezerniert (Rindler et al. 1990; Jovine et al. 2002; Wolf

et al. 2003). Uromodulin bindet an E.coli und andere Bakterien und verhindert so eine bakterielle Adhäsion an Wirtszellen (Yu und Lowe 2009; Pak et al. 2001). Tatsächlich konnte für GP2 ebenfalls gezeigt werden, dass das Protein als ein Aufnahmerezeptor für E.coli, Salmonelle enterica und andere Bakterien fungieren kann (Ohno und Hase 2010) und dass GP2 defiziente Mäuse keine angemessene Immunantwort gegen diese Mikroben entwickeln können. Aus diesem Grund gilt GP2 aktuell in erster Linie als bedeutsam für die intestinale Immunität (Hase et al. 2009). Studien, welche die klinische Relevanz der GP2 Neo-Expression in Tumorentitäten, welche sich von GP2 negativen Ausgangszellen herleiten, fehlen bisher allerdings.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass CELA3B und GP2 überwiegend in Azinuszellkarzinomen des Pankreas exprimiert werden. Obwohl die Sensitivität und Spezifität von CELA3B und insbesondere GP2 für die Diagnose eines pankreatischen Azinuszellkarzinoms weniger günstig sind als für CPA1 erweisen sich beide Proteine, insbesondere CELA3B, als potentiell nützlich für die Klärung der schwierigen Differentialdiagnose, „pankreatisches Azinuszellkarzinom vs. neuroendokrine Neoplasie vs. duktales Adenokarzinom des Pankreas“. Weitere prospektive Studien würden zu klären haben, inwieweit die gemeinsame Nutzung von CPA1, CELA3B und GP2 die Zuverlässigkeit der Pankreaskarzinom Diagnostik verbessern kann.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1 Deutsche Zusammenfassung

Chymotrypsin-like elastase family member 3B (CELA3B), auch bekannt als Elastase-3B, wird von der Bauchspeicheldrüse als Zymogen sezerniert und hat eine Verdauungsfunktion im Darm. Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein (GP2) ist ein Bestandteil der Membranproteine der Zymogengranula und wird ebenfalls exokrin sezerniert. RNA-basierte Analysen von Normalgeweben deuten darauf hin, dass sowohl die Expression von CELA3B und GP2 auf die Bauchspeicheldrüse beschränkt ist. Aus diesem Grund wurde der potenzielle diagnostische Nutzen der Immunhistochemie von CELA3B und GP2 zur Unterscheidung von pankreatischen und extra-pankreatischen Neoplasien oder auch zur Unterscheidung von Azinuszellkarzinomen des Pankreas von dukталen Adenokarzinomen des Pankreas untersucht. Die Expression von CELA3B und GP2 wurde erfolgreich in 13.223/13.218 Tumorproben von 132 verschiedenen Tumortypen/-subtypen sowie in jeweils 8 Proben von 76 verschiedenen Normalgewebetypen mittels Immunhistochemie in einem Tissue-Microarray-Format (TMA) analysiert. Im Normalgewebe wurde eine CELA3B Immunfärbung nur in azinären Zellen, in einem Teil der dukталen Zellen der Bauchspeicheldrüse sowie auf einigen apikalen Membranen von Oberflächenepithelzellen des Darms gefunden. Bei GP2 war die Färbung des Normalgewebes ebenfalls am stärksten in den Azinuszellen der Bauchspeicheldrüse ausgeprägt. Zusätzlich wurde eine deutlich schwächere zytoplasmatische GP2 Färbung mit Betonung der apikalen Membran auch in Brunner-Drüsen des Duodenums, Drüsen des Magenantrums, Gallenblasenepithel, serösen Zellen der Bronchialdrüsen und einigen endometrialen Drüsen festgestellt. Bezüglich der Tumoren wurde eine CELA3B Immunfärbung in 12 der 16 (75%) Azinuszellkarzinome der Bauchspeicheldrüse, darunter 6 Fälle mit starker Färbung (37,5%), sowie in 11 von 13.207 anderen Tumoren (0,08%) festgestellt. Zu den „anderen Tumoren“ gehörten 0,3% der 1.765 kolorektalen Adenokarzinome, 1,1% der 91 adenoidzystischen Karzinome, 1,2% der 246 mukoepidermoid Karzinome und 0,8% der 127 Azinuszellkarzinome der Speicheldrüse. Eine GP2 Immunfärbung wurde bei 14 der 16 (87,5%) azinären Zellkarzinome, 6 der 507 (1,2%) dukталen Adenokarzinome und 2 der 85 (2,4%) neuroendokrinen Neoplasien der Bauchspeicheldrüse festgestellt. Zusätzlich wurde GP2 auch bei 22 anderen Tumorentitäten außerhalb des Pankreas gefunden, darunter verschiedene Arten neuroendokriner Neoplasien (28,4%), Prostata Adenokarzinome (8,1%), verschiedenen anderen Adenokarzinome (0,1 bis 7,7%) und verschiedenen Arten benigner und maligner Speicheldrüsentumoren (2,3 bis 3,1%). Eine starke Positivität von GP2 wurde jedoch nur bei 6 Tumorkategorien festgestellt. Dazu gehören 50% der 16 pankreatischen Azinuszellkarzinomen, 11,8% der 17 neuroendokrinen Tumoren der Lunge, 1,3% der 80 Adenokarzinome der Prostata (Gleason 4+4), 0,6% der 181 rezidivierenden Prostatakarzinome, 0,8% der 133 Adenokarzinomen der Lunge sowie 0,4% der 240 mukoepidermoidalen Speicheldrüsenkarzinome.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten eine gute Sensitivität und eine hohe Spezifität der CELA3B und GP2 Immunhistochemie für die Diagnose von Azinuszellkarzinomen der Bauchspeicheldrüse, wobei die Spezifität für CELA3B deutlich besser ist als die für GP2.

## 5.2 Abstract

Chymotrypsin-like elastase family member 3B (CELA3B) also known as elastase-3B, is secreted from the pancreas as a zymogen and has a digestive function in the intestine. Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein (GP2) is a membrane component of zymogen granules which is abundantly secreted into the small intestine. Since RNA based analyses of normal tissues suggest that both CELA3B and GP2 expression is completely limited to the pancreas, the potential diagnostic utility of CELA3B and GP2 immunohistochemistry for the distinction of pancreatic from extra-pancreatic neoplasms and the distinction of acinar cell carcinoma from ductal adenocarcinoma was assessed. CELA3B and GP2 expression was successfully analyzed in 13.223/ 13.218 tumor samples from 132/ 132 different tumortypes and subtypes as well as 8 samples each of 76 different normal tissue types by immunohistochemistry in a tissue microarray format (TMA). In normal tissues, CELA3B immunostaining was only seen in acinar cells and in a fraction of ductal cells of the pancreas as well as on some apical membranes of surface epithelial cells of the intestine. For GP2, normal tissue staining was also most prominent in pancreatic acinar cells, but a markedly weaker cytoplasmic GP2 staining with apical membrane predominance was also seen in duodenal Brunner glands, stomach antrum glands, gallbladder epithelium, serous cells in bronchial glands and a few endometrial glands. Among tumors, CELA3B immunostaining was seen in 12 of 16 (75%) acinar cell carcinoma of the pancreas including 6 cases with strong staining (37,5%) as well as in 11 of 13.207 other tumors (0,08%). These included 0,3% of 1.765 colorectal adenocarcinomas, 1,1% of 91 adenoid cystic carcinomas, 1,2% of 246 mucoepidermoid carcinomas and 0,8% of 127 acinic cell carcinomas of the salivary glands. GP2 immunostaining was seen 14 of 16 (87,5%) acinar cell carcinomas, 6 of 507 (1,2%) ductal adenocarcinomas and 2 of 85 (2,4%) neuroendocrine neoplasms of the pancreas. GP2 was also found in 22 extra-pancreatic tumor entities including several types of neuroendocrine neoplasms (28,4%), prostatic adenocarcinomas (8,1%), various other adenocarcinomas (0,1-7,7%) and several types of benign and malignant salivary gland tumors (2,3-3,1%). A strong positivity GP2 was only seen in 6 tumor categories, however. These include 50% of 16 pancreatic acinus cell carcinomas, 11,8% of 17 neuroendocrine tumors of the lung, 1,3% of 80 primary Gleason 4+4, 0,6% of 181 recurrent prostate cancers, 0,8% of 133 adenocarcinomas of the lung as well as 0,4% of 240 mucoepidermoid carcinoma of the salivary gland.

In conclusion, our data show a good sensitivity and a high specificity of CELA3B and GP2 immunohistochemistry for diagnosing acinar cell carcinoma of the pancreas although the specificity is still markedly better for CELA3B than for GP2.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

ACC	Azinuszellkarzinom
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BCL-10	B-Cell CLL/lymphoma 10
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDS	Choledocholithiasis
CELA3B	Chymotrypsin-like elastase family member 3
CPA1	Carboxypeptidase A1
CP	Chronische Pankreatitis
DLBCL	Diffuses großes B-Zell-Lymphom
DOI	Digital Object Identifier
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal-Growth-Factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent-assay
E-Nummer	Eingangsnummer
E.V.	Eingetragener Verein
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Ankers
GP2	Glycoprotein 2
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPA	human Proteinatlas
ID	Identity Document
IgA	Immunglobuline A
IgG	Immunglobuline B
IL17	Interleukin 17
IWGAV	International working group for antibody validation
kDa	Kilodalton
LDL	Low Density Lipoprotein
MADC	gemischte azinär-duktale Karzinome
MAEC	gemischte azinär-neuroendokrine Karzinome
Min.	Minute
MPNST	Maligner peripherer Nervenscheidentumor
MTA	Medizinisch-technischer Assistent
NEC	neuroendokrines Karzinom
NET	Neuroendokriner Tumor
NHGRI	National Human Genome-Research Institut
o.D.	Ohne Datum
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH-Wert	pondus Hydrogenii Wert
PNET	Primitiver neuroektodermaler Tumor
RNA	Ribonukleinsäure
S.	Seite
TBS-T-Puffer	Tris-buffered saline with Tween20
TCGA	Cancer Genome Atlas Program
THP	Tamm-Horsfall Protein
TM	Transmembrandomäne
TMA	Tissue-Microarray
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
v.a.	Vor allem
vs.	versus
z.B.	Zum Beispiel
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten
ZP-Domäne	Zona pellucida-Domäne

## 7. Literaturverzeichnis

Areschoug, Thomas; Gordon, Siamon (2008): Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands. In: *Contributions to microbiology* 15, S. 45–60. DOI: 10.1159/000135685.

Basturk, Olca; Tang, Laura; Hruban, Ralph H.; Adsay, Volkan; Yang, Zhaohai; Krasinskas, Alyssa M. et al. (2014): Poorly differentiated neuroendocrine carcinomas of the pancreas: a clinicopathologic analysis of 44 cases. In: *The American journal of surgical pathology* 38 (4), S. 437–447. DOI: 10.1097/PAS.000000000000169.

Basturk, Olca; Zamboni, Giuseppe; Klimstra, David S.; Capelli, Paola; Andea, Aleodor; Kamel, Nabil S.; Adsay, N. Volkan (2007): Intraductal and papillary variants of acinar cell carcinomas: a new addition to the challenging differential diagnosis of intraductal neoplasms. In: *The American journal of surgical pathology* 31 (3), S. 363–370. DOI: 10.1097/01.pas.0000213376.09795.9f.

Beaudoin, A. R.; St-Jean, P.; Grondin, G. (1991): Ultrastructural localization of GP2 in acinar cells of pancreas: presence of GP2 in endocytic and exocytic compartments. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 39 (5), S. 575–588. DOI: 10.1177/39.5.2016510.

Bergmann, Frank; Aulmann, Sebastian; Sipos, Bence; Kloor, Matthias; Heydebreck, Anja von; Schweipert, Johannes et al. (2014): Acinar cell carcinomas of the pancreas: a molecular analysis in a series of 57 cases. In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 465 (6), S. 661–672. DOI: 10.1007/s00428-014-1657-8.

Bogdanos, Dimitrios P.; Roggenbuck, Dirk; Reinhold, Dirk; Wex, Thomas; Pavlidis, Polychronis; Arnim, Ulrike von et al. (2012): Pancreatic-specific autoantibodies to glycoprotein 2 mirror disease location and behaviour in younger patients with Crohn's disease. In: *BMC gastroenterology* 12, S. 102. DOI: 10.1186/1471-230X-12-102.

Bonaci-Nikolic, Branka; Spuran, Milan; Andrejevic, Sladjana; Nikolic, Milos (2012): Autoantibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, in patients with gluten-sensitive enteropathy: a possible serological trap. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 413 (7-8), S. 822–823. DOI: 10.1016/j.cca.2012.01.005.

Bordeaux, Jennifer; Welsh, Allison; Agarwal, Seema; Killiam, Elizabeth; Baquero, Maria; Hanna, Jason et al. (2010): Antibody validation. In: *BioTechniques* 48 (3), S. 197–209. DOI: 10.2144/000113382.

Boros, Eszter; Szabó, András; Zboray, Katalin; Héja, Dávid; Pál, Gábor; Sahin-Tóth, Miklós (2017): Overlapping Specificity of Duplicated Human Pancreatic Elastase 3 Isoforms and Archetypal Porcine Elastase 1 Provides Clues to Evolution of Digestive Enzymes. In: *The Journal of biological chemistry* 292 (7), S. 2690–2702. DOI: 10.1074/jbc.M116.770560.

Bostrom, Jenny; Lee, Chingwei V.; Haber, Lauric; Fuh, Germaine (2009): Improving antibody binding affinity and specificity for therapeutic development. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 525, 353-76, xiii. DOI: 10.1007/978-1-59745-554-1\_19.

Butko, Margaret; Pallat, Hilary; Cordoba, Armando; Yu, X. Christopher (2014): Recombinant antibody color resulting from advanced glycation end product modifications. In: *Analytical chemistry* 86 (19), S. 9816–9823. DOI: 10.1021/ac5024099.

Cavestro GM, Nouvenne A, Merli R, Comparato G, Leandro G, Corrente V, Dalla Valle R (2004): Role of Fecal Elastase 1 in Pancreatic Cancer: A Pilot Study. Chair of Gastroenterology, Department of Clinical Sciences, University of Parma. Parma, Italy. Unit of Gastroenterology. Castellana Grotte (BA), Italy. Unit of Gastroenterology and Digestive Endoscopy. Parma, Italy. Surgical and Transplantation Clinic, Department of Surgical Sciences, University of Parma. Parma, Italy. In: *Journal of the Pancreas* Vol. 5 (No. 5 Supplement), S. 432–433. Online verfügbar unter <https://pancreas.imedpub.com/aisp--28th-national-congress-verona-italy-october-2830-2004.pdf>, zuletzt geprüft am 14.07.2021.

Consortium GT (2013): The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. In: *Nature genetics* 45 (6), S. 580–585. DOI: 10.1038/ng.2653.

DeLellis, R. A.; Sternberger, L. A.; Mann, R. B.; Banks, P. M.; Nakane, P. K. (1979): Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology. Report of a workshop sponsored by the National Cancer Institute. In: *American journal of clinical pathology* 71 (5), S. 483–488. DOI: 10.1093/ajcp/71.5.483.

Delia, D.; Martinez, E.; Fontanella, E.; Aiello, A. (1991): Two- and three-color immunofluorescence using aminocoumarin, fluorescein, and phycoerythrin-labelled antibodies and single laser flow cytometry. In: *Cytometry* 12 (6), S. 537–544. DOI: 10.1002/cyto.990120610.

Deller, Thomas (2018): Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie. 5. Auflage. Hg. v. Ulrich Welsch und Wolfgang Kummer. München: Elsevier. Online verfügbar unter <https://institut.elsevierelibrary.de/product/lehrbuch-histologie-5>.

Domínguez-Muñoz, J. Enrique; D Hardt, Philip; Lerch, Markus M.; Löhr, Matthias J. (2017): Potential for Screening for Pancreatic Exocrine Insufficiency Using the Fecal Elastase-1 Test. In: *Digestive diseases and sciences* 62 (5), S. 1119–1130. DOI: 10.1007/s10620-017-4524-z.

Edfors, Fredrik; Hober, Andreas; Linderbäck, Klas; Maddalo, Gianluca; Azimi, Alireza; Sivertsson, Åsa et al. (2018): Enhanced validation of antibodies for research applications. In: *Nature communications* 9 (1), S. 4130. DOI: 10.1038/s41467-018-06642-y.

Engjom, Trond; Tjora, Erling; Erchinger, Friedemann; Madzak, Adnan; Dimcevski, Georg; Frøkjær, Jens Brøndum; Haldorsen, Ingfrid Salvesen (2020): Secretin-Stimulated Magnetic Resonance Imaging Reveals Variable Diagnostic Accuracy According to Etiology in Pancreatic Disease. In: *Pancreas* 49 (3), S. 361–367. DOI: 10.1097/MPA.0000000000001491.

Fitzgerald, Timothy L.; Hickner, Zach J.; Schmitz, Matthew; Kort, Eric J. (2008): Changing incidence of pancreatic neoplasms: a 16-year review of statewide tumor registry. In: *Pancreas* 37 (2), S. 134–138. DOI: 10.1097/MPA.0b013e318163a329.

Fletcher, A. P.; McLaughlin, J. E.; Ratcliffe, W. A.; Woods, D. A. (1970): The chemical composition and electron microscopic appearance of a protein derived from urinary casts. In: *Biochimica et biophysica acta* 214 (2), S. 299–308. DOI: 10.1016/0005-2795(70)90007-3.

Forthal, Donald N. (2014): Functions of Antibodies. In: *Microbiology spectrum* 2 (4), S. 1–17.



Freedman, S. D.; Sakamoto, K.; Venu, R. P. (1993): GP2, the homologue to the renal cast protein uromodulin, is a major component of intraductal plugs in chronic pancreatitis. In: *The Journal of clinical investigation* 92 (1), S. 83–90. DOI: 10.1172/JCI116602.

Fritz, Benjamin A.; Poppel, Clinton S.; Fei, Matthew W.; Lowe, Anson W. (2002): Processing of the major pancreatic zymogen granule membrane protein, GP2. In: *Pancreas* 24 (4), S. 336–343. DOI: 10.1097/00006676-200205000-00003.

Fukuoka, S.; Freedman, S. D.; Scheele, G. A. (1991): A single gene encodes membrane-bound and free forms of GP-2, the major glycoprotein in pancreatic secretory (zymogen) granule membranes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (7), S. 2898–2902. DOI: 10.1073/pnas.88.7.2898.

Fukuoka, S.; Freedman, S. D.; Yu, H.; Sukhatme, V. P.; Scheele, G. A. (1992): GP-2/THP gene family encodes self-binding glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in apical secretory compartments of pancreas and kidney. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (4), S. 1189–1193. DOI: 10.1073/pnas.89.4.1189.

Fukuoka, Shin-Ichi (2000): Molecular cloning and sequences of cDNAs encoding  $\alpha$  (large) and  $\beta$  (small) isoforms of human pancreatic zymogen granule membrane-associated protein GP2. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1491 (1-3), S. 376–380. DOI: 10.1016/s0167-4781(00)00057-9.

Gao, Jun; Zhu, Feng; Lv, Shunli; Li, Zhaoshen; Ling, Zhang; Gong, Yanfang et al. (2010): Identification of pancreatic juice proteins as biomarkers of pancreatic cancer. In: *Oncology reports* 23 (6), S. 1683–1692. DOI: 10.3892/or\_00000812.

Gaujoux, Sébastien; Tissier, Frédérique; Ragazzon, Bruno; Rebours, Vinciane; Saloustros, Emmanouil; Perlemoine, Karine et al. (2011): Pancreatic ductal and acinar cell neoplasms in Carney complex: a possible new association. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96 (11), E1888-95. DOI: 10.1210/jc.2011-1433.

Hahn, Jan-Uwe; Bochnig, Sabine; Kerner, Wolfgang; Koenig, Helma; Sporleder, Birgit; Lankisch, Paul Georg et al. (2005): A new fecal elastase 1 test using polyclonal antibodies for the detection of exocrine pancreatic insufficiency. In: *Pancreas* 30 (2), S. 189–191. DOI: 10.1097/01.mpa.0000153617.40513.34.

Hao, Ying; Wang, Jing; Feng, Ningguo; Lowe, Anson W. (2004): Determination of Plasma Glycoprotein 2 Levels in Patients With Pancreatic Disease. In: *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 128 (6), S. 668–674. DOI: 10.5858/2004-128-668-DOPGLI.

Hase, Koji; Kawano, Kazuya; Nochi, Tomonori; Pontes, Gemilson Soares; Fukuda, Shinji; Ebisawa, Masashi et al. (2009): Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. In: *Nature* 462 (7270), S. 226–230. DOI: 10.1038/nature08529.

Heyderman, E. (1979): Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods, and controls. In: *Journal of clinical pathology* 32 (10), S. 971–978. DOI: 10.1136/jcp.32.10.971.

Holen, Kyle D.; Klimstra, David S.; Hummer, Amanda; Gonen, Mithat; Conlon, Kevin; Brennan, Murray; Saltz, Leonard B. (2002): Clinical characteristics and outcomes

from an institutional series of acinar cell carcinoma of the pancreas and related tumors. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 20 (24), S. 4673–4678. DOI: 10.1200/JCO.2002.02.005.

Hölzl, Markus A.; Hofer, Johannes; Kovarik, Johannes J.; Roggenbuck, Dirk; Reinhold, Dirk; Goihl, Alexander et al. (2011): The zymogen granule protein 2 (GP2) binds to scavenger receptor expressed on endothelial cells I (SREC-I). In: *Cellular immunology* 267 (2), S. 88–93. DOI: 10.1016/j.cellimm.2010.12.001.

Hoops, T. C.; Rindler, M. J. (1991): Isolation of the cDNA encoding glycoprotein-2 (GP-2), the major zymogen granule membrane protein. Homology to uromodulin/Tamm-Horsfall protein. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (7), S. 4257–4263.

Howanitz, P. J. (1988): Immunoassay. Development and directions in antibody technology. In: *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 112 (8), S. 771–774.

Im, Kyuseok; Mareninov, Sergey; Diaz, M. Fernando Palma; Yong, William H. (2019): An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1897, S. 299–311. DOI: 10.1007/978-1-4939-8935-5\_26.

Itoh, T.; Kishi, K.; Tojo, M.; Kitajima, N.; Kinoshita, Y.; Inatome, T. et al. (1992): Acinar cell carcinoma of the pancreas with elevated serum alpha-fetoprotein levels: a case report and a review of 28 cases reported in Japan. In: *Gastroenterologia Japonica* 27 (6), S. 785–791. DOI: 10.1007/BF02806533.

Jäkel, Cornelia; Bergmann, Frank; Toth, Reka; Assenov, Yassen; van der Duin, Daniel; Strobel, Oliver et al. (2017): Genome-wide genetic and epigenetic analyses of pancreatic acinar cell carcinomas reveal aberrations in genome stability. In: *Nature communications* 8 (1), S. 1323. DOI: 10.1038/s41467-017-01118-x.

Jovine, Luca; Darie, Costel C.; Litscher, Eveline S.; Wassarman, Paul M. (2005): Zona pellucida domain proteins. In: *Annual review of biochemistry* 74, S. 83–114. DOI: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133039.

Jovine, Luca; Qi, Huayu; Williams, Zev; Litscher, Eveline; Wassarman, Paul M. (2002): The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. In: *Nature cell biology* 4 (6), S. 457–461. DOI: 10.1038/ncb802.

Kapadia, Carl; Chang, Albert; Sotiropoulou, Georgia; Yousef, George M.; Grass, Linda; Soosaipillai, Antoninus et al. (2003): Human kallikrein 13: production and purification of recombinant protein and monoclonal and polyclonal antibodies, and development of a sensitive and specific immunofluorometric assay. In: *Clinical chemistry* 49 (1), S. 77–86. DOI: 10.1373/49.1.77.

Kelly, D. M.; Benjamin, I. S. (1995): Pancreatic carcinoma. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 6 (1), S. 19–28. DOI: 10.1093/oxfordjournals.annonc.a059031.

Kimura, Shunsuke; Nio-Kobayashi, Junko; Kishimoto, Ayuko; Iwanaga, Toshihiko (2016): The broad distribution of GP2 in mucous glands and secretory products. In: *Biomedical research (Tokyo, Japan)* 37 (6), S. 351–358. DOI: 10.2220/biomedres.37.351.

Kleene, R.; Dartsch, H.; Kern, H. F. (1999): The secretory lectin ZG16p mediates sorting of enzyme proteins to the zymogen granule membrane in pancreatic acinar

cells. In: *European journal of cell biology* 78 (2), S. 79–90. DOI: 10.1016/S0171-9335(99)80009-0.

Klimstra, D. S.; Heffess, C. S.; Oertel, J. E.; Rosai, J. (1992): Acinar cell carcinoma of the pancreas. A clinicopathologic study of 28 cases. In: *The American journal of surgical pathology* 16 (9), S. 815–837. DOI: 10.1097/00000478-199209000-00001.

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

Klimstra, David S.; Adsay, Volkan (2016): Acinar neoplasms of the pancreas-A summary of 25 years of research. In: *Seminars in diagnostic pathology* 33 (5), S. 307–318. DOI: 10.1053/j.semmp.2016.05.009.

Klimstra, David S.; Pitman, Martha B.; Hruban, Ralph H. (2009): An algorithmic approach to the diagnosis of pancreatic neoplasms. In: *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 133 (3), S. 454–464. DOI: 10.5858/133.3.454.

Kobayashi, Y.; Kobayashi, R.; Hirs, C. H. (1981): Identification of zymogen E in a complex with bovine procarboxypeptidase A. In: *The Journal of biological chemistry* 256 (5), S. 2466–2470.

Koch-Institut, Robert; Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. (2019): Krebs in Deutschland 2015/2016. DOI: 10.25646/5977.

Komorowski, Lars; Teegen, Bianca; Probst, Christian; Aulinger-Stöcker, Karola; Sina, Christian; Fellermann, Klaus; Stöcker, Winfried (2013): Autoantibodies against exocrine pancreas in Crohn's disease are directed against two antigens: the glycoproteins CUZD1 and GP2. In: *Journal of Crohn's & colitis* 7 (10), S. 780–790. DOI: 10.1016/j.crohns.2012.10.011.

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

Kurosawa, Nobuyuki; Yoshioka, Megumi; Fujimoto, Rika; Yamagishi, Fuminori; Isobe, Masaharu (2012): Rapid production of antigen-specific monoclonal antibodies from a variety of animals. In: *BMC biology* 10, S. 80. DOI: 10.1186/1741-7007-10-80.

La Rosa, Stefano; Adsay, Volkan; Albarello, Luca; Asioli, Sofia; Casnedi, Selenia; Franzi, Francesca et al. (2012): Clinicopathologic study of 62 acinar cell carcinomas of the pancreas: insights into the morphology and immunophenotype and search for prognostic markers. In: *The American journal of surgical pathology* 36 (12), S. 1782–1795. DOI: 10.1097/PAS.0b013e318263209d.

La Rosa, Stefano; Franzi, Francesca; Marchet, Silvia; Finzi, Giovanna; Clerici, Moira; Vigetti, Davide et al. (2009): The monoclonal anti-BCL10 antibody (clone 331.1) is a sensitive and specific marker of pancreatic acinar cell carcinoma and pancreatic metaplasia. In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 454 (2), S. 133–142. DOI: 10.1007/s00428-008-0710-x.

La Rosa, Stefano; Sessa, Fausto; Capella, Carlo (2015): Acinar Cell Carcinoma of the Pancreas: Overview of Clinicopathologic Features and Insights into the Molecular Pathology. In: *Frontiers in medicine* 2, S. 41. DOI: 10.3389/fmed.2015.00041.

Laass, Martin W.; Röber, Nadja; Range, Ursula; Noß, Lydia; Roggenbuck, Dirk; Conrad, Karsten (2015): Loss and Gain of Tolerance to Pancreatic Glycoprotein 2 in Celiac Disease. In: *PloS one* 10 (6), e0128104. DOI: 10.1371/journal.pone.0128104.

Largman, C.; Brodrick, J. W.; Geokas, M. C. (1976): Purification and characterization of two human pancreatic elastases. In: *Biochemistry* 15 (11), S. 2491–2500. DOI: 10.1021/bi00656a036.

LeBel, Denis; Beattie, Marlyne (1988): The major protein of pancreatic zymogen granule membranes (GP-2) is anchored via covalent bonds to phosphatidylinositol. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 154 (2), S. 818–823. DOI: 10.1016/0006-291x(88)90213-6.

Li, Yan; Zhu, Yux Yuzhang; Dai, Gui Ping; Wu, Dong Juan; Gao, Zhen Zhen; Zhang, Lei; Fan, Yao Hua (2019): Screening and validating the core biomarkers in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. In: *Mathematical biosciences and engineering : MBE* 17 (1), S. 910–927. DOI: 10.3934/mbe.2020048.

Lin, Yingsong; Nakatochi, Masahiro; Hosono, Yasuyuki; Ito, Hidemi; Kamatani, Yoichiro; Inoko, Akihito et al. (2020): Genome-wide association meta-analysis identifies GP2 gene risk variants for pancreatic cancer. In: *Nature communications* 11 (1), S. 3175. DOI: 10.1038/s41467-020-16711-w.

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

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

Löser, C.; Möllgaard, A.; Fölsch, U. R. (1996): Faecal elastase 1: a novel, highly sensitive, and specific tubeless pancreatic function test. In: *Gut* 39 (4), S. 580–586. DOI: 10.1136/gut.39.4.580.

Lowery, Maeve A.; Klimstra, David S.; Shia, Jinru; Yu, Kenneth H.; Allen, Peter J.; Brennan, Murray F.; O'Reilly, Eileen M. (2011): Acinar cell carcinoma of the pancreas: new genetic and treatment insights into a rare malignancy. In: *The oncologist* 16 (12), S. 1714–1720. DOI: 10.1634/theoncologist.2011-0231.

Lu, Ruei-Min; Hwang, Yu-Chyi; Liu, I-Ju; Lee, Chi-Chiu; Tsai, Han-Zen; Li, Hsin-Jung; Wu, Han-Chung (2020): Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. In: *Journal of biomedical science* 27 (1), S. 1. DOI: 10.1186/s12929-019-0592-z.

Lucien, Fabrice; Lac, Vivian; Billadeau, Daniel D.; Borgida, Ayelet; Gallinger, Steven; Leong, Hon S. (2019): Glypican-1 and glycoprotein 2 bearing extracellular vesicles do not discern pancreatic cancer from benign pancreatic diseases. In: *Oncotarget* 10 (10), S. 1045–1055. DOI: 10.18632/oncotarget.26620.

Macdonald, Raymond J.; Ronzio, Robert A. (1972): Comparative analysis of zymogen granule membrane polypeptides. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 49 (2), S. 377–382. DOI: 10.1016/0006-291x(72)90421-4.

Miendje, Yvette; Maisin, Diane; Sipewa, Marie J.; Deprez, Pierre; Buts, Jean P.; Nayer, Philippe de; Philippe, Marianne (2004): Polyclonal versus monoclonal ELISA for the determination of fecal elastase 1: diagnostic value in cystic fibrosis and chronic pancreatic insufficiency. In: *Clinical laboratory* 50 (7-8), S. 419–424.

Moore, Paul C.; Cortez, Jessica T.; Chamberlain, Chester E.; Alba, Diana; Berger, Amy C.; Quandt, Zoe et al. (2019): Elastase 3B mutation links to familial pancreatitis with diabetes and pancreatic adenocarcinoma. In: *The Journal of clinical investigation* 129 (11), S. 4676–4681. DOI: 10.1172/JCI129961.

Nakamura, R. M. (1983): Monoclonal antibodies: methods and clinical laboratory applications. In: *Clinical physiology and biochemistry* 1 (2-5), S. 160–172.

Nakamura, Yutaka; Kimura, Shunsuke; Hase, Koji (2018): M cell-dependent antigen uptake on follicle-associated epithelium for mucosal immune surveillance. In: *Inflammation and regeneration* 38, S. 15. DOI: 10.1186/s41232-018-0072-y.

Nakane, P. K.; Kawaoi, A. (1974): Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 22 (12), S. 1084–1091. DOI: 10.1177/22.12.1084.

Nakane, P. K.; Pierce, G. B. (1966): Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 14 (12), S. 929–931. DOI: 10.1177/14.12.929.

National Cancer Institute o.D.: TCGA Datenbank, CELA3B RNA Expressionsdaten. Online verfügbar unter <https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000219073>, zuletzt geprüft am 17.08.2021.

Nojima, Takayuki; Kojima, Tetsufumi; Kato, Hiroyuki; Sato, Toshihiro; Koito, Kazumitsu; Nagashima, Kazuo (1992): Alpha-fetoprotein-producing acinar cell carcinoma of the pancreas. In: *Human Pathology* 23 (7), S. 828–830. DOI: 10.1016/0046-8177(92)90354-6.

Ohno, Hiroshi; Hase, Koji (2010): Glycoprotein 2 (GP2): grabbing the FimH bacteria into M cells for mucosal immunity. In: *Gut microbes* 1 (6), S. 407–410. DOI: 10.4161/gmic.1.6.14078.

Owen, R. L.; Jones, A. L. (1974): Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. In: *Gastroenterology* 66 (2), S. 189–203.

Pak, J.; Pu, Y.; Zhang, Z. T.; Hasty, D. L.; Wu, X. R. (2001): Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated Escherichia coli and prevents E. coli from binding to uroplakin Ia and Ib receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (13), S. 9924–9930. DOI: 10.1074/jbc.M008610200.

Párniczky, Andrea; Hegyi, Eszter; Tóth, Anna Zsófia; Szücs, Ákos; Szentesi, Andrea; Vincze, Áron et al. (2016): Genetic Analysis of Human Chymotrypsin-Like Elastases 3A and 3B (CELA3A and CELA3B) to Assess the Role of Complex Formation between Proelastases and Procarboxypeptidases in Chronic Pancreatitis. In: *International journal of molecular sciences* 17 (12), S. 2148. DOI: 10.3390/ijms17122148.

Pokrzywa, Courtney J.; Abbott, Daniel E.; Matkowskyj, Kristina A.; Ronnekleiv-Kelly, Sean M.; Winslow, Emily R.; Weber, Sharon M.; Fisher, Alexander V. (2019): Natural History and Treatment Trends in Pancreatic Cancer Subtypes. In: *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 23 (4), S. 768–778. DOI: 10.1007/s11605-019-04113-3.

Quiocho, Florante A.; Lipscomb, William N. (1971): Carboxypeptidase A: A Protein and an Enzyme. In: Bd. 25: Elsevier (Advances in Protein Chemistry), S. 1–78.

Ramos-Vara, J. A.; Miller, M. A. (2014): When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. In: *Veterinary pathology* 51 (1), S. 42–87. DOI: 10.1177/0300985813505879.

Rathanaswami, Palaniswami; Babcook, John; Gallo, Michael (2008): High-affinity binding measurements of antibodies to cell-surface-expressed antigens. In: *Analytical biochemistry* 373 (1), S. 52–60. DOI: 10.1016/j.ab.2007.08.014.

Reznek, R. H.; Stephens, D. H. (1993): The staging of pancreatic adenocarcinoma. In: *Clinical Radiology* 47 (6), S. 373–381. DOI: 10.1016/s0009-9260(05)81056-6.

Rindler, M. J.; Hoops, T. C. (1990): The pancreatic membrane protein GP-2 localizes specifically to secretory granules and is shed into the pancreatic juice as a protein aggregate. In: *European journal of cell biology* 53 (1), S. 154–163.

Rindler, M. J.; Naik, S. S.; Li, N.; Hoops, T. C.; Peraldi, M. N. (1990): Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein/uromucoid) is a phosphatidylinositol-linked membrane protein. In: *The Journal of biological chemistry* 265 (34), S. 20784–20789.

Roggenbuck, D.; Hausdorf, G.; Martinez-Gamboa, L.; Reinhold, D.; Büttner, T.; Jungblut, P. R. et al. (2009): Identification of GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, as the autoantigen of pancreatic antibodies in Crohn's disease. In: *Gut* 58 (12), S. 1620–1628. DOI: 10.1136/gut.2008.162495.

Roggenbuck, D.; Reinhold, D.; Baumgart, D. C.; Schierack, P.; Conrad, K.; Laass, M. W. (2016): Autoimmunity in Crohn's Disease-A Putative Stratification Factor of the Clinical Phenotype. In: *Advances in clinical chemistry* 77, S. 77–101. DOI: 10.1016/bs.acc.2016.06.002.

Roggenbuck, Dirk; Goihl, Alexander; Hanack, Katja; Holzlöhner, Pamela; Hentschel, Christian; Veiczi, Miklos et al. (2017): Serological diagnosis and prognosis of severe acute pancreatitis by analysis of serum glycoprotein 2. In: *Clinical chemistry and laboratory medicine* 55 (6), S. 854–864. DOI: 10.1515/cclm-2016-0797.

Roggenbuck, Dirk; Humbel, René-Louis; Reinhold, Dirk; Bogdanos, Dimitrios P.; Conrad, Karsten; Laass, Martin W. (2013): Glycoprotein 2 antibodies in inflammatory bowel disease: no association with disease phenotype? In: *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 56 (1), e5. DOI: 10.1097/MPG.0b013e318275fa77.

Ronzio, Robert A.; Kronquist, Kathryn E.; Lewis, Douglas S.; Macdonald, Raymond J.; Mohrlok, Sharon H.; O'Donnell, John J. (1978): Glycoprotein synthesis in the adult rat pancreas. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 508 (1), S. 65–84. DOI: 10.1016/0005-2736(78)90189-x.

Säemann, Marcus D.; Weichhart, Thomas; Zeyda, Maximilian; Staffler, Günther; Schunn, Michael; Stuhlmeier, Karl M. et al. (2005): Tamm-Horsfall glycoprotein links innate immune cell activation with adaptive immunity via a Toll-like receptor-4-dependent mechanism. In: *The Journal of clinical investigation* 115 (2), S. 468–475. DOI: 10.1172/JCI22720.

Said, Samar; Kurtin, Paul J.; Nasr, Samih H.; Graham, Rondell P.; Dasari, Surendra; Vrana, Julie A. et al. (2020): Carboxypeptidase A1 and regenerating islet-derived 1 $\alpha$  as new markers for pancreatic acinar cell carcinoma. In: *Human Pathology* 103, S. 120–126. DOI: 10.1016/j.humpath.2020.07.019.

Sakumoto, Ryosuke; Hayashi, Ken-Go; Saito, Shiori; Kanahara, Hiroko; Kizaki, Keiichiro; Iga, Kosuke (2015): Comparison of the global gene expression profiles in

- the bovine endometrium between summer and autumn. In: *The Journal of reproduction and development* 61 (4), S. 297–303. DOI: 10.1262/jrd.2015-024.
- Saper, Clifford B. (2005): An open letter to our readers on the use of antibodies. In: *The Journal of comparative neurology* 493 (4), S. 477–478. DOI: 10.1002/cne.20839.
- Saper, Clifford B. (2009): A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 57 (1), S. 1–5. DOI: 10.1369/jhc.2008.952770.
- Scheele, G. A.; Fukuoka, S.; Freedman, S. D. (1994): Role of the GP2/THP family of GPI-anchored proteins in membrane trafficking during regulated exocrine secretion. In: *Pancreas* 9 (2), S. 139–149. DOI: 10.1097/00006676-199403000-00001.
- Schmidt, K.; Dartsch, H.; Linder, D.; Kern, H. F.; Kleene, R. (2000): A submembranous matrix of proteoglycans on zymogen granule membranes is involved in granule formation in rat pancreatic acinar cells. In: *Journal of cell science* 113 (Pt 12), S. 2233–2242.
- Schmidt, K.; Schrader, M.; Kern, H. F.; Kleene, R. (2001): Regulated apical secretion of zymogens in rat pancreas. Involvement of the glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein GP-2, the lectin ZG16p, and cholesterol-glycosphingolipid-enriched microdomains. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (17), S. 14315–14323. DOI: 10.1074/jbc.M006221200.
- Seket, Belhassen; Saurin, Jean-Christophe; Scoazec, Jean-Yves; Partensky, Christian (2003): Carcinome pancréatique à cellules acineuses et polypose adénomateuse familiale. In: *Gastroenterologie clinique et biologique* 27 (8-9), S. 818–820.
- Seth, Akhil K.; Argani, Pedram; Campbell, Kurtis A.; Cameron, John L.; Pawlik, Timothy M.; Schulick, Richard D. et al. (2008): Acinar cell carcinoma of the pancreas: an institutional series of resected patients and review of the current literature. In: *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 12 (6), S. 1061–1067. DOI: 10.1007/s11605-007-0338-1.
- Shen, W. F.; Fletcher, T. S.; Largman, C. (1987): Primary structure of human pancreatic protease E determined by sequence analysis of the cloned mRNA. In: *Biochemistry* 26 (12), S. 3447–3452. DOI: 10.1021/bi00386a030.
- Shi, S. R.; Key, M. E.; Kalra, K. L. (1991): Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 39 (6), S. 741–748. DOI: 10.1177/39.6.1709656.
- Sigel, Carlie S.; Klimstra, David S. (2013): Cytomorphologic and immunophenotypical features of acinar cell neoplasms of the pancreas. In: *Cancer cytopathology* 121 (8), S. 459–470. DOI: 10.1002/cncy.21279.
- Sternberger, L. A.; Hardy, P. H.; Cuculis, J. J.; Meyer, H. G. (1970): The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 18 (5), S. 315–333. DOI: 10.1177/18.5.315.

Szabó, András; Pilsak, Claudia; Bence, Melinda; Witt, Heiko; Sahin-Tóth, Miklós (2016): Complex Formation of Human Proelastases with Procarboxypeptidases A1 and A2\*. In: *The Journal of biological chemistry* 291 (34), S. 17706–17716. DOI: 10.1074/jbc.M116.743237.

Sziegoleit, A. (1982): Purification and characterization of a cholesterol-binding protein from human pancreas. In: *The Biochemical journal* 207 (3), S. 573–582. DOI: 10.1042/bj2070573.

Sziegoleit, A. (1984): A novel proteinase from human pancreas. In: *The Biochemical journal* 219 (3), S. 735–742. DOI: 10.1042/bj2190735.

Sziegoleit, Andreas; Krause, Elmar; Klör, Hans-Ulrich; Kanacher, Linda; Linder, Dietmar (1989): Elastase 1 and chymotrypsin B in pancreatic juice and feces. In: *Clinical Biochemistry* 22 (2), S. 85–89. DOI: 10.1016/s0009-9120(89)80003-7.

Tani, T.; Ohsumi, J.; Mita, K.; Takiguchi, Y. (1988): Identification of a novel class of elastase isozyme, human pancreatic elastase III, by cDNA and genomic gene cloning. In: *The Journal of biological chemistry* 263 (3), S. 1231–1239. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)57291-X.

Terahara, Kazutaka; Yoshida, Masato; Igarashi, Osamu; Nochi, Tomonori; Pontes, Gemilson Soares; Hase, Koji et al. (2008): Comprehensive gene expression profiling of Peyer's patch M cells, villous M-like cells, and intestinal epithelial cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180 (12), S. 7840–7846. DOI: 10.4049/jimmunol.180.12.7840.

The Cancer Genome Atlas Program o.D.: National Cancer Institute at the National Institutes of Health. TCGA. Online verfügbar unter <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>, zuletzt geprüft am 17.07.2021.

The Human Protein Atlas o.D.: CELA3B RNA-Expression Überblick. Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000169347-GP2/tissue>, zuletzt geprüft am 16.07.2021.

The Human Protein Atlas o.D.: Normalgewebe Kolon. CELA3B Expression, Antikörper HPA045650. Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000219073-CELA3B/tissue/colon#img>, zuletzt geprüft am 17.08.2021.

The Human Protein Atlas o.D.: The Human Protein Atlas. GP2 RNA-Expression Überblick. Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000169347-GP2/tissue>, zuletzt geprüft am 16.07.2021.

The Human Protein Atlas o.D.: CELA3B RNA-Expression in Tumoren. Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000219073-CELA3B/pathology>, zuletzt geprüft am 17.07.2021.

The Human Protein Atlas o.D.: Colon, Antibody staining, HPA 045650. Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000219073-CELA3B/tissue/colon#>, zuletzt geprüft am 14.07.2021.

The Human Protein Atlas o.D.: CELA3B Immunfärbung einzelner Drüsen des Magens durch den Antikörper HPA016668. Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000219073-CELA3B/tissue/stomach>, zuletzt geprüft am 20.08.2021.



The Human Protein Atlas o.D.: CELA3B Immunfärbung einzelner Epithelien der Gallenblase durch den Antikörper HPA016666. Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000219073-CELA3B/tissue/gallbladder>, zuletzt geprüft am 20.08.2021.

The Human Protein Atlas o.D.: Übersicht GP2 RNA-Expression in Tumoren. Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000169347-GP2/pathology>, zuletzt geprüft am 16.07.2021.

The Human Protein Atlas o.D. Tissue expression of CELA3B. Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000219073-CELA3B/tissue>, zuletzt geprüft am 14.07.2021.

The Human Proteinatlas o.D.: CELA3B RNA Expression; Antikörper HPA016668. Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000169347-GP2/tissue>, zuletzt geprüft am 17.08.2021.

Thompson, Elizabeth D.; Wood, Laura D. (2020): Pancreatic Neoplasms With Acinar Differentiation: A Review of Pathologic and Molecular Features. In: *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 144 (7), S. 808–815. DOI: 10.5858/arpa.2019-0472-RA.

Tóth, Anna Zsófia; Szabó, András; Hegyi, Eszter; Hegyi, Péter; Sahin-Tóth, Miklós (2017): Detection of human elastase isoforms by the ScheBo Pancreatic Elastase 1 Test. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 312 (6), G606-G614. DOI: 10.1152/ajpgi.00060.2017.

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

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

Uhlig R.; Contreras H.; Weidemann S.; Gorbokon N.; Menz A.; Büscheck F.; Luebcke A. M. et al. (2021) (2021): Carboxypeptidase A1 (CPA1) immunohistochemistry is highly sensitive and specific for acinar cell carcinoma (ACC) of the pancreas. In: *Institute of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany*.

Wang, Lei; Liu, Hai-Lin; Li, Ya; Yuan, Ping (2011): Proteomic analysis of pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic carcinoma in rat models. In: *World journal of gastroenterology* 17 (11), S. 1434–1441. DOI: 10.3748/wjg.v17.i11.1434.

Weiss, Frank Ulrich; Budde, Christoph; Lerch, Markus M. (2016): Specificity of a Polyclonal Fecal Elastase ELISA for CELA3. In: *PloS one* 11 (7), e0159363. DOI: 10.1371/journal.pone.0159363.

Werner, Lael; Paclik, Daniela; Fritz, Christina; Reinhold, Dirk; Roggenbuck, Dirk; Sturm, Andreas (2012): Identification of pancreatic glycoprotein 2 as an endogenous immunomodulator of innate and adaptive immune responses. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 189 (6), S. 2774–2783. DOI: 10.4049/jimmunol.1103190.

WHO classification of tumours (2019): Digestive System Tumours. Edited by the WHO Classification of Tumors Editorial Board. 5th ed. Lyon: World Health Organization (WHO) (ISBN 978-92-832-4499-8).

Wolf, Matthias T. F.; Mucha, Bettina E.; Attanasio, Massimo; Zalewski, Isabella; Karle, Stephanie M.; Neumann, Hartmut P. H. et al. (2003): Mutations of the Uromodulin gene in MCKD type 2 patients cluster in exon 4, which encodes three EGF-like domains. In: *Kidney international* 64 (5), S. 1580–1587. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00269.x.

Wong, Shirley M.E.; Lowe, Anson W. (1996): Sequence of the cDNA encoding human GP-2, the major membrane protein in the secretory granule of the exocrine pancreas. In: *Gene* 171 (2), S. 311–312. DOI: 10.1016/0378-1119(96)00065-0.

Yu, Su; Hao, Ying; Lowe, Anson W. (2004a): Effects of GP2 expression on secretion and endocytosis in pancreatic AR4-2J cells. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322 (1), S. 320–325. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.07.120.

Yu, Su; Lowe, Anson W. (2009): The pancreatic zymogen granule membrane protein, GP2, binds Escherichia coli Type 1 fimbriae. In: *BMC gastroenterology* 9, S. 58. DOI: 10.1186/1471-230X-9-58.

Yu, Su; Michie, Sara A.; Lowe, Anson W. (2004b): Absence of the major zymogen granule membrane protein, GP2, does not affect pancreatic morphology or secretion. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (48), S. 50274–50279. DOI: 10.1074/jbc.M410599200.

Zhong, Jun; Jermusyk, Ashley; Wu, Lang; Hoskins, Jason W.; Collins, Irene; Mocci, Evelina et al. (2020): A Transcriptome-Wide Association Study Identifies Novel Candidate Susceptibility Genes for Pancreatic Cancer. In: *Journal of the National Cancer Institute* 112 (10), S. 1003–1012. DOI: 10.1093/jnci/djz246.

## 8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. G. Sauter und meinen Zweitbetreuer Herrn Prof. Dr. R. Simon für die gute Betreuung und Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Meinen Eltern Carsten Bröker und Gabriela Behrens-Bröker möchte ich an dieser Stelle ganz besonders für ihre Geduld, die zahlreichen Zusprüche, Ermutigungen und dass sie immer für mich da sind danken.

## 9. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## 10. 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: .....