

Aus dem Institut für Allgemeine Pathologie
(Direktor: Prof. Dr. med. C. Röcken)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Immunhistochemische Untersuchungen zur Herkunft der Solid-pseudopapillären Neoplasie des Pankreas

Inauguraldissertation zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
MATTHIAS FRANK HERZOG
aus Kneheim

Kiel 2010

1. Berichterstatter: PD Dr. Tiemann, Institut für Hämatopathologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Leuschner, Institut für Pathologie

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2011

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 14.06.2011

gez.: Prof. Dr. Klapper, Institut für Pathologie
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Abkürzungen

α AT	α -1-Antitrypsin
α ACT	α -1-Antichymotrypsin
CA19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CD10/56	Cluster of differentiation 10/56
CDX-2	Caudal type home box 2
CEA	Carcino-embryonales Antigen
CGA	Chromogranin
c-kit	Tyrosinkinase-Rezeptor
EWS	Ewing sarcoma breakpoint region 1
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLI-1	Friend leukemia virus integration 1
GAL-3	Galectin-3
GIP	Glukoseabhängiges insulinotropes Polyeptid
GLP1	Glukagon-like Peptid 1
HNF4 α	Hepatocyte nuclear factor 4 α
ISL-1	Islet-1
MafA	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A
NeuroD1	Neurogenic differentiation 1 = BETA2
NGN3	Neurogenin 3
Nk2.2	NK2 homeodomain protein
Nkx6.1	NK6 homeobox 1
NPDS	Nestin-positive duktale Stammzellen
NSE	Neuronen-spezifische Enolase
PAS	Periodic acid-Schiff stain = Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung
PAX-4/6	paired box protein 4/6
PDX-1	pancreatic and duodenal homeobox 1
Pf1a	polar fraction 1a (Teil eines Glykolipids)

pRb	Hyperphosphoryliertes Retinoblastom-Protein
PR-R	Progesteron-Rezeptor
p21/27	calcium binding protein 21/27
p300	E1A binding protein p300
SOX-9	SRY (sex determining region Y)-box 9
SPN	Solid-pseudopapilläre Neoplasie
SYN	Synaptophysin
S 100	S100 calcium binding protein B
TF	Transkriptionsfaktor
TMA	Tissue-Microarray®
ZK	Zvtokeratin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Klinik.....	1
1.2 Aus Sicht der Pathologie.....	1
1.3 Ziel der Arbeit und Auswahl der Antikörper.....	2
2. Material und Methoden	4
2.1 Material.....	4
2.1.1 Herkunft des Untersuchungsguts.....	4
2.1.2 Herstellung der Tissue-Microarrays®.....	4
2.1.3 Vorbereitungen zur immunhistochemischen Färbung.....	5
2.1.4 Verwendete Antikörper und Detektionssysteme.....	6
2.2 Methode.....	7
2.2.1 Die Immunperoxidasefärbung.....	7
2.2.2 Die mikroskopische Auswertung.....	9
2.2.3 Die statistische Auswertung.....	11
3. Ergebnisse	12
1. Klinische Daten.....	12
2. Histomorphologie.....	12
3. Immunhistochemische Auswertung.....	13
3.3.1 c-kit.....	14
3.3.2 Nestin.....	15
3.3.3 PAX-6.....	16
3.3.4 Neurogenin 3.....	17
3.3.5 PDX-1.....	17
3.3.6 Islet-1.....	18
3.3.7 CDX-2.....	18

4. Diskussion	19
4.1 Bewertung der Materialien und Methoden.....	19
4.2 Bisherige Versuche einer SPN-Zuordnung.....	19
4.3 Stammzellmarker.....	22
4.3.1 c-kit.....	22
4.3.2 Nestin.....	24
4.4 Pro- und endokrine Marker.....	25
4.4.1 PDX-1.....	25
4.4.2 Neurogenin 3.....	26
4.4.3 PAX-6.....	27
4.4.4 Islet-1.....	28
4.5 Marker enteroendokriner Differenzierung.....	29
4.5.1 CDX-2.....	29
4.6 Zusammenschau der Immunhistochemie-Ergebnisse.....	30
4.6.1 Vor dem Hintergrund der endokrinen Organogenese.....	30
4.6.2 Vor dem Hintergrund der Pankreasregeneration.....	31
4.7 Schlussfolgerungen.....	32
5. Zusammenfassung	33
6. Literaturverzeichnis	34
7. Anhang	46
7.1 Tabellen.....	46
7.2 Bildmaterial.....	50
8. Danksagung	52
9. Lebenslauf	53

1. Einleitung

Die solid-pseudopapilläre Neoplasie (SPN) gehört zu den seltener vorkommenden Tumoren des Pankreas. Gerade im Vergleich mit dem duktalem Adenokarzinom, das unter allen Neoplasien des Pankreas mit einer Inzidenz von 92% den Großteil ausmacht (Böcker et al., 2004), nimmt sich die Zahl der SPN-Fälle ausnehmend gering aus.

1.1 Klinik

Zu 87% tritt der Tumor bei Frauen auf. Die Altersspanne reicht von 11 bis 73 Jahre, zumeist sind allerdings jüngere Patientinnen mit einem durchschnittlichen Lebensalter von 30 Jahren betroffen (Kosmahl et al., 2005). Der Tumor tritt solitär auf. Er ist weder mit anderen Tumoren, endokrinen Abnormalitäten noch mit paraneoplastischen Syndromen assoziiert (Klimstra et al., 2000). Er ist oft asymptomatisch oder verursacht lediglich eine unspezifische klinische Symptomatik, bestehend aus Bauchschmerz, Übelkeit und Erbrechen. Auch wenn er im Pankreaskopf lokalisiert ist, kommt es nur sehr selten zu einem Ikterus. In den meisten Fällen imponiert die SPN als zystischer Zufallsbefund in der Bildgebung (ebd.).

Eine Metastasierung ist die Ausnahme; wenn sie auftritt, dann betrifft sie hauptsächlich die Leber und das Peritoneum. Lymphknotenmetastasen sind selten (Odze et al., 2004). Selbst bei ausgeprägter Streuung des Tumors leben die Patienten lange ohne einschränkende klinische Symptomatik (ebd.).

1.2 Pathologie

Makroskopisch stellt sich die SPN als runder, meist glatt begrenzter Tumor mit einer durchschnittlichen Größe von 7 cm (2-17 cm) dar (Kosmahl et al., 2005). Sie kann in jeder Region des Pankreas auftreten, ihm anhängen oder auch extrapankreatisch entstehen. In den meisten Fällen ist sie von einer bindegewebigen Pseudokapsel umgeben und lässt sich somit gut operativ entfernen. Die Schnittfläche ist bunt, von grau-weiß über hellbraun bis hämorrhagisch. Abhängig von der Größe entwickelt die SPN zentrale, durch hämorrhagische Nekrosen entstandene Zysten, weshalb sie makroskopisch mit Hämatomen und Pseudozysten verwechselt werden kann.

Die Mikroskopie der SPN ist vielfältig (s. Kapitel 3.2). Die Kombination aus soliden, pseudopapillären und/oder hämorrhagisch-pseudozystischen Komponenten führte zu einer immensen Namensvielfalt des Tumors in der Vergangenheit: Die Erstbeschreiberin Virginia Frantz beschrieb den Tumor als papilläre Neoplasie und gab ihm den Namen Frantz-Tumor (Frantz, 1959). Spätere Namensvorschläge bleiben deskriptiv: Adenokarzinom des Kindes, Zystadenokarzinom, solid und zystischer Azinuszelltumor, solide und papilläre epitheliale Neolasie oder papillär-zystischer Tumor (Ozde et al., 2004).

Die SPN weist ein einmaliges immunhistochemisches Profil auf. Diskutiert wurden bisher eine Herkunft aus neuroendokrinem (Notohara et al., 2000; Kallichandra et al., 2006), pankreas-duktalem (Kosmahl et al., 2000; Geers et al., 2006), zentroazinärem (Kallichandra et al., 2006) oder ovariellen Gewebe (Geers et al., 2006). Vielfältige Zusammenhänge zwischen intrazellulären Signalwegen, Histomorphologie und der Expression unterschiedlicher Markerproteine konnten hergestellt werden (Tang et al., 2007).

Die Hauptdifferentialdiagnose zur SPN für den geübten Pathologen sind Tumore neuroendokrinen Ursprungs, für die zystische SPN die Pseudozyste und andere zystische Tumore. Alle anderen Pankreastumoren lassen sich immunhistochemisch und morphologisch relativ gut unterscheiden.

1.3 Ziel der Arbeit und Auswahl der Antikörper

Bisher sind Ursache und Herkunft des Tumors unklar. Aufgrund neuer Studien wird eine Entstehung der SPN aus Progenitorzellen des Pankreas diskutiert (s. Kapitel 4.2). Daher wollen wir unser Augenmerk auf diese Möglichkeit richten und mittels immunhistochemischer Markerexpression ein Stück näher an die Identifikation der Ursprungszelle herankommen.

Vorangegangene Studien belegen die Expression von Nestin, einem Marker für multipotente, sich (endokrin) differenzierende Zellen (Ohike et al., 2007; Bonner-Weir et al., 2008), und c-kit, einem Tyrosinkinase-Rezeptor, der in der Zelldifferenzierung und -proliferation eine Rolle spielt (Ohike et al., 2007). Diese Ergebnisse gilt es zu reproduzieren oder zu widerlegen.

PDX-1 ist ein Transkriptionsfaktor (TF), der bei Entstehung und Funktion endokrinen Pankreasgewebes essentiell ist (Melloul, 2004; Galliche et al., 2008). PAX-6 und Neurogenin 3 nehmen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des intestinalen Endokriniums allgemein und des endokrinen Pankreas im Speziellen ein (vgl. 4.4.2 und 4.4.3). Wenn diese Marker für endokrine Differenzierung in der SPN nachgewiesen werden

könnten, ließe das Schlüsse auf eine Herkunft aus pankreatischen bzw. endokrinen Progenitorzellen zu.

Islet-1 ist als TF für die endokrine Differenzierung von Bedeutung (Rowan-Hull et al., 2009), kann daher als endokriner Tumormarker verwendet werden (Schmitt et al., 2008) und somit eventuell weitere Hinweise auf die vermutete Tumorherkunft geben.

Eine Färbung mit CDX-2-Antikörpern soll eine mögliche Herkunft der SPN aus dem gastrointestinalen Endokrinium ausschließen (s. Kapitel 4.5.1).

Um Ergebnisse institutseigener Forschungen weiter zu belegen (Wagner, 2004), soll ein möglicher Unterschied in der Proteinexpression zwischen der SPN männlicher und weiblicher Patienten untersucht und eine Herkunft aus geschlechtsspezifischen (ovariellen) Zellen verneint werden.

Bei der immunhistochemischen Auswertung maligner und benigner SPN sucht man nach eventuellen Expressionsunterschieden, also nach neuen Möglichkeiten, eine prognostische Aussage über Invasions- und Metastasierungsverhalten des Tumors zu ermöglichen.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Lassen sich die genannten Proteine in der SPN nachweisen?
2. Gibt es Unterschiede zwischen den Geschlechtern und/oder zwischen sich benigne oder maligne verhaltenden SPN?
3. Kann man die SPN auf Grund immunhistochemischer Gemeinsamkeiten einem (endokrinen) Vorläufergewebe des Pankreas zuordnen?
4. Kann man daraus auf den Ursprung der SPN schließen?

2. Material und Methode

2.1 Material

2.1.1 Herkunft des Untersuchungsguts

Das untersuchte Probenmaterial entstammt dem Konsiliararchiv des Instituts für Pathologie sowie dem Kindertumorarchiv der Sektion für Paidopathologie der Universität Kiel.

Die genutzten Tissue-Microarrays® (TMA) lagen zu Beginn der Untersuchungen bereits vor und sind für ähnliche immunhistochemische Forschungen benutzt worden. Bei der Herstellung wurden ursprünglich 100 Fälle mit der gesicherten Diagnose SPN aus den Jahren 1979 bis 2006 ausgesucht und wie im Folgenden beschrieben bearbeitet. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Tumorentfernung zwischen 11 und 71 Jahren alt. Es ergibt sich ein durchschnittliches Operationsalter von 31 Jahren.

Aus den Angaben des Archivs war zu entnehmen, dass 69 Patienten weiblichen (88,5%) und 9 männlichen Geschlechts waren. Einige Patientendaten fehlen. Die Zusammensetzung des Fallkollektivs spiegelt die geschlechtsspezifische Inzidenz der SPN wieder.

2.1.2 Herstellung der Tissue-Microarrays®

Zur Herstellung der Tissue-Microarrays® (TMA) müssen zunächst geeignete Areale der vorliegenden, in Paraffin eingebetteten Gewebe gefunden werden: Sie sollen repräsentativ, gut erhalten und ohne Artefakte sein. Zu diesem Zweck werden Präparatschnitte hergestellt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die geeigneten Tumorbereiche werden markiert und die Objektträger beiseite gelegt.

Des Weiteren müssen die sogenannten Akzeptor-Blöcke, die im weiteren Verlauf die ca. 200 ausgesuchten Tumoreareale und die Kontrollgewebe aufnehmen sollen, hergestellt werden: Im Micro-Arrayer® (Personal Tissue Arrayer I, Alphamatrix, Deutschland) stanzt man manuell aus „leeren“ Paraffinblöcken in je sechs Zehnerreihen untereinander zylindrische Hohlräume. Diese Prozedur wird an fünf Paraffinblöcken durchgeführt.

Aus den eingebetteten SPN-Geweben, den sogenannten Donor-Blöcken, werden Zylinder gestanzt, deren Größe das Volumen der Hohlräume in den Akzeptor-Blöcken etwas übersteigt. Die Donor-Blöcke müssen eine Mindestdicke von 1 mm aufweisen. Sie werden in

den Micro-Arrayer® gespannt, die repräsentativen Tumoreareale mithilfe des aufgelegten HE-Schnittes aufgesucht und ausgestanzt. Im Anschluss werden sie in die dafür vorgesehenen Hohlräume im Akzeptor-Block überführt. Der geringfügige Größenunterschied bedingt ein besseres Anliegen der Gewebeprobe an die Innenseite des Hohlraums.

Um einen nachhaltigen Verbund zwischen Gewebe-Zylinder und Akzeptor-Block zu gewährleisten, muss der gesamte Block für 15 min im 37°C warmen Brutschrank angeschmolzen und danach an der Raumluft wieder abgekühlt werden.

In fünf Paraffinblöcken sind nun ca. 200 SPN-Gewebeproben untergebracht. Außerdem finden sich in jedem Block zusätzlich zwei Gewebeproben aus der Tonsille, eine Colon-Carcinom-Stanze und mindestens zwei reguläre Pankreasgewebeproben, die aus den nicht vom Tumor befallenen Operationsresektaten stammen.

In Abhängigkeit von der Schichtdicke können laut Herstellerangaben 150-300 Schnitte aus solch einem Block gefertigt werden. Jeder der 100 SPN-Fälle wird in unserem Fall mindestens durch zwei, maximal mit vier Gewebestanden in den TMAs® repräsentiert, so dass bei Defekten, die im Rahmen der weiteren Behandlung der Schnitte entstehen können, mit größerer Wahrscheinlichkeit mindestens einer zur immunhistochemischen Befundung erhalten bleibt.

Mangelnder Verbund zwischen Probe und Akzeptor-Block oder Artefaktbildung bei der immunhistochemischen Färbung bedingen die Verminderung der auswertbaren Fallzahl auf 91 Fälle.

2.1.3 Vorbereitungen zu immunhistochemischen Färbung

Zur Herstellung der Schnitte werden die Paraffinblöcke für 15 min auf eine -20°C kalte Platte (COP 20, Medite, Deutschland) gelegt. So erhalten sie die für den Schneidevorgang nötige Festigkeit. Mithilfe des Rotationsmikrotoms RM 2145 (Leica, Deutschland) werden 3 µm dicke Schnitte angefertigt, die unter Zuhilfenahme von Pinzette und Pinsel von der Klinge entfernt und in ein 50°C warmes Wasserbad (TFB 45, Medite) gegeben werden. Idealerweise strecken sich die Schnitte dort faltenlos und können dann auf einen Objektträger (Menzel, Deutschland) übertragen werden. Diese müssen beschichtet sein, um zu verhindern, dass die Schnitte sich bei der weiteren Behandlung lösen.

Die Objektträger werden in das Wasserbad getaucht und unter die Schnitte gehoben. Beim Heben über die Wasseroberfläche werden die Schnitte mitgezogen. Überschüssige Flüssigkeit wird abgetrocknet oder verdunstet bei der darauf folgenden nächtlichen Lagerung im 37°C-warmen Brutschrank (Memmert, Deutschland).

Die langsame Trocknung bietet den Vorteil, dass die immunhistochemische Färbung nicht unmittelbar erfolgen muss, das Präparat also noch geschützt im Paraffinmantel auf dem Objektträger lagert und zu einem späteren Zeitpunkt weiterbearbeitet werden kann.

2.1.4 Verwendete Antikörper und Detektionssysteme

Die verwendeten Antikörper bzw. ihr Ziel-Antigen werden in Tabelle 1 bezüglich ihrer Herkunft, ihrer Verdünnung, der Kontrollgewebe und der verwendeten Detektionssystemen näher charakterisiert.

Nach Entparaffinierung im institutseigenen Xylol und Überführung ins wässrige Milieu über Alkohole verschiedener Konzentration (J.T.Baker, selbst verdünnt) werden die Schnitte zur Demaskierung der Antigene im HST-Pascal-Dampfkocher (DAKO, Kalifornien) vorbehandelt. Aus Tabelle 1 ist zu entnehmen, dass zwei verschiedene Kochpuffer benutzt werden: Zum Kochen bei pH 7,8 wird ein Puffer verwendet, der auf Basis der 10fach-konzentrierten TEC-Stammlösung hergestellt wird. Diese enthält 2,5 g TRIS-Base (Sigma, USA), 5 g EDTA (Merck, Deutschland) und 3 g Trinatriumzitat (Merck) auf einen Liter Aqua destillata (DeltaSelect, Deutschland). Titriert wird die Lösung mit Zitratpuffer, bestehend aus 10,5 g Zitronensäure (Merck) in 500 ml Aqua dest. Zum Kochen bei pH 6 benutzt man einen fertig hergestellten Puffer von der Firma DAKO.

Tabelle 1: Primärantikörper und ihre Charakteristika

Zielantigen		Hersteller	Herkunft	Verdünnung	Puffer	Kontrollgewebe	Färbemethode
c-kit	polyklonal	DAKO	Kaninchen	1zu100	pH 7,8	Mastzellen , GIST	Histofine
Nestin	monoklonal	Santa Cruz	Maus	1zu100	pH 7,8	Gliomazellen	Histofine
PAX 6	monoklonal	SYSY	Maus	1zu200	pH 6	Pankreas-Inseln	UltraVision
PDX-1	monoklonal	R&D	Maus	1zu200	pH 6	Pankreas-Inseln	Histofine
Neurogenin 3	monoklonal	Hagedorn	Maus	1zu500	pH 7,8	Pankreas	Histofine
Islet-1	monoklonal	ColumbiaUni	Maus	1zu50	pH 7,8	Pankreas-Inseln	Histofine
CDX-2	monoklonal	Visionbio	Maus	1zu20	pH 6	Kolonkarzinom	Histofine

Die endogen im Präparat enthaltene Peroxidase wird durch Eintauchen in eine Lösung aus 5 ml 30%igem H_2O_2 (Merck) in 250 ml Methanol (J.T.Baker) verbraucht.

Der verwendete Waschpuffer besteht aus 9 g TRIS-Base, 68 g TRIS-HCl (Sigma) und 87,5 g NaCl (J.T. Baker, Niederlande) auf 10 l institutseigenem Aqua dest.

Nach Inkubation mit den oben genannten Primärantikörpern wird mit der Histofine®Simple-Stain-MAXPO-Multi-Methode (Nichirei Biosciences, Japan) ein universelles Immun-Peroxidase-Polymer angehängt, das sowohl Kaninchen- als auch Maus-Antikörper erkennt. Im Histofine®Reagenz wird das Polymer in 3-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS-Puffer) gelagert. Außerdem enthält die Lösung einen Stabilisator und einen antimikrobiellen Zusatz.

Im Falle des PAX6-Antigens fügt man nach Inkubation mit dem Primärantikörper einen Enhancer-Schritt ein: Unter Verwendung des UltraVisions-LP-Detektionssystems® (Thermo Scientific) vervielfacht man die Bindungsstellen des Peroxidase-Polymers durch Hinzufügen eines Primärantikörper-Enhancers vor Inkubation mit dem ebenfalls im Kit enthaltenen HRP-Polymer, das dem genannten Histofine® entspricht. Man ruft so eine verstärkte Umsetzung des Farbstoffes hervor.

Das Substrat, das vom Peroxidase-Polymer umgesetzt werden soll, wird in Form des DAB-Substrat-Kits (Vector Laboratories, Kalifornien) zugefügt, das alle nötigen Reagenzien enthält, inklusive H_2O_2 , Puffer mit pH 7,5 und des Farbstoffs 3,3'-Diaminobenzidin (DAB).

Die auf den Objektträger pipettierte Menge ist bei allen Reagenzien gleich: Man verwendet immer 200 μl , um der Größe des Präparates gerecht zu werden.

Zusätzlich zu den immunhistochemischen Färbeverfahren wird mit der Hämalaunlösung von Merck gegengefärbt. Die Hämalaunlösung wird nach institutseigenem Duktus vor Verwendung 1:4 mit Aqua dest verdünnt, um die Kernfärbung nicht zu stark ausfallen zu lassen.

2.2 Methode

2.2.1 Die Immunperoxidasefärbung

Das Verfahren beruht auf der Konjugation eines Antikörpers gegen ein Antigen im Präparat mit dem Enzym Peroxidase, das einen Farbstoff umsetzt und so das Vorkommen des nachzuweisenden Antigens im lichtmikroskopischen Bild sichtbar macht: indirekte Immunhistochemie.

Die Antikörper gegen das Primärantigen im Gewebe stammen in unserem Fall sowohl aus dem Serum mit dem Antigen „geimpfter“ Kaninchen (polyklonal), als auch aus in Kulturmedien wachsenden Hybridomzellen, die soweit möglich isoliert wurden, so dass die Antikörperproduktion einer einzigen Zellreihe entspringt (monoklonal).

Bevor die auf den Objektträgern lagernden Präparate eingefärbt werden können, bedarf es der Entparaffinierung durch ein 2x 15-minütiges Bad in Xylol. Danach werden die Schnitte durch das Eintauchen zunächst in ein 1:1 Gemisch aus Xylol und 100%igem Alkohol, dann in reinen 100%igen Alkohol und schließlich in Lösungen absteigender Alkoholkonzentration (2x 96%, 2x70%) rehydriert.

Die im Gewebe vorhandenen Antigene liegen zu diesem Zeitpunkt noch nicht frei, die Eiweiße sind teilweise denaturiert. Zur Demaskierung der Antigene werden die Präparate für eine Minute bei 125°C im beschriebenen Dampfkocher vorbehandelt. Die mit Antikörpern gegen PAX-6, PDX-1 und CDX-2 zu behandelnden Schnitte werden im pH 6-Kochpuffer, die mit Antikörpern gegen c-kit, Nestin, Neurogenin 3 und Islet-1 im Kochpuffer mit pH 7,8 gekocht. Insgesamt dauert der Kochvorgang ca. 45 Minuten, da durch langsames Erhitzen und Abkühlen die Schnitte geschont werden sollen.

Im Anschluss daran bereitet man die Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe auf die Methanollösung vor, in der die Schnitte 15 Minuten inkubieren, um die im Gewebe enthaltene endogene Peroxidase zu blockieren. Auf diese Weise versucht man die ungewünschte Hintergrundfärbung durch die nicht Antikörper-assoziierte Peroxidase zu verhindern.

Danach werden die Präparate wieder in die Alkohollösungen mit absteigender Konzentration getaucht und mit Aqua dest gespült. Das Waschen im Anschluss erfolgt im beschriebenen TRIS-Waschpuffer.

Nachdem überschüssiger Waschpuffer abgetupft wurde, um eine Verdünnung der folgenden Reagenzien zu verhindern, werden die Primärantikörper in den in Tabelle 1 genannten Verdünnungen und den in den Anwendungsbeschreibungen der jeweiligen Antikörper genannten Mengen aufgetragen. Die Inkubationszeit beträgt 30 Minuten.

Nach dreimaligem Spülen mit dem Waschpuffer gibt man auf die Objektträger die Histofine®-Lösung, die das Polymer aus Sekundärantikörper und Peroxidase enthält. Nach weiteren 30 Minuten Wartezeit wird erneut drei Male gespült, um nicht gebundene Polymere aus dem Gewebe zu entfernen.

Die für die PAX-6-Färbung benutzte UltraVision®-Enhancer-Methode soll die Bindungsstellen des Peroxidase-Polymers vervielfachen und so die Anfärbbarkeit des Präparates verstärken. Sie erfordert eine etwas andere Herangehensweise: Nach dem Primärantikörper wird zunächst das Enhancermolekül hinzugefügt und im Anschluss das HRP-Polymer. Dabei

sollte man eine unnötige Lichtexposition des photosensitiven HRP vermeiden. Man lässt gemäß Anleitung inkubieren und spült die Präparate zwischen allen Schritten im Waschpuffer.

Zu diesem Zeitpunkt ist an den Primärantikörper der Sekundärantikörper mit der Peroxidase angehängt, sei es mittels Histofine® oder HRP-Molekül. Man verfährt weiter wie folgt:

Erst kurz vor Verwendung kann der DAB-Farbstoff gemäß Anleitung angesetzt werden. Pro ml Aqua dest werden 20µl Puffer, 20µl DAB und H₂O₂ benötigt. Mit der Zusetzung des Chromogens findet die Farbreaktion statt. Sobald man das Diaminobenzidin auf die Objektträger pipettiert hat, beginnt die Peroxidase das Substrat umzusetzen und man kann, je nach Umfang der Färbung, mit bloßem Auge eine Bräunung beobachten, wo das Enzym im Gewebe gebunden ist.

Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten werden die Präparate mit Aqua dest gespült und mit Hämalan gegengefärbt. Nach einer Minute in der Küvette mit Hämalanlösung müssen die Präparate für drei Minuten unter fließendes Leitungswasser gehalten werden. Die Verwendung von ionenhaltigem Leitungswasser ist hier für das korrekte „Bläuen“ der Kerne notwendig.

Über eine aufsteigende Alkoholreihe, an deren Ende wieder die 100%ige Xylol-Lösung steht, werden die Präparate auf das Eindecken vorbereitet. Dieses geschieht mit Hilfe des Xylol-löslichen Pertex®Eindeckmediums (Medite). Am Ende setzt man die Deckgläschen (Menzel) auf. Jetzt können die Präparate unter dem Lichtmikroskop beurteilt werden.

2.2.2 Mikroskopische Auswertung

Die TMAs® werden am Rande des Deckplättchens mit Buchstaben und Zahlen beschriftet, so dass eine Zuordnung der einzelnen Präparate im Sinne eines Schachbrett-Koordinatensystems möglich wird.

Unter dem Lichtmikroskop (LM) Axioskop 50 (Zeiss, Deutschland) werden die Präparate nacheinander befundet und die Ergebnisse in ein Diagramm eingetragen. Die genutzten Vergrößerungen sind Tabelle 2 zu entnehmen. Grundsätzlich wird mit der geringsten Vergrößerung begonnen, um zunächst das Vorhandensein der Präparate zu überprüfen und sich einen ersten Eindruck von den gegebenen Farbintensitäten zu verschaffen. Nicht vorhandene, nur noch als dünner Rest vorhandene oder beim Färbevorgang zu sehr beschädigte Präparate werden aus dem Diagramm gestrichen und somit aus der Wertung genommen.

Tabelle 2: Okulare und Objektive

Okular	10x / 20	Neofluar, Zeiss
Objektive	5x / 0,15	Neofluar, Zeiss
	10x / 0,25	Achroplan, Zeiss
	20x / 0,45	Achroplan, Zeiss
	40x / 0,75	Neofluar, Zeiss

Von allen positiv gewerteten Präparaten wird ein Foto in 400facher Vergrößerung mit Hilfe der an das LM angeschlossenen DFC280-Filmkamera (Leica, Deutschland) geschossen und im Image Manager50®, ebenfalls von der Firma Leica, gesichtet.

Gewertet wird zum einen der Grad der Färbungsintensität und zum anderen die Anzahl der positiven Zellen im Präparat. Ersteres gibt man an unter Zuhilfenahme der Zeichen

(+) für schwach positiv,

(++) für mäßig positiv,

(+++) für stark positiv und letztendlich

(-) für negativ, das heißt ohne Anfärbung.

Stark positiv ist hierbei definiert als eine mit den Kontrollgeweben vergleichbare dunkelbraune Anfärbung. Im negativen Präparat ist lediglich die blaue Hämalaunfärbung zu sehen, sowie braune Färbungen extrazellulärer Matrix, von Hämatinablagerungen oder Artefakten. Je nach Vorkommen des Antigens – im Kern oder im Zytoplasma - wird nur die Färbung des jeweiligen Zellkompartimentes berücksichtigt. Bräunungen anderer Kompartimente gehen auf Reaktionen des Chromogens mit nicht vollständig geblockter endogen im Gewebe enthaltener Peroxidase zurück und können deshalb nicht als positiver immunhistochemischer Nachweis gelten. Gewebe mit einem Anteil gefärbter Zellen unter 5% gelten ebenfalls als negativ (Cut-off: 5%).

Die Farbintensität wird ausschließlich anhand des lichtmikroskopischen Erscheinungsbildes und im Vergleich der einzelnen Präparate untereinander beurteilt.

Die Anzahl der im Präparat als positiv gewerteten Zellen wird unter Auswertung sowohl der Fotos als auch des sich im LM darstellenden Bildes ermittelt: Bei schwachen Färbungen ist es sinnvoll, durch digitale Verstärkung der Farbintensitäten die Zuordnung einzelner Zellen zu „braun“ und „blau“ zu erleichtern.

Dazu wird ein exemplarischer Präparatsteil gewählt und digital abfotografiert. Im Programm Scion Image® (Windows, USA) können die Zellen mit Hilfe eines Zählmodus markiert

werden. So kann man das Verhältnis von gefärbten zu allen im Foto sichtbaren Zellen ermitteln. Das Ergebnis der Stichprobe wird mit dem Anteil der positiven Zellen im Gesamtgewebe abgeglichen und als auf Zehnerschritte gerundete Prozentangabe in das Diagramm übertragen. Im Verlauf der Auswertungen korrelierten geschätzte positive Gewebsanteile im exemplarischen Ausschnitt gut mit dem Anteil im Gesamtpräparat, so dass nur noch bei sehr schwachen und disseminierten Färbungen, bei Färbungen von Einzellzellen im Gewebe oder zur regelmäßigen untersucherinternen Validitätsprüfung der Zählmodus zum Einsatz kam.

Bei der Bestimmung des Prozentsatzes gefärbter Zellen wird das umgebende Bindegewebe nicht mitgewertet. Ebenso wenig werden Erythrozyten, Hämatinablagerungen, gefaltete Areale oder positive extrazelluläre Matrix berücksichtigt. Als Unterscheidungsmerkmal dient hierbei das Sichten eines Zellkerns.

Wenn alle Präparate eines TMA® ausgewertet sind, vergleicht man die Fotos der als positiv beschriebenen Präparate am Computerbildschirm im genannten Image Manager®. Durch das direkte Nebeneinanderstellen der Bilder kann man die Schätzungen der Menge gefärbter Zellen gegebenenfalls korrigieren.

Um die interne Validität noch weiter zu erhöhen, steht am Ende der Auswertung einer Antigenfärbungsreihe die Sichtung der Gesamt-TMA® in geringere Vergrößerung (100x bzw. 200x). Dabei sollen die in den Diagrammen festgehaltenen Werte zu Färbungsintensität und Anzahl der gefärbten Zellen noch einmal im Vergleich miteinander kontrolliert werden.

Insgesamt werden auf diese Weise alle Präparate mindestens drei Male gesichtet und ausgewertet.

2.2.3 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Prozentsätze, Mediane und Durchschnittswerte \pm Standardabweichungen angegeben. Die Signifikanz wird mit dem t-Test ermittelt und als p-Wert angegeben ($p < 0,05$ ist signifikant). Bei der Auswertung der Färbungsunterschiede zwischen den Geschlechtern wird auf den Prozentanteil gefärbter Zellen im Präparat zurückgegriffen. Die geringe Anzahl an malignen SPN-Fällen (2) macht einen signifikanten Anfärbbarkeits-Unterschied zwischen benignen und malignen Tumoren schon im Vorneherein rechnerisch unwahrscheinlich. Daher wird hier auf die Berechnung des p-Wertes verzichtet.

3. Ergebnisse

3.1 Klinische Daten

Nach Abzug der bei den immunhistochemischen Färbemethoden und den dazugehörigen Vorbereitungsschritten zerstörten Gewebeproben können 91 Fälle mit der gesicherten Diagnose SPN ausgewertet werden. Zu vier Fällen sind keine klinischen Daten auffindbar, weshalb diese zwar in die Gesamtwertung, nicht aber in die Differentialanalyse eingehen können; weder von Proteinexpression und Geschlecht noch von Proteinexpression und Dignität. Von den genannten 87 Fällen sind 12 (13,8%) männlichen und 75 (86,2%) weiblichen Geschlechts. 84 SPN wurden vormalig als benigne eingestuft (96, 6%). Dazu wird auch der Fall gezählt, der im pathologischen Gutachten als „benigne, potentiell maligne“ eingestuft worden war. Ebenso gehört in diese Gruppe das SPN-Rezidiv.

Zwei Fälle (2,3%) sind maligne: einer mit Invasion ins Duodenum, der andere mit in der laparotomischen Exploration gesicherten Lebermetastasen.

Ein weiterer Archivfall wurde im Vorfeld als „benigne, aber invasiv“ beschrieben, wird deshalb in der Differentialanalyse gesondert aufgeführt.

Die jüngste Patientin der Liste mit SPN ist 10 Jahre alt, der älteste 71. Es ergibt sich ein medianes Erkrankungsalter von 29 Jahren.

Die durchschnittliche Tumorgröße, das heißt der Mittelwert der jeweils größten Parameter, beträgt 7,00 cm. Bei der Einzelbetrachtung der Geschlechter ergibt sich für Frauen bzw. Mädchen eine durchschnittliche Größe von 7,19 cm und für Männer 6,13 cm. Insgesamt können hier mangels klinischer Daten nur 62 Fälle in die Berechnung mit einbezogen werden.

3.2 Histomorphologie

Die mikroskopische Morphologie stellt sich in den TMA-Stanzpräparaten dar, wie in der Fachliteratur beschrieben (vgl. Kosmahl et al., 2005; Odze et al., 2004):

Es herrscht eine Kombination aus soliden, pseudopapillären und hämorrhagisch-pseudozystischen Gewebsarealen vor. In den einzelnen Stanzpräparaten kann man zumeist nur eine der drei Morphologien der SPN ausmachen, da immer nur ein sehr kleiner Ausschnitt des Tumorgewebes zu sehen ist. Einige Proben sind aufgrund ihrer lockeren, pseudopapillären Struktur auseinandergerissen oder gar nicht mehr auf den Objektträgern vorhanden. Daneben sieht man in der Gesamtstruktur wellenartig angeordnete Zellverbände

oder baumkronenartig von Gefäßanschnitten sich verzweigende Zellgruppen. Bindegewebsstraßen durchziehen die Präparate und umschließen dickwandige Gefäße. Die Vaskularisation allgemein ist in den verschiedenen Tumorschnitten unterschiedlich stark ausgebildet. Häufig findet man Einblutungen ins Gewebe bzw. Teile von mit Hämosiderinkörnchen und/oder Erythrozyten gefüllten pseudozystischen Hohlräumen.

Die Tumorzellen sind monomorph, besitzen runde bis ovale Kerne, teils mit leichten Einkerbungen. In einigen Schnitten imponieren die Kerne allerdings kleiner und dichter als in anderen, in denen der Nukleolus gut erkennbar ist (vgl. Abb. 1-4 im Anhang).

In einigen TMAs® kann man eine Infiltration ins normale Pankreasgewebe beobachten, mit von Tumorgewebe umflossenen Inseln, Gängen und Azini.

3.3 Immunhistochemische Auswertung

Die immunhistochemische Auswertung gestaltet sich in vielerlei Hinsicht als nicht eindeutig. Viele TMA-Schnitte sind falsch positiv: Gewebequetschungen, -dopplungen und -faltungen sowie Hämosiderin und extrazellulär liegende Globuli rufen eine scheinbare Antigen-Antikörper-Reaktion hervor. Ebenso gibt es viele Proben, in denen eine ausgeprägte Hintergrundfärbung gefunden werden kann. Auch Einblutungen „bräunen“ das Gewebe durch die ungenügend geblockte endogene Peroxidase der Erythrozyten.

Das Cut-off-Level beträgt 5%.

Pankreaskontrollgewebe: In vier von zwölf TMA-Schnitten sind keine Inseln mit angeschnitten. Auf einigen Objektträgern haben sich die Pankreas-Stanzen herausgelöst und sind nicht mehr zu beurteilen. Auf Objektträger III der PDX-1-Färbung sind Zeichen einer unzureichenden Diffusion der Färbereagenzien durch alle Gewebe zu finden, weshalb hier die Pankreasschnitte aus der Bewertung herausgenommen sind (vgl. Kap. 4.1). Aufgrund all dieser Ausfälle differiert die Anzahl der ausgewerteten Fälle zwischen endo- und exokrinem Pankreasgewebe.

Tabelle 3.1 Übersicht der immunhistochemischen Auswertung

Antigen	Total	(-)	(+)	(++)	(+++)	Total positiv	% positiv
c-kit	91	45	35	6	5	46	50,5
Nestin	91	44	37	10	0	47	51,6
PAX 6	91	73	14	3	1	18	19,8
NGN 3	91	81	6	4	0	10	10,9
PDX-1	91	90	1	0	0	1	1,1
ISL-1	91	91	0	0	0	0	0
CDX-2	91	90	0	1	0	1	1,1

3.3.1 c-kit

In der c-kit-Färbung scheint nicht immer das gesamte Zytoplasma gefärbt, sondern oft nur einzelne Areale, so dass der Eindruck entsteht, die Färbung konfluieren zwischen den Zellen. Es können vier verschiedene Arten der Verteilung immunpositiver Zellen beobachtet werden:

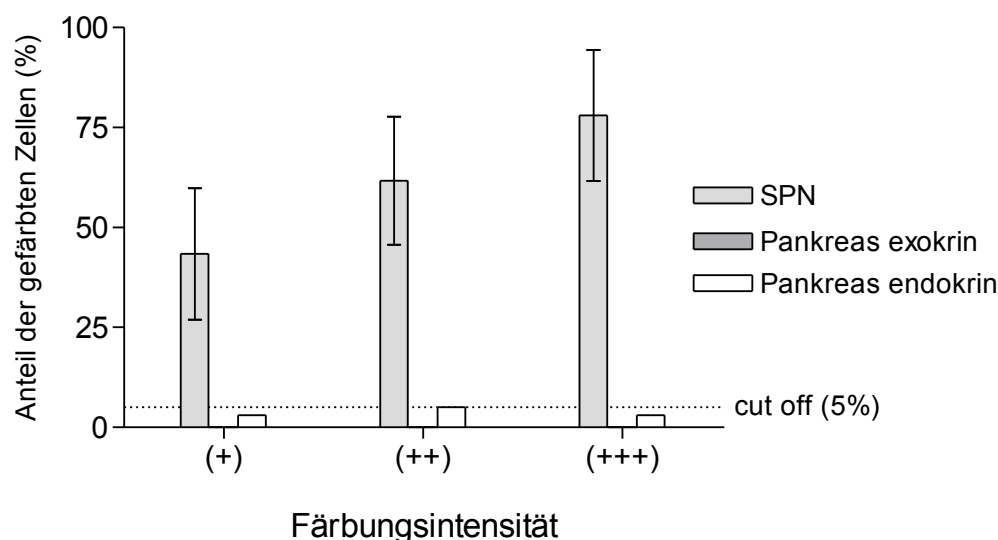
1. deutlich positive im gesamten Schnitt vorkommende Einzelzellen,
2. gefärbte Zellgruppen von 10-20 Zellen (meist <5%, deshalb negativ),
3. palisadenartig um die Bindegewebsstraßen herum oder baumkronenartig von bindegewebig umfassten Gefäßanschnitten ausgehende deutlich immunpositive Zellverbände (s. Anhang Abb.1),
4. eine ubiquitäre Plasmafärbung aller Zellen des Schnittes.

Von allen 91 ausgewerteten Fällen sind insgesamt 46 (50,5%) immunpositiv, davon die meisten, nämlich 35, schwach positiv.

Wenn man die Geschlechter getrennt betrachtet, findet man bei den männlichen Patienten 8 (33,3%) positive Tumoren und bei den weiblichen 41 (54,7%). Ein signifikanter Unterschied kann nicht festgestellt werden ($p=0,22$).

44 (52,4%) der benignen Tumoren sind c-kit-positiv, die beiden malignen Fälle negativ und der benigne, aber invasive Tumor mäßig positiv (s. Anhang).

Abb. 3.2 c-kit: Verhältnis von Färbungsintensität und Anteil durchschnittlich gefärbter Zellen im Präparat in %



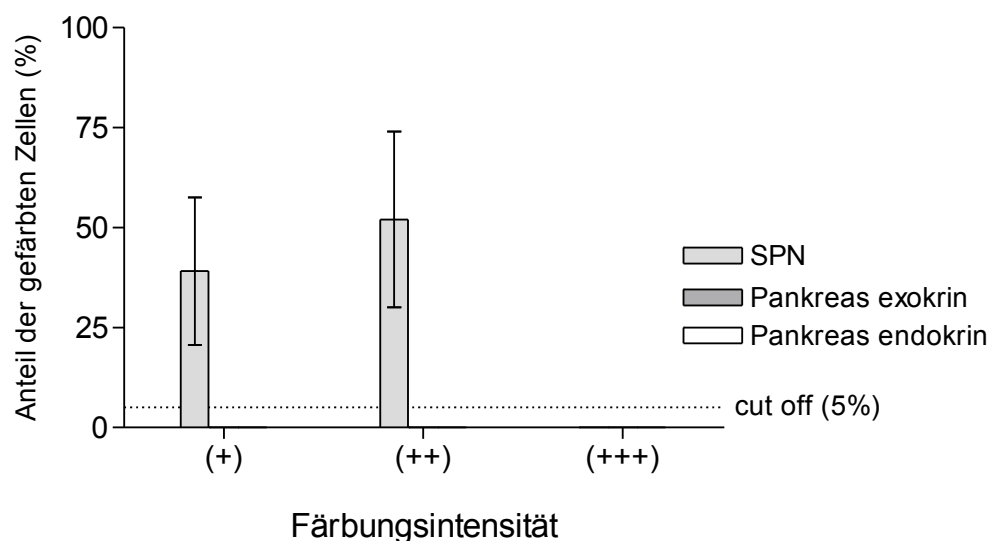
Farbintensität und Anteil der gefärbten Zellen: In den schwach positiven Schnitten kann man durchschnittlich $43,4 \pm 16,4\%$ aller Zellen gefärbt finden. Bei den mäßig positiven sind es $61,7 \pm 16,0\%$ und bei den stark positiven $78,0 \pm 16,4\%$. Je intensiver die Schnitte immunpositiv sind, desto mehr Zellen sind anteilig gefärbt (s. Tab 3.2).

Pankreaskontrollgewebe: Die Auswertung der Pankreasproben erbringt keine endokrine Anfärbbarkeit. Von den exokrinen Gewebeschnitten ist einer mäßig positiv (8,3%) und zwar anteilig mit $5 \pm 0\%$ der sichtbaren Zellen. Vier weitere Schnitte weisen eine mäßige bis starke Färbung auf, allerdings beläuft sich der Anteil der einzeln im Gewebe liegenden Zellen unter 5%, so dass sie als negativ gelten.

3.3.2 Nestin

Die Nestinfärbung ist wie die c-kit-Färbung eine zytoplasmatische und auch in der Verteilung der immunpositiven Gewebsareale dieser ähnlich: Vor allem um die Bindegewebsstraßen finden sich positive Zellverbände oder auch rund um Anschnitte von Gefäßen (s. Anhang Abb.2). Eine deutliche, stark positive, hier nicht mitzuwertende Anfärbung der Gefäßendothelien ist vorhanden. Das Vorkommen von positiven Einzelzellen oder kleinen immunpositiven Zellgruppen wird kaum beobachtet. Die Färbung geht oft einher mit einem kompakten Gewebesbild, in dem viele Kerne dicht gedrängt imponieren. Insgesamt sind 47 Fälle (51,6%) positiv. Aus der männlichen Patientengruppe stellen sich 33,3% der Tumore positiv und aus der weiblichen 56,0% positiv dar.

Abb. 3.3 Nestin: Verhältnis von Färbungsintensität und Anteil durchschnittlich gefärbter Zellen in %



Es ergibt sich kein signifikanter zwischengeschlechtlicher Unterschied ($p=0,12$). Die benignen Fälle sind zu 53,6% positiv, von den malignen keiner und der benige, aber invasive mit anteilig $90\pm 0\%$ aller sichtbaren Zellen schwach positiv.

Farbintensität und Anteil der gefärbten Zellen: Bei den schwach positiven Tumorproben sind durchschnittlich $39,1\pm 18,4\%$ der Zellen gefärbt und in der Gruppe der mäßig positiven $52,0\pm 22,0\%$. Es gibt keine stark positive Anfärbung.

Pankreaskontrollgewebe: Hier konnte keine Färbung beobachtet werden.

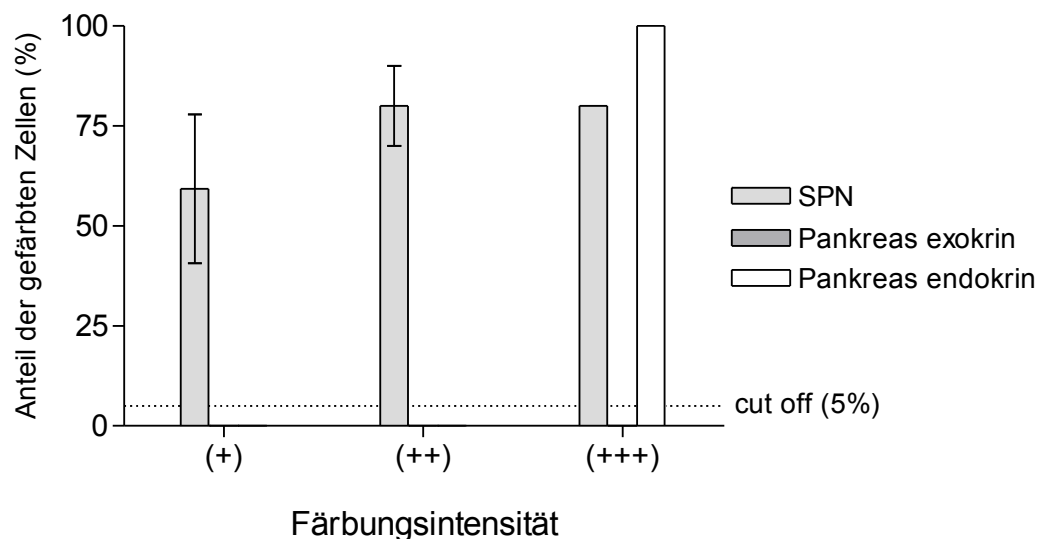
3.3.3 PAX-6

In der lichtmikroskopischen Befundung fällt keine besondere Zuordnung der immunpositiven Areale zu bestimmten Gewebekompartimenten auf. In 19,8% der Fälle kann eine Färbung beobachtet werden, meistens allerdings nur eine schwache.

Von den zwölf Tumoren aus männlichen Patienten sind 2 (16,7%) schwach positiv, von den 75 aus weiblichen 16 (21,3%) positiv. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern ($p=0,44$).

Die benignen SPN weisen in 17 Fällen eine Färbung auf, sind also zu 20,2% positiv. Der benige, aber invasive Tumor ist negativ. Einer der beiden malignen Fälle ist negativ, der andere mit $90\pm 0\%$ aller sich darstellenden Zellen mäßig positiv.

Abb. 3.4 PAX-6: Verhältnis von Färbungsintensität und Anteil durchschnittlich gefärbter Zellen in %



Farbintensität und Anteil der gefärbten Zellen: Im Allgemeinen ist die Farbintensität der befundeten SPN mit Ausnahme eines (weiblichen, benignen) Falles niemals so stark wie in der Pankreaskontrolle. Die schwach positiven Schnitte sind mit durchschnittlich $59,3 \pm 18,6\%$ der Zellen gefärbt, die mäßig positiven mit $80,0 \pm 10,0\%$ und der stark positive Schnitt mit anteilig $80,0 \pm 0\%$ aller gesichteten Zellen.

Pankreaskontrollgewebe: In allen zwölf ausgewerteten Pankreaskontrollen findet man $100 \pm 0\%$ aller Inselzellen stark positiv. Das exokrine Pankreas bleibt ungefärbt.

3.3.4 Neurogenin 3

In den Negativkontrollgeweben der Tonsille sind gefäß- und bindegewebssepten-assoziiert vereinzelt Zellen mit deutlich Plasmafärbung zu finden sowie Adipozyten, die als vakuolig-zytoplasmatisch gefärbte Zellen imponieren. Wirklich kernpositiv sind lediglich $10,9\%$ der Fälle (vgl. Anhang). Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tumoren männlicher und weiblicher Patienten ($p=0,87$). $10,7\%$ der benignen Fälle sind positiv und einer der beiden malignen.

Farbintensität und Anteil der gefärbten Zellen: Auch wenn die Zellen stärker angefärbt sind, bleibt die Anzahl der positiven Zellen im Präparat gleich. $36,6 \pm 9,4\%$ bei schwach positiven Präparaten und $35 \pm 15\%$ bei mäßig positiven.

Pankreaskontrollgewebe: Im endokrinen Pankreas findet man nur in einem von acht Schnitten eine mäßig positive Reaktion, im exokrinen dagegen in sechs von elf ($63,6\%$). Dabei sind durchschnittlich $17,5 \pm 5\%$ der Zellen in schwach positiven Schnitten gefärbt, in mäßig positiven $20 \pm 0\%$.

3.3.5 PDX-1

Auch in der PDX-1-Färbung gibt es viele falsch positive Präparate mit deutlicher Hintergrundfärbung (vgl. Abb. 3 im Anhang). Außerdem weist Objektträger III Zeichen einer Diffusionsstörung der Farbreagenz auf. Insgesamt ist nur ein Fall von 91 befundeten ($1,1\%$) schwach positiv, alle anderen negativ (s. Anhang). Der immunpositive Tumor ist einer Frau im Alter von 20 Jahren entnommen worden und ist einer der insgesamt zwei malignen SPN-Fälle. $70 \pm 0\%$ der Zellen im Präparat sind im Kern gefärbt.

Pankreaskontrollgewebe: In den Pankreasschnitten stellen sich in den Inseln durchschnittlich $87,5 \pm 12,6\%$ aller Zellen stark positiv dar. Die Färbung der exokrinen Gewebe umfasst ein Spektrum von schwach bis stark positiv. Anteilig sind zwischen $26,0 \pm 5,5\%$ und $33,0 \pm 5,8\%$ aller gesichteten Zellkerne gefärbt.

3.3.6 ISL-1

Kein SPN-Schnitt zeigt eine Reaktion auf den ISL-1-Antikörper.

Auffällig hingegen ist die hier von allen AK-Färbungen am deutlichsten zu beobachtende Hintergrundfärbung, die in fast allen Schnitten die Auswertbarkeit beeinträchtigt: Bei dunkler Färbung von Kern und Zytoplasma im Tumorgewebe bleiben die bindegewebigen Septen von der Färbung konstant ausgespart. Oftmals sind die Kerne nur dort positiv, wo auch das Zytoplasma deutlich gefärbt ist, so dass nicht von einer spezifischen Antikörperreaktion ausgegangen werden kann. So zum Beispiel werden periseptale oder perivaskuläre Anfärbungen hier nicht gewertet.

Pankreaskontrollgewebe: Alle zehn Insel-Anschnitte weisen eine 100%ige stark positive Reaktion auf den ISL-1-Antikörper auf. Das exokrine Gewebe ist als negativ beschrieben, da die hier in neun von zwölf Schnitten vorkommenden stark positiven Einzelzellen weniger als 5% der Gesamtzellmasse ausmachen.

3.3.7 CDX-2

Eine deutliche Reaktion der Extrazellulärmatrix ist zu beobachten. Das Epithel im Kolonkarzinom-Kontrollgewebe ist wie erwartet deutlich kern- und zytoplasmapositiv. Von den 91 untersuchten SPN-Fällen ist nur der benigne, aber invasive Sonderfall mit einem Anteil von 30% gefärbter Zellen im Präparatschnitt als mäßig positiv einzuordnen.

Pankreaskontrollgewebe: Das exokrine Pankreas zeigt sich mit insgesamt sieben Schnitten zu 63,6% positiv. Es sind durchschnittlich $8 \pm 3\%$ der Zellen schwach bzw. $10 \pm 0\%$ mäßig stark gefärbt.

4. Diskussion

4.1 Bewertung der Materialien und Methoden

Da die SPN eine nur sehr selten vorkommende Neoplasie des Pankreas ist, sind Gewebeproben für Forschungszwecke rar. Das Kieler Archiv stellt mit seiner hohen Fallzahl eine Besonderheit dar.

Die Herstellung der TMAs erlaubt die gleichzeitige Sichtung einer Vielzahl von Proben auf einem Objektträger, was die Vergleichbarkeit der Schnitte untereinander deutlich erleichtert. Weiterhin ist gewährleistet, dass alle Proben auf einem Objektträger unter exakt den gleichen Bedingungen gefärbt worden sind, da durch einmaliges Pipettieren der Antikörper und Chromogene zeitgleich bei bis zu 60 Schnitten die Farbreaktion gestartet wird. Dies erhöht die Vergleichbarkeit zusätzlich.

Ein Nachteil der TMA ist, dass durch vermehrte Manipulation bei der Bearbeitung der Gewebeproben oft Artefakte entstehen, die die Auswertung der Schnitte erschweren oder unmöglich machen.

Die Histofine®-Färbung und die UltraVision®-Methode sind im Alltag des Pathologischen Instituts regelmäßig verwendete Methoden, so dass auch von dieser Seite Fehler eher selten vorkommen.

Von jedem Fall lagen mehrere Schnitte vor. Die immunhistochemischen Reaktionen der Gewebeschnitte wurden zweimal blind ausgewertet und erst im Nachhinein den klinischen Fällen zugeordnet, um subjektive Fehlinterpretationen zu vermeiden.

4.2 Bisherige Versuche eine SPN-Zuordnung

Diverse Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie, Immunhistochemie, FISH oder vergleichender Genom-Hybridisierung unterscheiden diesen Tumor von allen anderen Neoplasien, konnten bisher jedoch nicht die genaue Herkunft der SPN klären.

Der azinäre Ursprung: Untersuchungen zum Fall einer 41-jährigen Frau (Kallichanda et al., 2006) ergaben, dass die histopathologisch nachgewiesene SPN in der immunhistochemischen Färbung negativ war für die Pankreashormone und die Antigene CEA, CA 19-9, S100, Melanin A, und Fontana. Alle SPN-Zellen reagierten dagegen positiv auf Antikörper gegen CD10, Alpha-1-Antitrypsin (α -AT), Alpha-1-Antichymotrypsin (α -ACT), NSE, Vimentin

und Zytokeratin (ZK) sowie Cyclin D1. Das immunhistochemische Profil weist hier im Vergleich mit zentroazinären Zellen explizite Gemeinsamkeiten auf, so dass eine dementsprechende Genese propagiert werden könnte. Dazu kommt die vom pathologischen Gutachter festgestellte frappierende Ähnlichkeit mit dem Azinuszellkarzinom. Man bedenke allerdings, dass dieser Kasus ein Einzelfall ist.

Die SPN und das aus den Azinuszellen entstehende Karzinom unterscheiden sich konstant in der Positivität für CD 56 und in der Mehrheit der Studien auch in der Reaktion auf CD 10- und Vimentin-Antikörper (Notohara et al., 2000). Der Nachweis von α -AT bezieht sich lediglich auf einige in Gruppen liegende Zellen und darüber hinaus auf die PAS-positiven Globuli zwischen den Zellen (Kosmahl et al., 2005).

Dies alles lässt die Vermutung einer azinären Herkunft der SPN in den Hintergrund treten.

Der epithelial-duktales Ursprung: Das Fehlen eines Zytokeratin-Nachweises in der Hälfte der Fälle bzw. ein Anfärben nur mithilfe von Breitspektrum-Antikörpern spricht nicht unbedingt für eine duktales Herkunft der SPN (Kosmahl et al., 2000).

Eine Verwandtschaft mit dem duktales Adenokarzinom des Pankreas kann beispielsweise aufgrund der Unterschiede in der Histomorphologie und in der Nestin-Expression ausgeschlossen werden (Ohike et al., 2007). Ein endgültiger Beweis steht noch aus.

Der ovarielle Ursprung: Da die SPN fast ausschließlich bei Frauen auftritt, liegt die Vermutung nahe, dass das Entstehen mit der spezifisch weiblichen Endokrinologie zusammenhängt. Außerdem kommen im Laufe der Organogenese Pankreas und Ovar in direkter Nachbarschaft zum Liegen, was den potentiellen Austausch von Zellen nicht unwahrscheinlich macht. Das führte zu dem Versuch, Östrogen- und Progesteronrezeptoren (PR-R) nachzuweisen: Letztere können gefunden werden, erstere sind nur in der - Untergruppe nachzuweisen, nicht jedoch in der α -Untergruppe (Geers et al., 2006). Institutsinterne Studien belegen immunhistologische Unterschiede in der Anfärbbarkeit für VIM, NSE und PR-R zwischen embryonalem und adultem Adnexgewebe auf der einen und der SPN auf der anderen Seite (Wagner, 2004). Diese Erkenntnis lässt die Vermutung einer gemeinsamen oder ähnlichen Histogenese nicht zu.

Der neuroendokrine Ursprung: Zumal histomorphologisch die Abgrenzung zu den neuroendokrinen Tumoren des Pankreas schwierig ist, drängt sich der Verdacht eines gemeinsamen Ursprungs auf. Die neuroendokrinen Marker CD 56 und CD 10 können im Primarius nachgewiesen werden (Notohara et al., 2000).

Ebenso findet man eine inkonstante Reaktion für Synaptophysin (SYN) (Notohara et al., 2000), für Neuronenspezifische Enolase (NSE) (Kallichanda et al., 2006) und für das auch in

neuroendokrinen Tumoren der Haut nachgewiesenen FLI-1 (Lombart et al., 2005). Das alles könnte auf einen neuroendokrinen Ursprung schließen lassen.

Allerdings unterscheidet die Expression von Galectin 3 (GAL-3), einem β -Galactosid, das in den Zyklus von Zellproliferation und Apoptose eingreift (Liu et al., 2002), die SPN von allen anderen neuroendokrinen Neoplasien und könnte ebenso als Argument für eine duktales Genese erhalten (Geers et al., 2006).

Da die NSE beispielsweise auch im Mamma- oder Nierenzellkarzinom nachgewiesen werden kann (Schlosnagle et Campbell, 1981), ist sie zu unspezifisch, als dass sie als Beweis für eine neuroendokrine Herkunft erhalten könnte.

Eine Hormonproduktion konnte in der SPN nicht nachgewiesen werden (Schlosnagle et Campbell, 1981). Der in eben dieser Studie erbrachte Nachweis von sekretorischen Granula konnte nicht wiederholt werden (Geers et al., 2006). Es wird allerdings von einem Einzelfall berichtet, in dem die SPN-Zellen Melanosomen aufwiesen (Chen et al., 2004), was eine gemeinsame Herkunft von Melanozyten und SPN aus Zellen der Neuralleiste vermuten lassen könnte.

Ein weiterer Unterschied zwischen der SPN und anderen neuroendokrinen Tumoren ist das Fehlen des Nachweises von Chromogranin A (CGA) (Notohara et al., 2000), das in allen neuroendokrinen Neoplasien zuverlässig nachgewiesen werden kann.

Auch auf genetischer Ebene wurde versucht, etwas über die Herkunft der SPN herauszufinden: Tiemann et al. (2006) vermuteten aufgrund der konsistenten Reaktion von CD 56 und dem PR-R in der SPN, sowie einer berichteten EWS/FLI-1-Translokation (Maitra et al., 2000) eine SPN-typische Genomaberration auf dem langen Arm von Chromosom 11. Der Verdacht dieser tumorspezifischen Mutation, die auch in anderen neuroendokrinen Tumoren nachgewiesen werden kann (Zetl et al., 2000), hat sich allerdings nicht bestätigt.

Der Ursprung aus pluripotenten Stammzellen: In der SPN kann eine Punktmutation im Gen für Beta-Catenin nachgewiesen werden (Tanaka et al., 2001), die dazu führt, dass Beta-Catenin im Kern verbleibt und seine Funktion als Bindeglied zum Transmembranprotein E-Cadherin nicht erfüllt. Das wiederum kann ein Grund für die charakteristische pseudopapilläre Struktur der SPN sein (Tang et al., 2007). Gleichzeitig findet man entsprechend der Dysfunktion und Überexpression von Beta-Catenin eine Überexprimierung von Cyclin D1, dem Ziel für die hemmende Selbstregulation von Beta-Catenin (Tanaka et al., 2001).

Die genannte Punktmutation befindet sich in Exon 3 auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 (Abraham et al., 2002; Tanaka et al., 2001). Die SPN hat diese gemein mit blastomatösen Tumoren wie dem Pankreatoblastom (Abraham et al., 2001) und dem Hepatoblastom (Koch

et al., 1999). Hier ergibt sich ein Hinweis darauf, dass der Ursprung der SPN in den pluripotenten Stammzellen des Pankreas oder der umliegenden Gewebe liegen könnte. Dieser Verdacht erhärtet sich durch den Nachweis von PDX-1 und SOX-9 im Zytosol der SPN-Zellen (Galmiche et al., 2008). Die Rolle von PDX-1 wird in Kapitel 4.4.1 erläutert; SOX-9 ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der bei der Proliferation und dem Überleben der Pankreas-Progenitorzellen eine wichtige Rolle spielt. Beide Transkriptionsfaktoren werden Beta-Catenin-abhängig exprimiert und eine zytosolische Überexpression korreliert mit der genannten Mutation im Gen für Beta-Catenin (ebd.).

Zur Diskussion steht auch die Frage, ob die SPN im Rahmen einer Dedifferenzierung und malignen Entartung Proteine exprimiert, die ihre Ursprungszelle nicht exprimiert hat.

4.3 Stammzellmarker

4.3.1 c-kit

Grundsätzlich kann die Expression des Tyrosinkinase-Rezeptors c-kit in 50,5% der untersuchten Fälle nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis entspricht dem, was vorausgegangene Studien bereits zeigen konnten (Ohike et al., 2007; Cao et al., 2006).

Die in der c-kit -Färbung beobachtete periseptale und perivaskuläre plasmatische Anfärbbarkeit manifestiert sich allerdings auch in der ISL-1-Färbung und wurde dort als Hintergrundfärbung eingestuft. Unter Umständen ist die hier als positive AK-Reaktion deklarierte Färbung kritischer zu bewerten. Abschließend lässt sich hierüber kein Urteil fällen, da die Isl-1-Hintergrundfärbung und die positive zytoplasmatische c-kit-Reaktion lichtmikroskopisch identisch imponieren.

Dass Zellen mit c-kit-Expression ebenfalls eine deutliche Reaktion auf den Nestin-AK aufweisen, wie von Ohike et al. (2007) behauptet, lassen auch unsere Untersuchungen vermuten, obgleich keine differenzierte Analyse diesbezüglich durchgeführt wurde: Mit 51,6% ist die Zahl der Fälle mit positiver Nestin-Reaktion nahezu identisch der Anzahl positiver Fälle in der c-kit-Färbung.

Wir konnten zeigen, dass eine stärkere Intensität der Färbung für c-kit mit einer höheren Zahl gefärbter Zellen im Präparat einhergeht. Die Ursache in dem Zusammenhang zwischen c-kit-Expression und Proliferationsaktivität zu suchen, wie es in vorangegangenen

Regenerationsmodellen gezeigt werden konnte (Peters et al., 2005), ist allerdings eher unwahrscheinlich.

Einen Zusammenhang zwischen c-kit-Expression und Invasionsneigung des Tumors bewies man bisher ebenfalls nicht (Cao et al., 2006), so dass die c-kit-Expression keine Aussage über Malignität und Prognose zulässt.

Cao et al. (2006) haben nachweisen können, dass die Überexpression von c-kit nicht der vom GIST bekannten Genmutation zu Lasten gelegt werden kann. Dies hat die SPN gemein mit dem neuroendokrinen Kleinzelltumor der Lunge (Tamborini et al., 2004).

Signifikante Unterschiede in der Proteinexpression zwischen den Geschlechtern sind aus den Ergebnissen nicht herzuleiten. Die leichte Tendenz zur stärkeren Expression von c-kit beim weiblichen Geschlecht kann in der Tatsache gründen, dass aufgrund der Geschlechterverteilung des Tumors insgesamt viel mehr weibliche Fälle untersucht worden sind. Dies ist konsistent zu vorangegangenen Studien (Ohike et al., 2007).

Dass bei den zwei malignen SPN-Fällen keine Expression zu finden ist, wohingegen die benignen mit 52,4% positiv reagieren, kann man als Zeichen der Dedifferenzierung werten. Sicher behauptet werden kann dies allerdings nicht, zumal der benigne, aber invasive Fall ebenfalls positiv reagiert.

Wenn man bedenkt, dass c-kit als Progenitorzellmarker gilt (Peters et al., 2005), wird klar, dass wir im gesunden exokrinen Pankreas die gewebseigenen Stamm- bzw. Progenitorzellen identifiziert haben: Sie liegen vorzugsweise an den Rändern der Bindegewebsstraßen und um die Gefäßanschnitte. Auffällig ist, dass die Lokalisierung der c-kit-positiven Zellgruppen in den SPN-Schichten damit übereinstimmt.

Rachdi et al. (2001) nehmen aufgrund einer Expression im fetalen Pankreas an, dass c-kit bei der Differenzierung duktaler Zellen zu Beta-Zellen eine Rolle spielt. Es konnte hier in einer Insulin produzierenden Zellreihe nachgewiesen werden. Peters et al. (2005) wiesen eine Koexpression mit PDX-1 nach, so dass die Behauptung von Yashpal et al. (2004), c-kit sei ein Marker für Insel-Vorläufer, durchaus seine Berechtigung hat.

Vor diesem Hintergrund kann man die positive Reaktion der Hälfte aller SPN auf c-kit-Antikörper als Hinweis auf die Herkunft aus einer endokrinen Progenitorzellreihe des Pankreas werten.

4.3.2 Nestin

Die Nachweisbarkeit von Nestin-positiven Zellen entspricht mit 51,6% der Fälle nahezu der von c-kit. In einigen Fällen lassen sich dabei beide Proteine nachweisen, in anderen jedoch nur eines der beiden. Die Verteilung Nestin-positiver Zellen entspricht ebenfalls der von c-kit (vgl. Abb. 2 im Anhang).

Die Unterschiede sowohl in der Expression zwischen den Geschlechtern wie auch zwischen benignen und malignen Tumoren lassen wie bei der c-kit-Färbung keine weiteren Schlüsse zu (s. Kapitel 3.3.2).

Die Funktion von Nestin als Stammzellmarker ist umstritten:

Hunziker und Stein (2000) nennen die Nestin-positiven Zellen im endokrinen Pankreas aufgrund ihrer immunhistochemischen Gemeinsamkeiten mit multipotenten Zellen im Zentralen Nervensystem Stamm- bzw. endokrine Vorläuferzellen.

Huang et Tang (2003) konnten Nestin in neuroendokrinen sich differenzierenden Zellen nachweisen, wie auch viele andere Studien Nestin in Zusammenhang mit dem Auftreten neuroendokriner Marker nennen (Zulewski et al., 2001; Blyszczuk et al., 2004; Tauguchi et Otsuki, 2004; Wang et al., 2005; Zhang et al., 2005). Man spricht in diesem Zusammenhang von Nestin-positiven duktalem Stammzellen (NPDS) (Kim et al., 2004), die in der Lage sind, sich unter entsprechenden Bedingungen zu Pankreas-Inseln zu entwickeln (Kim et al., 2004; Blyszczuk et al., 2004). Dabei bleibt das Auftreten von Nestin transient und ist nicht bis zum Ende der Differenzierung erhalten (Kim et al., 2004).

Humphrey et al. (2003) halten Nestin zur Identifizierung endokriner Vorläuferzellen dagegen für zu unspezifisch, da es lediglich im fetalen Pankreas Zellen mit der Fähigkeit zur endokrinen Ausdifferenzierung markiere. Bei Paris et al. (2004) und Klein et al. (2003) erscheinen Nestin eher in der Rolle des Endothelmarkers und die NPDS als Vorläufer für Angiogenese und Endothelbildung.

Bei der Auswertung unserer Schnitte wurden diese Erkenntnisse berücksichtigt, so dass Reaktionen in morphologisch als Gefäßendothel kenntlichen Arealen nicht in die Zählung mit eingingen. Das Fehlen von Nestin-positiven Zellen in den Pankreas-Kontrollgeweben lässt sich dadurch erklären, dass keine der Gewebestanzungen Duktusgewebe enthält, wo die NPDS im gesunden Pankreas zu finden wären.

Auch wenn andere Autoren die Anwesenheit Nestin-positiver Zellen im Pankreas auf andere Weise erklären oder verneinen (Lardon et al., 2002; Treutelaar et al., 2003; Hayek, 2004), häufen sich doch aufgrund neuer Studien (Bonner-Weir et al., 2008) und der vorderst genannten Koexpression mit endokrinen Markern die Hinweise, dass NPDS existieren und

zu neuroendokriner Differenzierung fähig sind. Auch konnte Nestin eindeutig eine Rolle bei der Pankreas-Neogenese zugeschrieben werden (Peters et al., 2005; Kim et al., 2007).

Da in der Hälfte der SPN die Reaktion für Nestin positiv ist, kann eine Entwicklung aus sich neuroendokrin weiterdifferenzierenden NPDS möglich sein – möglicherweise im Rahmen der natürlichen Neogenese oder Regeneration des endokrinen Pankreas.

4.4 Pro- und endokrine Marker des Pankreas

4.4.1 PDX-1

Im Gegensatz zu anderen Studien, die eine zytoplasmatische Reaktion für das Pankreatisch-duodenale Homeobox-1-Protein (PDX-1), das vormalig als Insulin-Promotor-Faktor-1 (IPF1) bekannt war, als positiv gewertet haben (Galmiche et al., 2008), gilt in unseren Untersuchungen nur der nukleäre Nachweis. Sowohl seine Rolle als erster nachgewiesener TF für die frühe Differenzierung von embryonalem Endoderm zur Pankreasanlage (Offield et al., 1996) als auch die Funktion von PDX-1 in der adulten β -Zelle (Holland et al., 2005) verorten das Protein in den Kern. Des Weiteren lässt sich PDX-1 in den vorliegenden Vergleichsschnitten im normalen Pankreasgewebe ausschließlich nukleär nachweisen: In 87,5% aller endokrinen und in durchschnittlich 30% aller exokrinen Pankreaszellen ist die Kernreaktion auf PDX-1 positiv. Wenn man die hier auftretende Färbungsverteilung und –intensität zum Vorbild nimmt, findet sich, wie bereits erwähnt, in keiner der benignen SPN eine Reaktion. Lediglich der solitäre maligne SPN-Fall ist PDX-1-positiv, was als Zeichen der Dedifferenzierung im Rahmen der malignen Entartung gewertet werden kann – abweichend vom normalen Bild der SPN.

Letzendlich findet sich auch in den vorliegenden Schnitten eine diffuse zytoplasmatische Anfärbbarkeit für PDX-1, so dass die experimentellen Ergebnisse zwar konsistent sind zu vorangegangenen Studien (Galmiche et al., 2008), jedoch kritischer bewertet werden. Es könnte sich hier um eine Hintergrundreaktion handeln (vgl. Abb. 3 im Anhang).

Eine Mutation im PDX-1-Gen führt sowohl in Mäusen (Jonsson et al., 1994) als auch in Menschen (Stoffers et al., 1997; Ashizawa et al., 2004) zur Agenesie des Pankreas. Im weiteren Verlauf der Organogenese kann es verstärkt in den sich entwickelnden β -Zellen nachgewiesen werden (Ashizawa et al., 2004).

Beim Erwachsenen findet man PDX-1 in den δ - und β -Zellen des endokrinen Pankreas, wo es als Hauptregulator für das Insulin-Gen (Edlund, 2001) und als TF für die

Promotorregionen des GLUT-2-Transporters und der Glukokinase (Watada et al., 1996) agiert. Es erfüllt diese Aufgabe ebenfalls für das Insel-Amyloidpeptid und Somatostatin (Ashizawa et al., 2004). Außerdem spielt es eine Rolle als Vermittler zwischen Hyperglykämie und Insulinausschüttung bei der Entstehung von Diabetes (Melloul, 2004).

PDX-1 kennzeichnet also einen weiteren Schritt der Entwicklung der pankreatischen Stammzelle zur Insulin produzierenden Inselzelle. Ein Fehlen des Nachweises von PDX-1 im Kern der SPN lässt darauf schließen, dass die Ursprungszelle die beschriebene Entwicklung nicht oder möglicherweise noch nicht durchlaufen hat.

Zumal PDX-1 zeitweilig – zum Beispiel nach Tag 10 der Embryogenese (Melloul, 2004) - im später endokrin ausdifferenzierten Gewebe ebenfalls nicht nachgewiesen werden kann, ist eine Herkunft auch aus ehemals PDX-1 exprimierenden Zellen nicht ganz auszuschließen.

4.4.2 Neurogenin 3

Neurogenin 3 (NGN3) wird von Eberhard et al. (2008) als proendokriner TF definiert, der als Marker für endokrin sich differenzierende Zellen begriffen werden kann (Gu et al., 2002). Er lässt sich auch in der Entwicklung von Nervenzellen nachweisen (Sommer et al., 1996).

Es differenzieren sich allerdings (z.B. im GI-Trakt) nicht alle NGN3-positiven Zellen endokrin (Schonhoff et al., 2004), aber ohne NGN3-positive Zellen in der Organogenese fehlt die Entwicklung des intestinalen Endokriniums völlig (Gradwohl et al., 2000; Ogihara et al., 2008).

Die Expression von NGN3 wird induziert durch PDX-1 (Kawasaki et al., 2008) oder Pf1a (Serafimides et al., 2008). Das Protein selbst wiederum induziert die β -Zell-Entwicklungsfaktoren Nk2.2, PAX-4 und PAX-6 und spielt zusammen mit Nkx6.1 und MafA eine tragende Rolle bei der Insulin-Sekretion (Ohigara et al., 2008). Serafimides et al. (2008) stellten darüber hinaus bei Stammzellen in Mausembryonen fest, dass NGN3 auch in die Signalwege von Wnt, Integrin und Notch eingreift und zeitgleich mit Veränderungen bezüglich Zellmobilität und -adhäsion, Zytoskelett und extrazellulärer Matrixbildung auftritt.

NGN3 zeigt sich laut Lyttle et al. (2008) vor allem in den frühen Stadien der endokrinen Differenzierung (8.-12. Woche), hier auch koexprimiert mit Insulin, Glukagon und PDX-1. Villasenor et al. (2008) weisen einen biphasischen Expressionsverlauf nach: in E8.5 bis E11 ein ubiquitäres Vorkommen im pankreatischen Epithel und in E12 ein isolierter Nachweis im endokrin differenzierten Gewebe. Die endgültige Ausdifferenzierung in endokrin aktive Pankreaszellen läuft allerdings in Abwesenheit von NGN3 und auch in den adulten Inselzellen lässt sich das Protein nicht nachweisen (Watada, 2004).

In unseren Untersuchungen lässt sich eine Reaktion von NGN3 im endokrinen Pankreas nur in einem von 8 Schnitten nachweisen, was konsistent zu den vorangegangenen Studien ist.

63,6% aller exokrinen Gewebeproben zeigen dagegen vereinzelt deutlich positive Zellen. Ob diese als die endogenen Reserve-Progenitorzellen, derer sich die Inselzellregeneration bedient, zu interpretieren sind, sei dahingestellt. Gu et al. (2003) verorten diese Zellart in die Inseln.

Nur 10,9% der vorliegenden SPN-Fälle weisen einen schwachen Nachweis von NGN3 auf (vgl. Abb. 4), was isoliert betrachtet nicht als Beweis einer Herkunft aus Pankreas-Progenitorzellen gelten kann. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang allerdings, dass dieser potentielle Marker pankreatischer Vorläuferzellen überhaupt nachweisbar ist, obwohl der induzierende Transkriptionsfaktor PDX-1 nicht nachgewiesen werden kann.

4.4.3 PAX-6

Im adulten Pankreas nimmt das Paired-Box-6-Protein (PAX-6) eine Schlüsselrolle bei der Glukagontranskription in Alpha-Zellen ein: Im Komplex mit CDX-2 und p300 initiiert es synergistisch die Glukagon-Gentranskription (Hussain et Habener, 1999), gehemmt durch PAX-4 ist es an der Hemmung der Expression beteiligt (Ritz-Laser et al., 2002). Das ganze geschieht über eine Interaktion am Alpha-Zell-spezifischen DNA-Element G1 (Gosmain et al., 2007). Des Weiteren bindet PAX-6 teils zusammen mit PDX-1 an die Promotorregionen des Glukose-abhängigen insulinotropen Polypeptids (GIP) und des Glukagon-like-Peptide (GLP) in gastrointestinalen sogenannten L-Zellen (Fujita et al., 2008).

Über die Steuerung der Transkription der Prohormon-Konvertase 1/3 beeinflusst PAX-6 zudem wesentlich die Entstehung einer Glukoseintoleranz (Wen et al., 2009).

Neben der wichtigen Funktion als Induktor für Neurogenese im Kortex (Osumi et al., 2008) oder bei der Entwicklung des Sehapparates (Cooper et Hanson, 2005) spielt PAX-6 so vor allem eine Rolle in der Entwicklung und Funktion des endokrinen Pankreas. Lang et al. (2007) schreiben den PAX-Genen wichtige Aufgaben bei der Verhinderung von Enddifferenzierung und Apoptose in den im adulten Gewebe verbliebenen Stammzellen zu. Somit ist auch eine Beteiligung an der Tumorgenese in den entsprechenden Geweben nicht unwahrscheinlich (Lang et al., 2007; Pinto et al. 2007): Eine Induktion zur weiteren Differenzierung ging bei Lang et al. (2008) mit einem Abfall der PAX-6-Expression einher. Eine positive Reaktion auf PAX-6-AK bezeichnen andere Autoren als Zeichen einer Differenzierung in den Inselzellsubtyp der Alpha-Zelle (Sander et al., 1997; St.Onge et al., 1997).

Unsere Pankreas-Kontrollschnitte weisen dazu konsistent eine 100%ige Färbung der Inselzellen auf, zumal PAX-6 auch bei der Proinsulinbildung in Beta-Zellen eine Rolle spielt.

Auch das Fehlen von Reaktionen im exokrinen Pankreas stimmt mit vorangegangenen Untersuchungsergebnissen überein (vgl. Lang et al., 2008), so dass die Reaktion in der Hälfte der malignen und 20,2 % der benignen SPN-Fälle folgenden Hinweis geben könnte: Der Ursprung des Tumors findet sich in einer sich auf dem Weg zur Inselzelle bereits befindlichen endokrinen Vorläuferzelle (vgl. Sander et al., 1997) oder mit anderen Worten in an der endgültigen Ausdifferenzierung gehinderten Zellen (vgl. Lang et al., 2007).

4.4.4 ISL-1

Islet-1 (ISL-1) ist ein TF mit LIM- und Homeobox-Domäne (Tanizawa et al., 1994), der erstmals als Enhancer-Bindemolekül für das Insulingen der Ratte entdeckt worden ist (ebd.), aber auch in vielen anderen endokrinen (Suzuki et al., 2007) und nicht endokrinen Geweben (Juruta et al., 1998; Lin et al., 2007; Li et al., 2008) nachgewiesen werden kann. Er zeigt sich im sich entwickelnden Pankreas in Koexpression mit Nestin in den bereits beschriebenen potentiellen Stammzellen des Pankreas (Eberhardt et al., 2006), beschränkt sich jedoch örtlich auf die das Mesenchym der dorsalen Pankreasanlage und zeitlich auf die frühen Entwicklungsstadien (Rowan-Hull et al., 2009). Diese ISL-1 positiven Stammzellen können laut Eberhardt et al. (2006) auch zu Albumin-produzierenden Leberzellen oder Adipozyten werden.

Über ISL-1 kann sogar eine endokrine Entwicklung nicht endokriner Mesenchymzellen initiiert werden (Rowan-Hull et al., 2009) bzw. indirekt über das $\beta 2$ -Transkriptionsmolekül oder HNF4 α ist ISL-1 an der Insulinexpression beteiligt (Peng et al., 2005; Eekhout et al., 2006). Shimomura et al. (2000) vermuten einen Zusammenhang zwischen ISL-1-Genmutation und familiär gehäufte Glukose-Intoleranz, Li et al. (2008) eine Mittlerrolle des ISL-1 im Spannungsfeld Adipositas und Diabetes-Entwicklung.

Im adulten Pankreas finden wir ISL-1 hauptsächlich in den Inselzellen, so dass Schmitt et al. (2008) es als reliablen endokrinen Tumormarker des Pankreas bezeichnen – somit als Gegenstück zum gastrointestinalen CDX-2.

Unsere immunhistochemischen Ergebnisse zeigten eine deutliche Anfärbarkeit aller Inselzellen im Pankreas-Kontrollgewebe. Darüber hinaus konnten einzelne immunpositive Zellen im exokrinen Gewebe ausgemacht werden, die man trotz unseres fehlenden Nestin-Nachweises hier aufgrund der Ergebnisse von Eberhardt et al. (2006) als gewebeeigene Stammzellen definieren könnte.

Im Vergleich dazu zeigte keine der SPN-Proben eine Reaktion auf ISL-1, was zu dem Schluss führt, dass der Tumor nicht dem ausdifferenzierten endokrinen Gewebe des

Pankreas entspringt, aber auch nicht den potentiellen Stammzellen zugeordnet werden kann.

4.5 Marker enteroendokriner Differenzierung

4.5.1 CDX-2

Um die Möglichkeit einer Entstehung der SPN aus Vorläufer- oder endokrinen Zellen des Gastrointestinaltraktes auszuschließen, haben wir im Rahmen unserer immunhistochemischen Versuche auch auf CDX-2 gefärbt.

Das Gen für diesen Homeobox-TF vom kaudalen Typ (CDX-2) liegt auf dem langen Arm von Chromosom 13 (German et al., 1994). Schon in der 6. SSW kann das Protein im intestinalen Epithel der Frucht nachgewiesen werden (Gaggero et al. 2003). Es bleibt auch beim Erwachsenen auf die Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes beschränkt. Aufgrund dieser Organspezifität ist CDX-2 ein wichtiger Marker für Neoplasien des Intestinums und kann sowohl als Frühzeichen des Barrett-Ösophagus (Phillips et al., 2003) als auch zum Nachweis eines Kolonkarzinoms (Okoń et al., 2004) herangezogen werden.

Darüber hinaus kennzeichnet CDX-2 die intestinale Differenzierung von Tumoren des Magens (Mazziotta et al. 2005), der Gallenblase (Wu et al., 2005), aber auch des Pankreas (Matsumoto et al. 2004), und hilft bei der Einschätzung der Prognose: Über die Fähigkeit zur Cyclin D1-Hemmung (Takahashi et al., 2009) und p21-Stimulation (Bai et al., 2003) hemmt CDX-2 die Zellproliferation. Laut Trinh et al. (1999) kann es in den Inselzellen und den enteroendokrinen GI-Zellen nachgewiesen werden, so dass CDX-2 einen verlässlichen Marker für Neoplasien aus dem Endokrinium des Intestinums darstellt (Schmitt et al., 2008). CDX-2 gilt seit langem als Glukagon-Gentranskriptionsfaktor (Ritz-Laser et al., 1999; Wang et al., 2006), wobei hier Trinh et al. (2003) PAX-6 die gewichtigere Rolle zuschreiben. PDX-1 kann über CDX-2 die Glukagontranskription hemmend beeinflussen (Ritz-Laser et al., 2003). Nach Escoffit et al. (2006) ist CDX-2 allerdings nicht in der Lage, Vorläuferzellen zur endokrinen Differenzierung anzuregen.

Entgegen den Ergebnissen von Trinh et al. (1999) konnten wir CDX-2 nicht in den Inselzellen nachweisen. Das Verteilungsmuster der CDX-2-positiven Zellen im exokrinen Pankreas ähnelt dem von NGN3 (s.Kapitel 4.4.1). Nur im benignen, aber invasiven SPN-Fall war eine mäßige Reaktion für CDX-2 zu finden. Hier scheint die morphologische Einzigartigkeit des Falls einherzugehen mit einer immunhistochemischen Ausnahme und könnte eine Möglichkeit bieten, aggressives Verhalten der SPN anhand dieser Marker vorherzusagen. Dagegen

spricht die Negativität der als maligne eingestuftem SPN für CDX-2. Untersuchungen mit einer größeren Fallzahl könnten im Weiteren darüber Aufschluss geben.

Da ansonsten CDX-2 nicht nachgewiesen werden konnte, im Kolonkarzinom-Kontrollgewebe dagegen umso deutlicher ausgeprägt war, ist eine intestinale Tumorgenese unwahrscheinlich.

Dass unsere Reagenz in den glukagonproduzierenden α -Zellen wie auch im Tumor negativ reagierte, ist andererseits kein ausreichend valider Hinweis auf eine Herkunft von SPN und α -Zellen aus gemeinsamen Vorläufern.

4.6 Zusammenschau der Immunhistochemie-Ergebnisse

4.6.1 Vor dem Hintergrund der endokrinen Organogenese

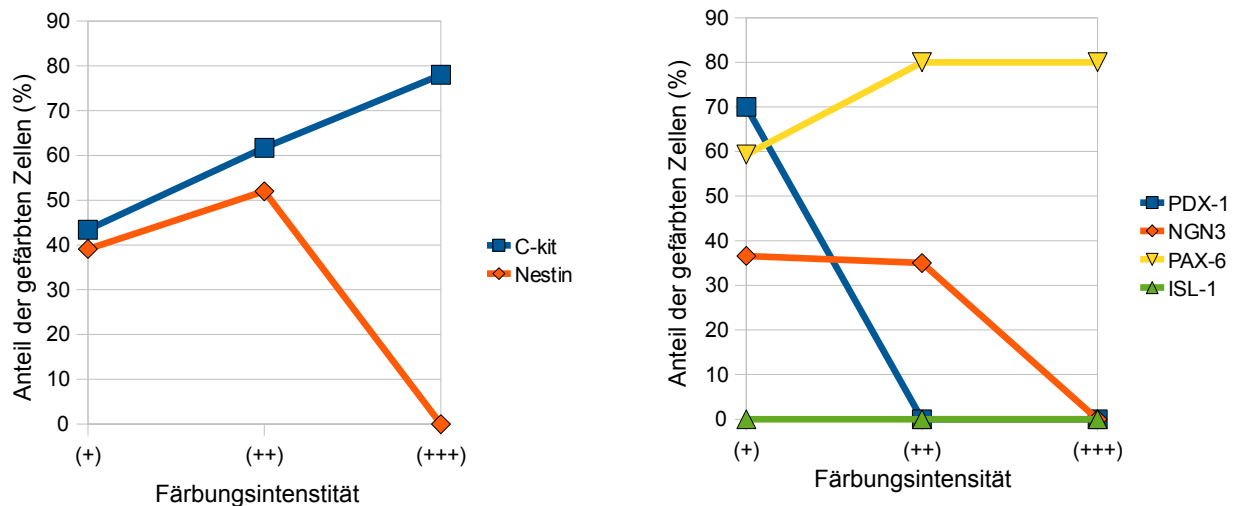
PDX-1, der früheste Marker einer Pankreasentwicklung, der sich auch noch in den Inselzellen des Erwachsenen nachweisen lässt (Piper et al., 2004), findet sich nicht in der SPN. Hierbei ist zu bedenken, dass PDX-1 zeitweilig auch in der normalen Pankreasgenese nicht exprimiert wird (Melloul, 2004).

Das durch PDX-1 induzierte NGN3 (Kawasaki et al., 2008) dagegen lässt sich in 10,9% der Fälle nachweisen. Auf ISL-1, das neben diesem und NeuroD1 den wichtigsten Marker für eine endokrine Differenzierung darstellt (Best et al., 2008), zeigen die untersuchten SPN ebenfalls keine Reaktion. Der geringe NGN3-Nachweis wäre erklärbar dadurch, dass NGN3 lediglich die frühe Differenzierung kennzeichnet (Lyttle et al., 2008). Der durch NGN3 induzierte TF PAX-6 lässt sich wiederum in 19,8% der Fälle nachweisen. Wenn eine positive Reaktion vorliegt, dann auch im Großteil der begutachteten Zellen (vgl. Abb. 4.2). So wird eine Entwicklung in Richtung Alpha-Zelle (Best et al., 2008; Gosmain et al., 2007) angedeutet, die durch die Gemeinsamkeit bezüglich der negativen CDX-2-Reaktion in Alpha-Zellen und SPN allerdings keine zusätzliche Beweiskraft erhält.

Dass ISL-1 nicht nachzuweisen ist, spricht gegen einen proendokrinen Ursprung der SPN.

In der Praxis wird ISL-1 aber eher als Marker endokrin ausdifferenzierter Tumoren verwendet (Schmitt et al., 2008), was die Spezifität dieses Markers für unsere Zwecke sinken und einen proendokrinen Ursprung wahrscheinlicher werden lässt.

Abb. 4.1 und 4.2 Zusammenschau der Verhältnisse zwischen Färbungsintensität und Anteil der gefärbten Zellen im TMA-Schnitt in %



In Tab. 4.1 sind die Progenitorzellmarker zusammengefasst, in Tab. 4.2 die (pro-)endokrinen Marker. Die Graphen bezeichnen den Zusammenhang zwischen dem durchschnittlichen Anteil der gefärbten Zellen in den TMA-Schnitten und der Intensität der immunhistochemischen Farbreaktion.

4.6.2 Vor dem Hintergrund der Pankreasregeneration

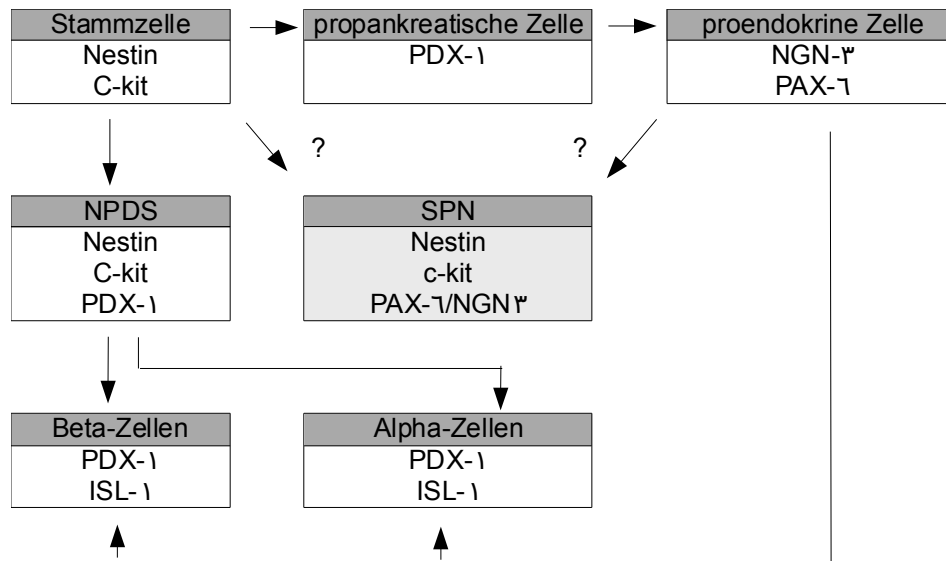
Grundsätzlich ähnelt die Regeneration des Pankreas seiner Entwicklung (Watada, 2004). Unter der Voraussetzung, dass Nestin-positive duktile Stammzellen als Reservoir für Inselzellregeneration dienen oder zumindest dabei eine Rolle spielen (Bonner-Weir et al., 2008; Kim et al., 2007; Peters et al., 2005), könnte man behaupten, die Nestin-positive SPN sei aus den gewebeeigenen Stammzellen des Pankreas entstanden.

Wenn c-kit nicht nur als Proliferationsmarker, sondern als Marker endokriner Differenzierung begriffen wird (Rachdi et al., 2001; Peters et al., 2005), weist auch hier das immunhistochemische Ergebnis auf eine dementsprechende Tumorgenese hin. Besonders die Tatsache, dass mit zunehmendem Anteil an positiven Zellen auch die Färbungsintensität zunimmt (vgl. Abb. 4.1), unterstützt diese These unter der genannten Voraussetzung.

Allerdings fehlt die Übereinstimmung zwischen dem immunhistochemischen Bild der SPN und dem endokrin sich differenzierender Progenitorzellen: ISL-1, NGN3, PAX-6 und besonders PDX-1, die während der Inselzellregeneration exprimiert werden sollen (Kritzik et

al., 2000; Zaret et al. 2008), sind gar nicht oder nur in geringem Maß in der SPN nachzuweisen.

Tabellen 4.3 Expression von immunhistochemischen Markern im Laufe der endokrinen Entwicklung



Tab. 4.3 gibt unter Berücksichtigung dieser Arbeit vorangegangener Studien zu den von uns verwendeten Antikörpern eine Übersicht der immunhistochemischen Bilder der verschiedenen Zellentwicklungsstufen des endokrinen Pankreas und der SPN. NPDS: Nestin-positive duktaale Stammzellen

Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse fällt Folgendes auf:

- 1) Zwar waren insgesamt nur 19,8% der Fälle positiv für PAX-6, aber in diesen Schnitten zeigten sich nahezu alle im Präparat sichtbaren SPN-Zellen positiv.
- 2) Mit zunehmender Färbungsintensität nahm die Menge der anteilig gefärbten Zellen zu (vgl. Tabelle 4.2).

Hierin könnte ein Indiz für das Entstehen aus bisher durch PAX-6-Expression an Enddifferenzierung und Apoptose gehinderten (Lang et al., 2007) Pankreaszellen bestehen. Diese Interpretation der Ergebnisse stellte eine Verbindung zu der ursprünglich erwähnten Herkunft aus gewebeeigenen Stammzellen namens NPDS her (s. oben).

Die SPN kann sich darüber hinaus aus Progenitorzellen entwickelt haben, die noch nicht die ISL-1/NGN3/PAX-6/PDX-1-positiven Stadien durchlaufen haben. Für diese These spräche der maligne SPN-Fall, in dem PDX-1, PAX-6 und NGN3 exprimiert wurden, c-kit und Nestin dagegen nicht (vgl. Anhang).

5. Zusammenfassung

Die solid-pseudopapilläre Neoplasie des Pankreas ist eine sehr seltene Tumorerkrankung. Vornehmlich sind Frauen jüngerer Alters betroffen. In den allermeisten Fällen verhält sie sich benigne und ist durch eine operative Entfernung des Tumors zu kurieren.

Bislang ist die Herkunft der Neoplasie unbekannt. Ihre Morphologie ist vielgestaltig, das immunhistochemische Profil einzigartig und das Genom durch eine Mutation im β -Catenin-Gen charakterisiert. Derzeit wird eine Herkunft aus pankreatischen Vorläuferzellen diskutiert. Diese Möglichkeit näher auszuleuchten war Ziel dieser Arbeit: Zunächst wurde die Reaktion auf c-kit und Nestin, die sowohl als Stammzellmarker als auch zur Kennzeichnung endokriner Differenzierung genutzt werden können, untersucht. Es folgten AK-Färbungen auf die pro- bzw. endokrinen Marker PAX-6, PDX-1, NGN3 und ISL-1. Zum Ausschluss einer enteroendokrinen Herkunft der SPN wurde das AK-Spektrum um CDX-2 erweitert.

Es wurden sowohl die Färbungsintensität als auch der Anteil der gefärbten Zellen im Präparat berücksichtigt und mit den Pankreaskontrollgeweben verglichen. Gleichzeitig sollte ein möglicher Unterschied bei der Proteinexpression zwischen den Geschlechtern und zwischen benignen und invasiven Tumoren untersucht werden.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen: Die Stammzellmarker c-kit und Nestin konnten in der Hälfte der Fälle der SPN nachgewiesen werden; bei steigendem Anteil an gefärbten Zellen mit einhergehender stärkerer Färbungsintensität.

19,8% zeigten sich positiv für den Inselzellmarker PAX-6 und 10,9% für das transient in der Pankreatogenese auftretende NGN3. Beide Proteine kennzeichneten in vorangegangenen Studien ein Zellstadium, das den Weg zur endokrinen Pankreazelle bereits eingeschlagen, aber noch nicht vollendet hat. Die Reaktionen auf Antikörper gegen PDX-1, ISL-1 und CDX-2 waren negativ, was die Annahme, die SPN entstamme entweder ausdifferenziertem endokrinen Gewebe des Pankreas oder des Gastrointestinaltraktes, unwahrscheinlich macht. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Tumorentitäten oder den Geschlechtern ließ sich nicht nachweisen, so dass die Entstehung des Tumors aus geschlechtsspezifisch-ovariellen Zellen ebenfalls eher verneint werden kann.

Die immunhistochemischen Ähnlichkeiten (positive Reaktion auf c-kit und Nestin) der SPN mit potentiellen pankreatischen Stamm- oder endokrinen Reservezellen (sogenannten NPDS) und der Nachweis von Markern endokriner Differenzierung (PAX-6 und NGN3) legen einen Ursprung aus Progenitorzellen nahe, können diesen letztlich aber nicht beweisen. Die Entstehung dieser einmaligen Neoplasie muss weiterhin rätselhaft und damit Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben.

6. Literaturverzeichnis

Abraham SC, Wu TT, Klimstra DS, Finn LS, Lee JH, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH (2001): Distinctive molecular genetic alterations in sporadic and familial adenomatous polyposis-associated pancreatoblastomas : frequent alterations in the APC/beta-catenin pathway and chromosome 11p. *Am J Pathol.* 2001 Nov;159(5):1619-27.

Abraham SC, Klimstra DS, Wilentz RE, Yeo CJ, Conlon K, Brennan M, Cameron JL, Wu TT, Hruban RH (2002): Solid-pseudopapillary tumors of the pancreas are genetically distinct from pancreatic ductal adenocarcinomas and almost always harbor beta-catenin mutations. *Am J Pathol.* 2002 Apr;160(4):1361-9.

Ashizawa S, Brunicardi FC, Wang XP (2004): PDX-1 and the pancreas. *Pancreas.* 2004 Mar;28(2):109-20.

Bai YQ, Miyake S, Iwai T, Yuasa Y (2003): CDX2, a homeobox transcription factor, up-regulates transcription of the p21/WAF1/CIP1 gene. *Oncogene.* 2003 Sep 11;22(39):7942-9.

Best M, Carroll M, Hanley NA, Piper Hanley K (2008): Embryonic stem cells to beta-cells by understanding pancreas development. *Mol Cell Endocrinol.* 2008 Jun 25;288(1-2):86-94.

Blyszczuk P, Asbrand C, Rozzo A, Kania G, St-Onge L, Rupnik M, Wobus AM (2004): Embryonic stem cells differentiate into insulin-producing cells without selection of nestin-expressing cells. *Int J Dev Biol.* 2004 Dec;48(10):1095-104.

Böcker W, Denk H, Heitz Ph U (2004): *Repetitorium Pathologie.* Urban & Fischer, München

Bonner-Weir S, Inada A, Yatoh S, Li WC, Aye T, Toschi E, Sharma A (2008): Transdifferentiation of pancreatic ductal cells to endocrine beta-cells. *Biochem Soc Trans.* 2008 Jun;36(Pt 3):353-6.

Cao D, Antonescu C, Wong G, Winter J, Maitra A, Adsay NV, Klimstra DS, Hruban RH (2006): Positive immunohistochemical staining of KIT in solid-pseudopapillary neoplasms of the pancreas is not associated with KIT/PDGFR α mutations. *Mod Pathol.* 2006 Sep;19(9):1157-63.

Chen C, Jing W, Gulati P, Vargas H, French SW (2004): Melanocytic differentiation in a solid pseudopapillary tumor of the pancreas. *J Gastroenterol.* 2004 Jun;39(6):579-83.

Cooper ST, Hanson IM (2005): A screen for proteins that interact with PAX6: C-terminal mutations disrupt interaction with HOMER3, DNCL1 and TRIM11. *BMC Genet.* 2005 Aug 12;6:43.

Eberhard D, Tosh D, Slack JM (2008): Origin of pancreatic endocrine cells from biliary duct epithelium.. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Nov;65(21):3467-80.

Edlund H (2001): Factors controlling pancreatic cell differentiation and function. *Diabetologia.* 2001 Sep;44(9):1071-9.

Eeckhoute J, Briche I, Kurowska M, Formstecher P, Laine B (2006): Hepatocyte nuclear factor 4 alpha ligand binding and F domains mediate interaction and transcriptional synergy with the pancreatic islet LIM HD transcription factor Isl1. *J Mol Biol.* 2006 Dec 8;364(4):567-81.

Frantz VK (1959): Tumors of the pancreas. *AFIP Atlas of tumor pathology, 1st series, section 7, fascicles 27 and 28.* Armed Forces Institut of Pathology, Washington/DC.

Fujita Y, Chui JW, King DS, Zhang T, Seufert J, Pownall S, Cheung AT, Kieffer TJ (2008): Pax6 and Pdx1 are required for production of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in proglucagon-expressing L cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008 Sep;295(3):E648-57.

Gaggero G, Sola S, Mora M, Fulcheri E (2003): Expression of the cdx2 gene in benign intestinal-type mucinous ovarian tumors. *Pathologica.* 2003 Aug;95(4):185-91.

Galmiche L, Sarnacki S, Verkarre V, Boizet B, Duvillie B, Fabre M, Jaubert F (2008): Transcription factors involved in pancreas development are expressed in paediatric solid pseudopapillary tumours. *Histopathology.* 2008 Sep;53(3):318-24.

Geers C, Moulin P, Gigot JF, Weynand B, Deprez P, Rahier J, Sempoux C (2006): Solid and pseudopapillary tumor of the pancreas--review and new insights into pathogenesis. *Am J Surg Pathol.* 2006 Oct;30(10):1243-9.

German MS, Wang J, Fernald AA, Espinosa R 3rd, Le Beau MM, Bell GI (1994): Localization of the genes encoding two transcription factors, LMX1 and CDX3, regulating insulin gene expression to human chromosomes 1 and 13. *Genomics*. 1994 Nov 15;24(2):403-4.

Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M and Guillemot F (2000): Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000), pp. 1607–1611.

Gu G, Dubauskaite J, Melton DA (2002): Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development*. 2002 May;129(10):2447-57.

Gu G, Brown JR, Melton DA (2003): Direct lineage tracing reveals the ontogeny of pancreatic cell fates during mouse embryogenesis. *Mech Dev*. 2003 Jan;120(1):35-43.

Hayek A (2005): In search of endocrine progenitor/stem cells in the human pancreas. *Pediatr Diabetes*. 2004;5 Suppl 2:70-4.

Holland AM, Góñez LJ, Naselli G, Macdonald RJ, Harrison LC (2005): Conditional expression demonstrates the role of the homeodomain transcription factor Pdx1 in maintenance and regeneration of beta-cells in the adult pancreas. *Diabetes*. 2005 Sep;54(9):2586-95.

Huang H, Tang X (2003): Phenotypic determination and characterization of nestin-positive precursors derived from human fetal pancreas. *Lab Invest*. 2003 Apr;83(4):539-47.

Humphrey RK, Bucay N, Beattie GM, Lopez A, Messam CA, Cirulli V, Hayek A (2003): Characterization and isolation of promoter-defined nestin-positive cells from the human fetal pancreas. *Diabetes*. 2003 Oct;52(10):2519-25.

Hunziker E, Stein M (2000): Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Apr 29;271(1):116-9.

Hussain MA, Habener JF (1999): Glucagon gene transcription activation mediated by synergistic interactions of pax-6 and cdx-2 with the p300 co-activator. *J Biol Chem*. 1999 Oct 8;274(41):28950-7.

Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H (1994): Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*. 1994 Oct 13;371(6498):606-9.

Kallichanda N, Tsai S, Stabile BE, Buslon V, Delgado DL, French SW (2006): Histogenesis of solid pseudopapillary tumor of the pancreas: the case for the centroacinar cell of origin. *Exp Mol Pathol*. 2006 Oct;81(2):101-7.

Kawasaki H, Mizuguchi T, Oshima H, Nobuoka T, Shibata T, Kaji S, Kokai Y, Katsuramaki T, Mitaka T, Hirata K (2008): Efficient transformation of small hepatocytes into insulin-expressing cells by forced expression of Pdx1. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2008;15(4):403-9.

Kim SY, Lee SH, Kim BM, Kim EH, Min BH, Bendayan M, Park IS (2004): Activation of nestin-positive duct stem (NPDS) cells in pancreas upon neogenic motivation and possible cytodifferentiation into insulin-secreting cells from NPDS cells. *Dev Dyn*. 2004 May;230(1):1-11.

Kim SY, Lee S, Min BH, Park IS (2007): Functional association of the morphogenic factors with the clusterin for the pancreatic beta-cell differentiation. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007 Sep;77 Suppl 1:S122-6.

Klein T, Ling Z, Heimberg H, Madsen OD, Heller RS, Serup P (2003): Nestin is expressed in vascular endothelial cells in the adult human pancreas. *J Histochem Cytochem*. 2003 Jun;51(6):697-706.

Klimstra DS, Wenig BM, Heffness CS (2000): Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: a typically cystic carcinoma of low malignant potential. *Semin Diagn Pathol*. 2000 Feb;17(1):66-80.

Koch A, Denkhaus D, Albrecht S, Leuschner I, von Schweinitz D, Pietsch T (1999): Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res*. 1999 Jan 15;59(2):269-73.

Kosmahl M, Seada LS, Jänig U, Harms D, Klöppel G (2000): Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: its origin revisited. *Virchows Arch* 436: 473–480

Kosmahl M, Peters K, Anlauf M, Sipos, Pauser U, Lüttges J, Klöppel G (2005): Solid-pseudopapilläre Neoplasien - Weiblich orientiert und rätselhaft. *Pathologie* 2005;26;41-45.

Kritzik MR, Krahl T, Good A, Krakowski M, St-Onge L, Gruss P, Wright C, Sarvetnick N (2000): Transcription factor expression during pancreatic islet regeneration. *Mol Cell Endocrinol.* 2000 Jun;164(1-2):99-107.

Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA (2007): PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol.* 2007 Jan 1;73(1):1-14.

Lang D, Mascarenhas JB, Powell SK, Haleboua J, Nelson M, Ruggeri BA (2008): PAX6 is expressed in pancreatic adenocarcinoma and is downregulated during induction of terminal differentiation. *Mol Carcinog.* 2008 Feb;47(2):148-56.

Lardon J, Rooman I, Bouwens L. *Histochem* (2002): Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells. *Cell Biol.* 2002 Jun;117(6):535-40.

Li H, Heilbronn LK, Hu D, Poynten AM, Blackburn MA, Shirkhedkar DP, Kaplan WH, Kriketos AD, Ye J, Chisholm DJ (2008): Islet-1: a potentially important role for an islet cell gene in visceral fat. *Obesity (Silver Spring).* 2008 Feb;16(2):356-62.

Lin L, Cui L, Zhou W, Dufort D, Zhang X, Cai CL, Bu L, Yang L, Martin J, Kemler R, Rosenfeld MG, Chen J, Evans SM (2007): Beta-catenin directly regulates Islet1 expression in cardiovascular progenitors and is required for multiple aspects of cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May 29;104(22):9313-8.

Liu FT, Paterson RJ, Wang JL (2002): Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1572:263-273.

Llombart B, Monteagudo C, López-Guerrero JA, Carda C, Jorda E, Sanmartín O, Almenar S, Molina I, Martín JM, Llombart-Bosch A (2005): Clinicopathological and immunohistochemical analysis of 20 cases of Merkel cell carcinoma in search of prognostic markers. *Histopathology.* 2005 Jun;46(6):622-34.

Lyttle BM, Li J, Krishnamurthy M, Fellows F, Wheeler MB, Goodyer CG, Wang R (2008): Transcription factor expression in the developing human fetal endocrine pancreas. *Diabetologia*. 2008 Jul;51(7):1169-80.

Maitra A, Weinberg AG, Schneider N, Patterson K (2000): Detection of t(11;22)(q24;q12) translocation and EWS-FLI-1 fusion transcript in a case of solid pseudopapillary tumor of the pancreas. *Pediatr Dev Pathol*. 2000 Nov-Dec;3(6):603-5.

Matsumoto K, Mizoshita T, Tsukamoto T, Ogasawara N, Hirata A, Shimizu Y, Haneda M, Yamao K, Tatematsu M (2004): Cdx2 expression in pancreatic tumors: Relationship with prognosis of invasive ductal carcinomas. *Oncol Rep*. 2004 Dec;12(6):1239-43.

Mazziotta RM, Borczuk AC, Powell CA, Mansukhani M (2006): CDX2 immunostaining as a gastrointestinal marker: expression in lung carcinomas is a potential pitfall. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006 Jun;14(2):249-50.

Melloul D. (2004): Transcription factors in islet development and physiology: role of PDX-1 in beta-cell function. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Apr;1014:28-37.

Notohara K, Hamazaki S, Tsukayama C, Nakamoto S, Kawabata K, Mizobuchi K, Sakamoto K, Okada S (2000): Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: immunohistochemical localization of neuroendocrine markers and CD10. *Am J Surg Pathol*. 2000 Oct;24(10):1361-71.

Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV (1996): PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development*. 1996 Mar;122(3):983-95.

Ogihara T, Fujitani Y, Uchida T, Kanno R, Choi JB, Hirose T, Kawamori R, Watada H (2008): Combined expression of transcription factors induces AR42J-B13 cells to differentiate into insulin-producing cells. *Endocr J*. 2008 Aug;55(4):691-8.

Ohike N, Sato M, Hisayuki T, Imataka H, Sato S, Wada Y, Saito K, Takahashi M, Tajiri T, Kunimura T, Morohoshi T (2007): Immunohistochemical analysis of nestin and c-kit and their significance in pancreatic tumors. *Pathol Int*. 2007 Sep;57(9):589-93.

Okoń K, Zazula M, Rudzki Z, Papla B, Osuch C, Stachura J (2004): CDX-2 expression is reduced in colorectal carcinomas with solid growth pattern and proximal location, but is largely independent of MSI status. *Pol J Pathol.* 2004;55(3):9-14.

Osumi N, Shinohara H, Numayama-Tsuruta K, Maekawa M (2008): Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells.* 2008 Jul;26(7):1663-72.

Odze RD, Goldblum JR, Crawford JM, Klimstra DS, Adsay NV (2004): *Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas, Part two, Chapter 31:*726-729.

Paris M, Turrel-Cuzin C, Plachot C, Ktorza A (2004): Review: pancreatic beta-cell neogenesis revisited. *Exp Diabetes Res.* 2004 Apr-Jun;5(2):111-21.

Peng SY, Wang WP, Meng J, Li T, Zhang H, Li YM, Chen P, Ma KT, Zhou CY (2005): ISL1 physically interacts with BETA2 to promote insulin gene transcriptional synergy in non-beta cells. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Dec 20;1731(3):154-9.

Peters K, Panienska R, Li J, Klöppel G, Wang R. (2005): Expression of stem cell markers and transcription factors during the remodeling of the rat pancreas after duct ligation. *Virchows Arch.* 2005 Jan;446(1):56-63.

Phillips RW, Frierson HF Jr, Moskaluk CA (2003): Cdx2 as a marker of epithelial intestinal differentiation in the esophagus. *Am J Surg Pathol.* 2003 Nov;27(11):1442-7.

Pinto GR, Clara CA, Santos MJ, Almeida JR, Burbano RR, Rey JA, Casartelli C (2007): Mutation analysis of gene PAX6 in human gliomas. *Genet Mol Res.* 2007 Oct 5;6(4):1019-25.
Rachdi L, El Ghazi L, Bernex F, Panthier JJ, Czernichow P, Scharfmann . (2001): Expression of the receptor tyrosine kinase KIT in mature beta-cells and in the pancreas in development. *Diabetes.* 2001 Sep;50(9):2021-8.

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

Ritz-Laser B, Estreicher A, Gauthier BR, Mamin A, Edlund H, Philippe J (2002): The pancreatic beta-cell-specific transcription factor Pax-4 inhibits glucagon gene expression through Pax-6. *Diabetologia*. 2002 Jan;45(1):97-107.

Rowan-Hull AM, Rao R, Robertson SA, Johnson PR (2009): ISL-1 is induced in stomach mesenchyme in the presence of pancreatic epithelia. *J Pediatr Surg*. 2009 Feb;44(2):348-52.

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

Schlosnagle DC, Campbell WG Jr (1981): The papillary and solid neoplasm of the pancreas: a report of two cases with electron microscopy, one containing neurosecretory granules. *Cancer*. 1981 Jun 1;47(11):2603-10.

Schonhoff SE, Giel-Moloney M, Leiter AB (2004): Neurogenin 3-expressing progenitor cells in the gastrointestinal tract differentiate into both endocrine and non-endocrine cell types. *Dev Biol*. 2004 Jun 15;270(2):443-54.

Serafimidis I, Rakatzi I, Episkopou V, Gouti M, Gavalas A (2008): Novel effectors of directed and Ngn3-mediated differentiation of mouse embryonic stem cells into endocrine pancreas progenitors. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):3-16.

Seymour PA, Freude KK, Tran MN, Mayes EE, Jensen J, Kist R, Scherer G, Sander M (2007): SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 6;104(6):1865-70.

Sommer L, Ma Q, Anderson DJ (1996): .neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol Cell Neurosci*. 1996;8(4):221-41.

Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF (1997): Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet*. 1997 Jan;15(1):106-10.

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

Suzuki C, Nagasaki H, Okajima Y, Suga H, Arima H, Iwasaki Y, Oiso Y (2007): The LIM domain homeobox gene *isl-1* is a positive regulator of glycoprotein alpha 2 (GPA2), a subunit of thyrostimulin. *Regul Pept*. 2007 Jul 5;142(1-2):60-7.

Taguchi M, Otsuki M (2004): Co-localization of nestin and PDX-1 in small evaginations of the main pancreatic duct in adult rats. *J Mol Histol*. 2004 Nov;35(8-9):785-9.

Takahashi K, Hirano F, Matsumoto K, Aso K, Haneda M (2009): Homeobox gene *CDX2* inhibits human pancreatic cancer cell proliferation by down-regulating cyclin D1 transcriptional activity. *Pancreas*. 2009 Jan;38(1):49-57.

Tamborini E, Bonadiman L, Negri T, Greco A, Staurengo S, Bidoli P, Pastorino U, Pierotti MA, Pilotti S (2004): Detection of overexpressed and phosphorylated wild-type kit receptor in surgical specimens of small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 15;10(24):8214-9.

Tanaka Y, Kato K, Notohara K, Hojo H, Ijiri R, Miyake T, Nagahara N, Sasaki F, Kitagawa N, Nakatani Y, Kobayashi Y (2001): Frequent beta-catenin mutation and cytoplasmic/nuclear accumulation in pancreatic solid-pseudopapillary neoplasm. *Cancer Res*. 2001 Dec 1;61(23):8401-4.

Tanizawa Y, Riggs AC, Dagogo-Jack S, Vaxillaire M, Froguel P, Liu L, Donis-Keller H, Permutt MA (1994): Isolation of the human LIM/homeodomain gene *islet-1* and identification of a simple sequence repeat polymorphism. *Diabetes*. 1994 Jul;43(7):935-41.

Tang WW, Stelter AA, French S, Shen S, Qiu S, Venegas R, Wen J, Wang HQ, Xie J (2007): Loss of cell-adhesion molecule complexes in solid pseudopapillary tumor of pancreas. *Mod Pathol*. 2007 May;20(5):509-13.

Tiemann K, Kosmahl M, Ohlendorf J, Krams M, Klöppel G (2006): Solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas are associated with *FLI-1* expression, but not with *EWS/FLI-1* translocation. *Mod Pathol*. 2006 Nov;19(11):1409-13.

Tiemann K, Panienska R, Klöppel G (2007): Expression of transcription factors and precursor cell markers during regeneration of beta cells in pancreata of rats treated with streptozotocin. *Virchows Arch.* 2007 Mar;450(3):261-6.

Tiemann K, Heitling U, Kosmahl M, Klöppel G (2007): Solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas show an interruption of the Wnt-signaling pathway and express gene products of 11q. *Mod Pathol.* 2007 Sep;20(9):955-60.

Treutelaar MK, Skidmore JM, Dias-Leme CL, Hara M, Zhang L, Simeone D, Martin DM, Burant CF (2003): Nestin-lineage cells contribute to the microvasculature but not endocrine cells of the islet. *Diabetes.* 2003 Oct;52(10):2503-12.

Trinh KY, Jin T, Drucker DJ (1999): Identification of domains mediating transcriptional activation and cytoplasmic export in the caudal homeobox protein Cdx-3. *J Biol Chem.* 1999 Feb 26;274(9):6011-9.

Trinh DK, Zhang K, Hossain M, Brubaker PL, Drucker DJ (2003): Pax-6 activates endogenous proglucagon gene expression in the rodent gastrointestinal epithelium. *Diabetes.* 2003 Feb;52(2):425-33.

Villasenor A, Chong DC, Cleaver O (2008): Biphasic Ngn3 expression in the developing pancreas. *Dev Dyn.* 2008 Nov;237(11):3270-9.

Wagner J (2004): Immunhistochemische Untersuchung zur Frage einer „ovariellen“ Histogenese des solid-pseudopapillaren Tumors, des seros-mikrozystischen Adenoms und des seros-oligozystischen Adenoms des Pankreas. *Med. Diss., Pathologie Kiel*

Wang GS, Rosenberg L, Scott FW (2005): Tubular complexes as a source for islet neogenesis in the pancreas of diabetes-prone BB rats. *Lab Invest.* 2005 May;85(5):675-88.

Wang P, Liu T, Li Z, Ma X, Jin T (2006): Redundant and synergistic effect of Cdx-2 and Brn-4 on regulating proglucagon gene expression. *Endocrinology.* 2006 Apr;147(4):1950-8.

Watada H, Kajimoto Y, Umayahara Y, Matsuoka T, Kaneto H, Fujitani Y, Kamada T, Kawamori R, Yamasaki Y (1996): The human glucokinase gene beta-cell-type promoter: an essential

role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells. *Diabetes*. 1996 Nov;45(11):1478-88.

Watada H (2004): Neurogenin 3 is a key transcription factor for differentiation of the endocrine pancreas. *Endocr J*. 2004 Jun;51(3):255-64.

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

Wu XS, Akiyama Y, Igari T, Kawamura T, Hiranuma S, Shibata T, Tsuruta K, Koike M, Aii S, Yuasa Y (2005): Expression of homeodomain protein CDX2 in gallbladder carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005 May;131(5):271-8.

Yashpal NK, Li J, Wang R. *Dev Dyn*. (2004): Characterization of c-Kit and nestin expression during islet cell development in the prenatal and postnatal rat pancreas. 2004 Apr;229(4):813-25.

Zaret KS, Grompe M (2008): Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science*. 2008 Dec 5;322(5907):1490-4.

Zhang YQ, Kritzik M, Sarvetnick N (2005): Identification and expansion of pancreatic stem/progenitor cells. *J Cell Mol Med*. 2005 Apr-Jun;9(2):331-44.

Zettl A, Ströbel P, Wagner K, Katzenberger T, Ott G, Rosenwald A, Peters K, Krein A, Semik M, Müller-Hermelink HK, Marx A (2000): Recurrent genetic aberrations in thymoma and thymic carcinoma. *Am J Pathol*. 2000 Jul;157(1):257-66.

Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Müller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF (2001): Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*. 2001 Mar;50(3):521-33.

7.1 Anhang

Tabelle 7.1 Klinische Daten und AK-Reaktionen

TMA	Fallnr.	Geschlecht	OP-Alter	Dignität	Größe	ckit	PDX-1	PAX6	Nestin	NGN3	ISL-1	CDX-2
I	1	//	//	//	//				30			
I/I	2	w	44	b	10	70			80			
I	3	w	28	b	6	20						
I	4											
I	5	w	31	b	7							
I	6	w	25	b	10	20						
I	7	w	36	b	8							
I	8	w	24	b	17	20			20			
I	9	w	21	b	//				30			
I	10	w	32	b	4,7	30			40			
I	11	w	19	m	13							
I	12								30			
I	13	w	31	b	2,5							
I	14	w	36	b	6	50						
I/V	15	w	48	b	7							
I	16	w	11	b	//					20		
I	17	w	10	b	4	90						
I	18	w	32	b	7	60			40			
I	19	m	43	b	8				10	40		
II	20	m	12	b	8							
II	21	m	11	b	4							
II	22					60						
II	23	w	20	m	//		70	90		40		
II	24	w	17	b	6	50			50			
II	25	w	31	b	//	40			70			
II	26	w	29	b	1,5							
II	27	w	57	b	0,4							
II	28	w	13	b	6							
II	29	m	27	b	13							
II	30	w	25	b	7				30			
II	31	w	22	b	//							
II	32	w	25	b	8							
II	33	w	13	b	//	40		80	50			
II	34	w	13	b	8,5	70						
II	35	w	35	b	9,5							
II	36	m	43	b	3,8	80						
II	37	w	52	b	2	//	//	//	//	//	//	//
II	38	w	69	b	3	60			40			
II	39	w	63	b	13	50			5			
II	40	w	53	b	//				20			
II	41	w	34	b,inv.	//	50			90			30
II	42	w	11	b	//	//	//	//	//	//	//	//
II	43	w	14	b	14	50						
II	44	w	21	b	//	90			90			
II	45	w	52	b	2	20			20			
II	46	w	25	b	8				40			
II	47	w	14	b	8				40			
II/III	48	w	27	b	7,5							

TMA		Pankreas	OP- Alter	Dignität	Größe	ckit	PDX-1	PAX6	Nestin	NGN3	ISL-1	CDX-2
I-V		EXOKRIN					a)			b)		8,3
I-V		ENDOKRIN					87,5	100			100	

a)

26
33,3
30

b)

20
17,5

Die erste Spalte bezeichnet das TMA, in das die Gewebeproben eingearbeitet sind, die zweite die Fallnummern im Archiv des Pathologischen Instituts der Universität Kiel. Die Größe entspricht dem in den Unterlagen zu findenden größten Diameter des Tumors. Die Antikörperreaktion ist nach folgendem Muster angegeben: die Färbungsintensität gemäß den Farbfeldern und der Anteil der im Präparat gefärbten Zellen in Prozent als Zahl im Kasten.

(-)
(+)
(++)
(+++)

Tabelle 7.2 Differentialanalyse der c-kit-Färbung

		Total	(-)	(+)	(++)	(+++)	Total positiv	% positiv
Geschlecht	männlich	12	8	3	0	1	4	33,3
	weiblich	75	34	31	6	4	41	54,7
Dignität	benigne	84	40	34	5	5	44	52,4
	benigne-invasiv	1	0	0	1	0	1	100
	maligne	2	2	0	0	0	0	0
Pankreas	endokrin	8	8	0	0	0	0	0
	exokrin	12	11	0	1	0	1	8,3

Tabelle 7.3 Differentialanalyse der Nestin-Färbung

		Total	(-)	(+)	(++)	(+++)	Total positiv	% positiv
Geschlecht	männlich	12	8	3	1	0	4	33,3
	weiblich	75	33	33	9	0	42	56,2
Dignität	benigne	84	39	35	10	0	45	53,6
	benigne-invasiv	1	0	1	0	0	1	100
	maligne	2	2	0	0	0	0	0
Pankreas	endokrin	8	8	0	0	0	0	0
	exokrin	12	12	0	0	0	0	0

Tabelle 7.4 Differentialanalyse der PAX 6-Färbung

		Total	(-)	(+)	(++)	(+++)	Total positiv	% positiv
Geschlecht	männlich	12	10	2	0	0	2	16,7
	weiblich	75	59	12	3	1	16	27,1
Dignität	benigne	84	67	14	2	1	17	20,2
	benigne-invasiv	1	1	0	0	0	0	0
	maligne	2	1	0	1	0	1	50
Pankreas	endokrin	8	0	0	0	8	8	100
	exokrin	12	12	0	0	0	0	0

Tabelle 7.5 Differentialanalyse der NGN 3-Färbung

		Total	(-)	(+)	(++)	(+++)	Total positiv	% positiv
Geschlecht	männlich	12	11	1	0	0	1	8,3
	weiblich	75	66	5	4	0	9	12
Dignität	benigne	84	75	5	4	0	9	10,7
	benigne-invasiv	1	1	0	0	0	0	0
	maligne	2	1	1	0	0	1	50
Pankreas	endokrin	8	7	0	1	0	1	12,5
	exokrin	11	5	4	2	0	6	63,6

Tabelle 7.6 Differentialanalyse der PDX-1-Färbung

		Total	(-)	(+)	(++)	(+++)	Total positiv	% positiv
Geschlecht	männlich	12	12	0	0	0	0	0
	weiblich	75	74	1	0	0	1	1,4
Dignität	benigne	84	84	0	0	0	0	0
	benigne-invasiv	1	1	0	0	0	1	0
	maligne	2	1	1	0	0	1	50
Pankreas	endokrin	4	0	0	0	4	4	100
	exokrin	9	0	1	3	5	9	100

Tabelle 7.7 Differentialanalyse der ISL-1-Färbung

		Total	(-)	(+)	(++)	(+++)	Total positiv	% positiv
Geschlecht	männlich	12	12	0	0	0	0	0
	weiblich	75	75	0	0	0	0	0
Dignität	benigne	84	84	0	0	0	0	0
	benigne-invasiv	1	1	0	0	0	0	0
	maligne	2	2	0	0	0	0	0
Pankreas	endokrin	8	0	0	0	8	8	100
	exokrin	12	12	0	0	0	0	0

Tabelle 7.8 Differentialanalyse der CDX-2-Färbung

		Total	(-)	(+)	(++)	(+++)	Total positiv	% positiv
Geschlecht	männlich	12	12	0	0	0	0	0
	weiblich	75	74	0	1	0	1	1,3
Dignität	benigne	84	84	0	0	0	0	0
	benigne-invasiv	1	0	0	1	0	1	100
	maligne	2	2	0	0	0	0	0
Pankreas	endokrin	8	8	0	0	0	0	0
	exokrin	11	4	5	2	0	7	63,6

7.2 Bildmaterial

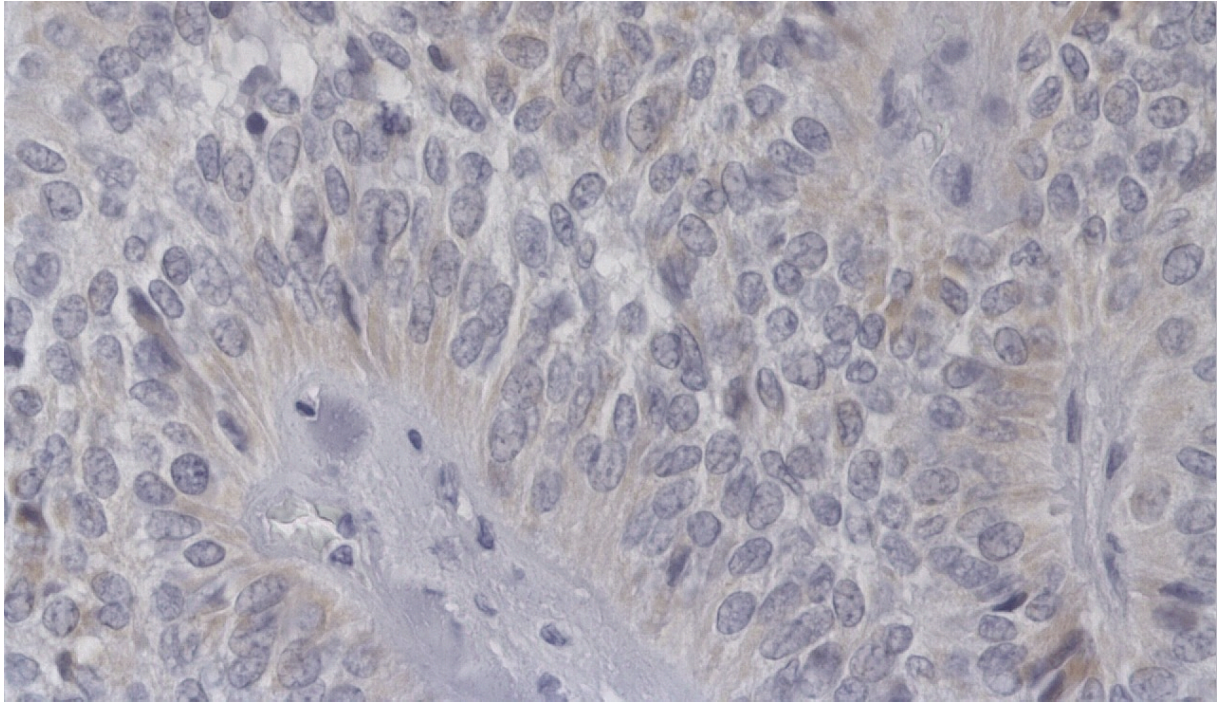


Abbildung 1 (400x) zeigt die baumkronen-/palisadenartige Anordnung c-kit-positiver Zellen rund um ein Bindegewebs-septum mit schwacher Antikörper-Reaktion im pseudopapillären Teil der SPN.

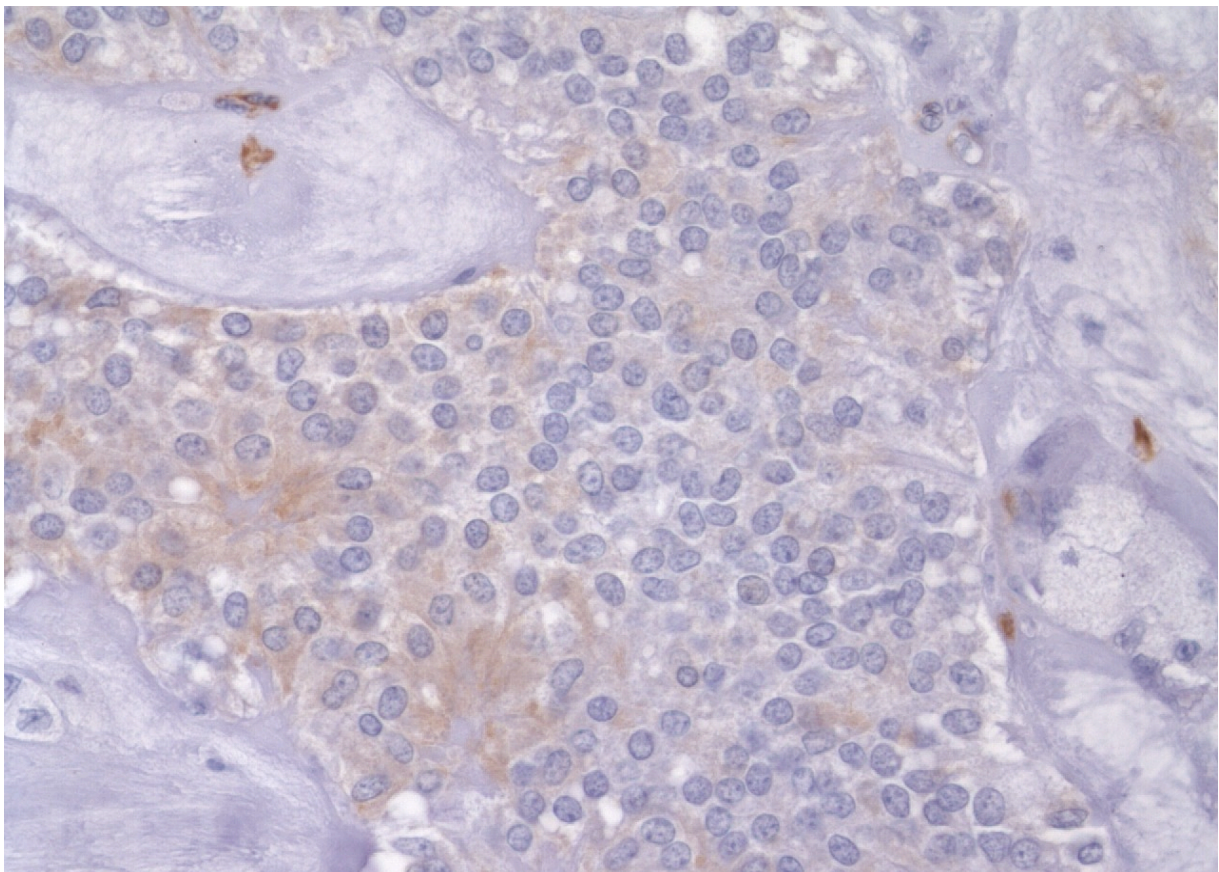


Abbildung 2 (400x) gibt einen Eindruck Nestin-positiver Zellen in der SPN mit mäßiger Färbungsintensität und dem typischen, der c-kit-Färbung ähnlichen Verteilungsmuster. Nebenbefundlich erkennt man die starke Reaktion der Gefäßendothelien auf den Nestin-Antikörper.

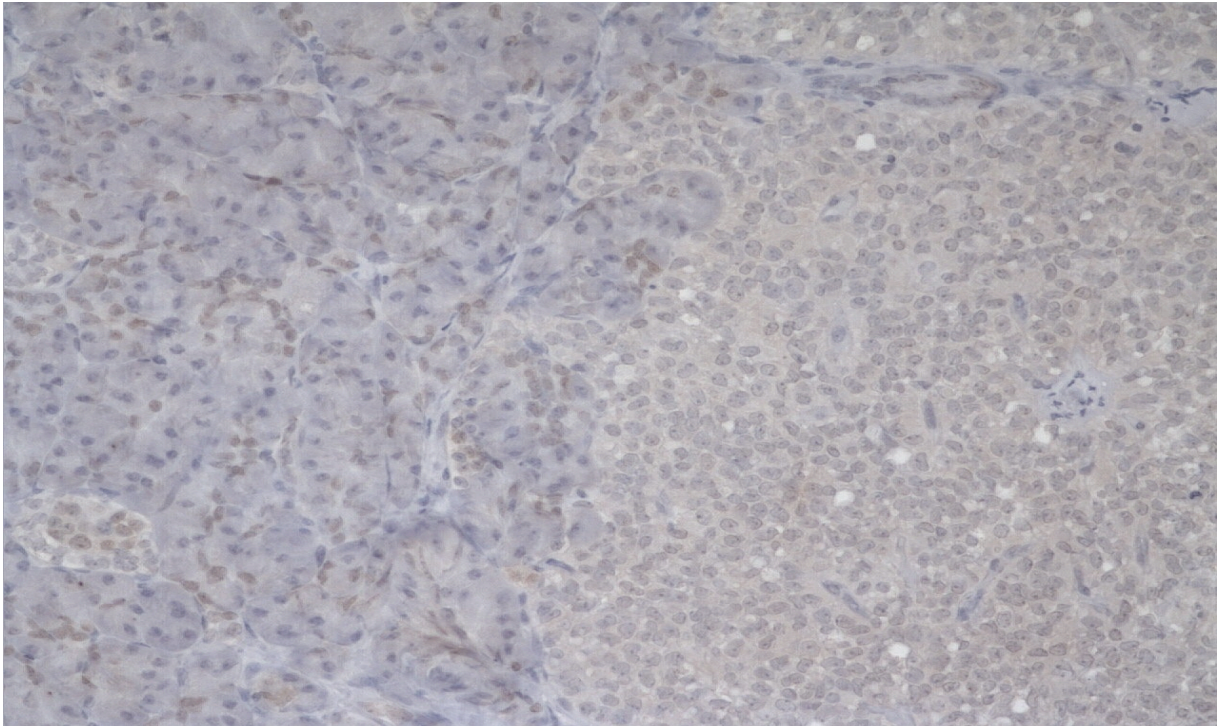


Abbildung 3 (200x) verdeutlicht zentralerlei: Die linke Seite des Bildes zeigt reguläres Pankreasgewebe mit der beschriebenen Anfärbbarkeit für PDX-1: 87,5% aller endokrinen und ungefähr ein Drittel aller exokrinen Zellen reagieren. Im Vergleich dazu auf der rechten Bildhälfte die hier solide SPN, deren Farbreaktion in vorangehenden Studien als positiv, bei uns als Hintergrundfärbung gewertet wurde.

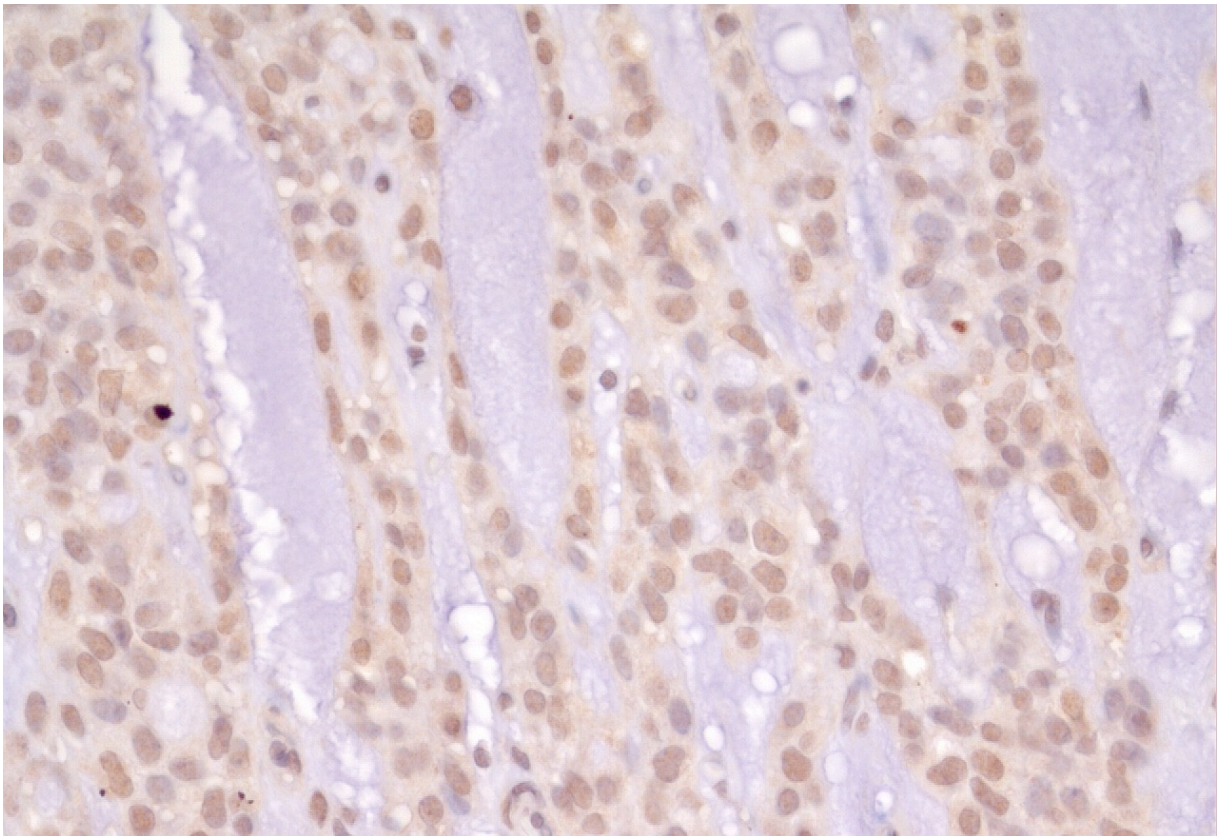


Abbildung 4 (400x) gibt ein weiteres Beispiel für die vielgestaltige Morphologie der SPN und die in nur 19,8% der Fälle aber dann fast alle Zellen des Präparats betreffende starke PAX-6-Färbung.

8. Danksagung

Mein Dank gilt dem ehemaligen und dem heutigen Institutsleiter der Kieler Pathologie, den Herren Professores Dr. med. Günter Klöppel und Dr. med. Christoph Röcken, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Pankreaslabor.

Besonders möchte ich meiner Doktormutter, Frau PD Dr. med. Katharina Tiemann, für ihre fachliche Unterstützung, das Dissertationsthema, die vielen Ratschläge aus Nah und Fern und die gute Zusammenarbeit danken.

Frau Maike Pacena und ihren KollegInnen danke ich für die unverzichtbare Hilfe beim Erstellen des zweiten Kapitels und für ihre Arbeit im Rahmen der Herstellung der Präparatschnitte und Antikörperfärbungen.

Ebenso möchte ich allen Mitarbeitern der Kieler Pathologie danken, die mich bei der Archivarbeit und der Literaturrecherche unterstützt haben, genau wie meinen dissertierenden Vorgängern.

Zu guter Letzt sage ich sowohl meiner Freundin Teresa Meyer und meiner Familie Dank für die Unterstützung - besonders auch meiner rechtschreibversierten Schwester – als auch meinen verständnisvollen Lerngruppen und meinen Freunden (aus Kiel und Cloppenburg).

9. Lebenslauf

Zur Person: Matthias Frank Herzog

geb. am 15. März 1983 in Löningen

Schule und Zivildienst

08/1989 - 07/1995 Grundschule und Orientierungsstufe Lastrup

08/1995 - 05/2002 Clemens-August-Gymnasium Cloppenburg

Abschluss: **Allgemeine Hochschulreife, Graecum, Latinum**

09/2002 - 05/2003 Zivildienst im St.Vincenz-Haus Bethen

Medizinstudium

10/2003 - 08/2005 Vorklinik (4 Semester) an der CAU Kiel

Abschluss: **Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

10/2005 - 07/2008 Klinischer Abschnitt (6 Semester) am UKSH, Campus Kiel

Abschluss: **Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

Praktika und Famulaturen

02/2006 - 03/2006 Unfallchirurgie am St.Josef-Hospital, Cloppenburg

02/2007 - 03/2007 Internistische Aufnahmestation am St.Josef-Hospital, Cloppenburg

07/2007 - 08/2007 Anästhesie am St.Josef-Hospital, Cloppenburg

08/2007 - 09/2007 Allgemeinmedizin in der Praxis Dres. Bloem/Stamm, Elmschenhagen

02/2008 - 03/2008 Allgemeine Pädiatrie in Uni-Klinikum Kiel

Praktisches Jahr

08/2008 - 12/2008 Innere Medizin in der 1. Medizin des UKSH, Campus Kiel

12/2008 - 02/2009 Chirurgie am Städtischen Krankenhaus Kiel

02/2008 - 04/2009 Chirurgie an der Chirurgia ogólna Kraków, Polen

04/2009 - 07/2009 Allgemeinmedizin in der Praxis Dres. Bloem/Stamm, Elmschenhagen

Zur Zeit:

seit 12/2009 Arzt in Weiterbildung in der I. Inneren Medizin des UKSH, Campus Kiel

Dissertation:

07/2007 - 03/2010 im Institut für Pathologie der Universität Kiel