

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie
mit den Sektionen Molekularpathologie und Zytopathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

Diagnostische und prognostische Bedeutung der Expression von Cytokeratin 13 in menschlichen Tumoren und Normalgeweben: Eine Tissue-Microarray-Studie an 10.439 Tumoren

Dissertation

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

vorgelegt von:

Verena Sofia Ullmann
aus München

Hamburg 2022

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 09.03.2023

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. Reinhard Friedrich

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

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
1.1	Das Zytoskelett	4
1.2	Intermediärfilamente	5
1.3	Keratine	7
1.4	Cytokeratin 13.....	10
1.4.1	CK13 in Normalgeweben.....	11
1.4.2	Allgemeine Pathologie	12
1.4.3	CK13 in Tumoren.....	12
1.5	Zielsetzung	20
2.	Material und Methode	21
2.1	Tissue-Microarray Technik	21
2.2	TMA's für das CK13-Projekt.....	27
2.3	Immunhistochemie.....	34
2.4	CK13-Immunhistochemie	37
2.5	Statistik	39
3.	Ergebnisse.....	40
3.1	Technische Aspekte	40
3.2	CK13 Expression in Normalgeweben.....	40
3.3	CK13 in Tumoren.....	49
3.4	CK13 und Tumorphänotyp in Urothel- und Plattenepithelkarzinomen.....	61
4.	Diskussion	66
5.	Zusammenfassung	87
6.	English Summary.....	88
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	89
8.	Literaturverzeichnis.....	91
9.	Danksagung.....	113
10.	Lebenslauf	114
11.	Eidesstattliche Erklärung	115

1. Einleitung

1.1 Das Zytoskelett

Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen ist eine komplizierte und vielseitige Struktur, die drei hauptsächliche Funktionen erfüllt: die räumliche Organisation des Zellinhalts, die physische und biochemische Verbindung der Zelle zur äußeren Umgebung und die Erzeugung koordinierter Kräfte zur Bewegung und Formveränderung der Zelle. Durch die Etablierung einer Ordnung im Zytoplasma verhilft es der Ansammlung von allerlei Molekülen zu Organisation und Lebensfähigkeit (Hohmann & Dehghani, 2019). Das Wort „Skelett“ impliziert fälschlicherweise eine feste Struktur mit isolierter Funktion (Fletcher & Mullins, 2010). Es handelt sich dabei vielmehr um eine dynamische und anpassungsfähige Struktur aus Polymeren und regulatorischen Proteinen, die sich in ständigem Wandel befindet. Es gibt drei Haupttypen von Zytoskelettpolymeren: Aktinfilamente, Mikrotubuli und eine Gruppe von Polymeren die zusammen als Intermediärfilamente (IF) bezeichnet werden (Abb. 1, 2). Deren wichtigste Unterschiede liegen in ihrer mechanischen Steifigkeit, der Dynamik ihres Zusammenbaus, ihrer Polarität und der Art der molekularen Motoren, mit denen sie assoziiert sind (Fletcher & Mullins, 2010). Zusammen bilden Sie ein hochgradig strukturiertes und dynamisches Netzwerk, das auf externe und interne Signale schnell mit Reorganisation reagieren kann (Hohmann & Dehghani, 2019).

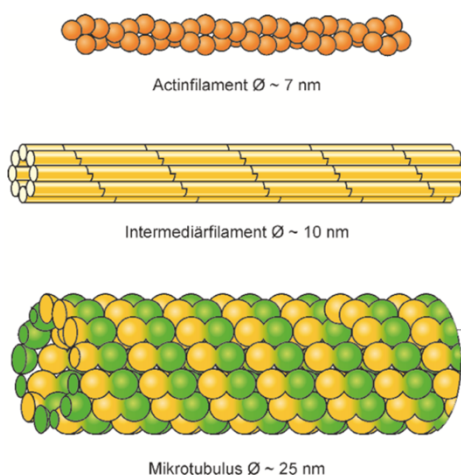


Abb. 1: **Zytoskelettkomponenten.** (aus: Müller-Esterl, 2018, S. 466)

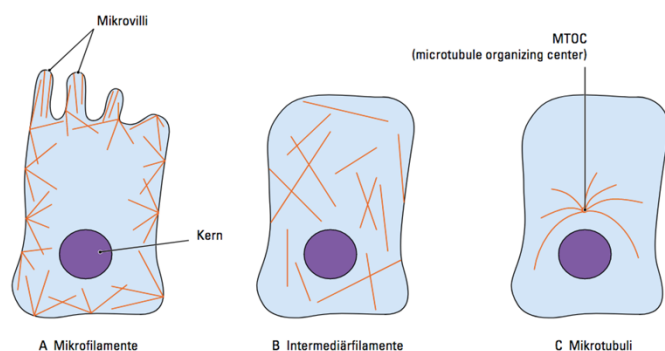


Abb. 2: **Intrazelluläre Anordnung der Zytoskelettkomponenten.** (aus: Medi-Learn Skript Biologie 1, Abb.13)

1.2 Intermediärfilamente

Im Gegensatz zu Mikrotubuli und Aktinfilamenten sind IF apolar und können keine gerichtete Bewegung von Molekülmotoren unterstützen (Fletcher & Mullins, 2010). Die organisierten Filamente haben einen Durchmesser von ca. 10nm. Dieser Tatsache verdanken sie ihren Namen, der sich auf ihre intermediäre Rolle zwischen den dünnen Aktinfilamenten (6nm) und dicken Myosinfilamenten (23nm) bezieht (Fuchs & Weber, 1994). Sie sind außerdem die am wenigsten steifen Zytoskelettpolymere und sind Zugkräften gegenüber widerstandsfähiger als Druckkräften gegenüber. Da sie insgesamt also eine widerstandsfähigere Komponente des Zytoskeletts darstellen, bauen viele Zelltypen IF als Reaktion auf mechanische Belastungen auf (Robert et al., 2016; Wagner et al., 2007). Durch Plectine können sie sowohl untereinander als auch mit Aktinfilamenten und Mikrotubuli vernetzt werden (Wiche, 1998). Durch mehr als 70 Gene kodiert, bilden die IF-bildenden Proteine eine große Proteinklasse (Qin et al., 2010). Die monomeren Proteinkomponenten werden nach ihrer Struktur und Sequenzhomologie in sechs Klassen unterteilt, die in teils bestimmten Kombinationen zelltypspezifisch konstant exprimiert werden (Tabelle 1) (Coulombe et al., 2001).

Klasse	Typ	Anzahl Gene	Größe (kDa)	Zelltyp
I	Saure Keratine	28	40-70	Epithelzellen
II	Basische Keratine	26	40-70	Epithelzellen
III	Vimentinähnliche Proteine			
	Saures fibrilläres Gliaprotein	1	51	Gliazellen
	Desmin	1	53	Muskelzellen
	Vimentin	1	54	Fibroblasten, Endothelzellen, Leukozyten
	Peripherin	1	57	Peiphere und zentrale Neuronen
IV	Neurofilamentproteine	5	66-240	Axone
V	Kernlamine A-C	3	60-75	Kernlamina
VI	Nestin	1	240	Neuronale Vorläufer- und Stammzellen

Tabelle 1: **Klassifizierung der Intermediärfilamente.** Adaptiert aus: (Bernal & Arranz, 2018; Müller-Esterl, 2018, S. 469)

IF haben allesamt eine ähnliche Monomerstruktur aus einer hoch konservierten, ca. 45nm langen zentralen α -Helix, die von variablen, nicht α -helikalen N- und C-terminalen „Kopf“- und „Schwanz“-Domänen flankiert wird (Fuchs & Weber, 1994; Herrmann & Aebi, 2004). Jeweils zwei solcher Monomere verbinden sich parallel gewunden zu sogenannten „Coiled-coil-Dimeren“, die als Grundbaustein der IF gelten (Herrmann et al., 2007; Smith et al., 2002). Durch antiparallele Assoziation bilden diese Dimere Tetramere mit überstehenden Enden, die linear zu Protofilamenten aggregieren. Die laterale Assoziation acht solcher Protofilamente bildet schließlich ein IF (Sokolova et al., 2006; Suo et al., 1993). Dieses wird daraufhin weiter verdichtet, wobei der Filamentdurchmesser auf seine endgültige Größe von ca. 10nm sinkt (Abb. 3) (Herrmann et al., 1999; Strelkov et al., 2003).

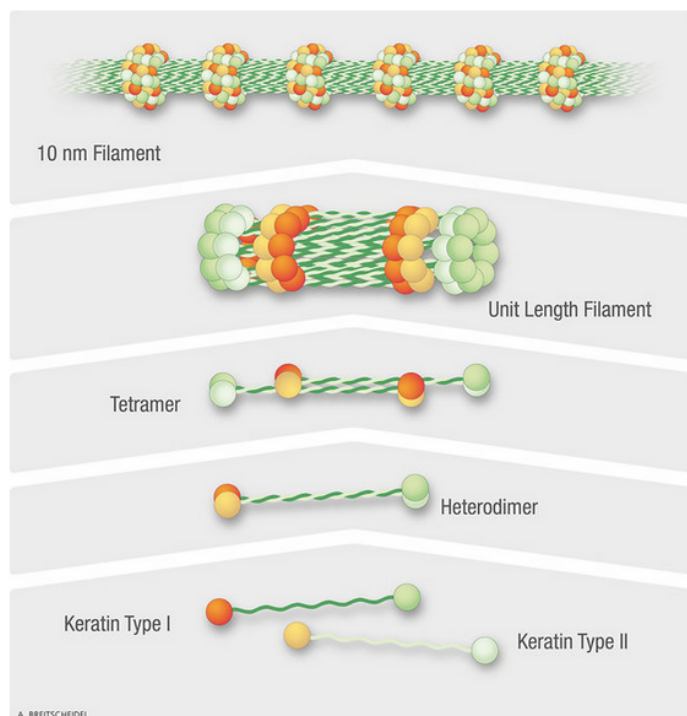


Abb. 3: **Polymerisation der Intermediärfilamente.**
Am Beispiel von Keratin. (aus: Yoon & Leube, 2019)

Innerhalb der Zelle bilden zytoplasmatische IF ein dichtes Geflecht, das sich hauptsächlich im perinukleären Raum befindet, aber auch den Kortex erreicht, wo IF mit Desmosomen und Hemidesmosomen interagieren, um die Zell- und Gewebeadhäsion aufrechtzuerhalten (Chang & Goldman, 2004; Jones et al., 2017). Funktionell sind IF entscheidend für biomechanische

Schlüsselfunktionen wie Zellmigration, Zellteilung und Mechanotransduktion (Fudge et al., 2008; Wang et al., 1993). Sie werden auch als „Sicherheitsgürtel der Zelle“ bezeichnet, die eine übermäßige Dehnung verhindern (van Bodegraven & Etienne-Manneville, 2021).

IF Proteine werden hochgradig zelltypspezifisch exprimiert, darin repräsentieren Keratine die typische IF Kategorie der epithelialen Zellen (Moll et al., 2008).

1.3 Keratine

Keratine sind die IF der epithelialen Zellen und stellen aufgrund ihrer hohen molekularen Diversität eine außergewöhnliche Subgruppe dar (Moll et al., 2008). Eine erste, 1982 von Moll et al. verfasste Nomenklatur ist aufgrund der seitdem erfolgten systematischen Sequenzierung des humanen Genoms und der damit einhergegangenen Identifizierung weiterer Keratin-kodierender Gene überholt und durch die 2006 von Schweizer et al. veröffentlichte „Neue Konsensus Nomenklatur“ abgelöst worden. Eingeteilt werden die Keratine darin nach absteigendem Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt. (Moll, Franke, et al., 1982; Schweizer et al., 2006). Heute sind bei Menschen 54 funktionelle Keratin-Gene bekannt und bilden damit den größten Anteil der IF (Kim & Coulombe, 2007). Sie unterteilen sich in 28 Gene der Typ-I (saure) und 26 Gene der Typ-II (basische) Keratine, die in zwei Clustern, bestehend aus jeweils 27 Genen, auf den Chromosomen 17q21.2 und 12q13.13 zu finden sind. Das Typ-I Keratin 18 findet sich als Ausnahme in der Typ-II Gendomanie (Hesse et al., 2004). Die Keratine lassen sich in epitheliale Keratingene, Haarkeratingene und Keratin Pseudogene unterteilen. Zu den Typ-I Keratinen gehören K9-10,12-28,31-40 (davon 17 epithelial, 11 Haar), zu den Typ-II Keratinen gehören K1-8,71-86 (davon 20 epithelial, 6 Haar) (Schweizer et al., 2006). Um die intrazytoplasmatischen Keratine von den spezialisierten Haare und Nägel bildenden Keratinen zu unterscheiden, werden sie als Cytokeratine (CK) bezeichnet (de Moura Castro Jacques et al., 2003). Funktionell können Keratine dann in drei Subgruppen unterteilt werden, dies sind die Cytokeratine einschichtiger Epithelien, die der mehrschichtigen Epithelien und die strukturellen Keratine von Haaren und Nägeln (Haines & Lane, 2012).

Der für IF typische Aufbau setzt sich zusammen aus einer 310 Aminosäuren langen zentralen Stabdomäne in α -helikaler Konformation, flankiert durch die nicht α -helikalen, variabel langen N- und C- terminalen Kopf- und Schwanz-Domänen (Parry et al., 2007; Steinert et al., 1984). Ein Alleinstellungsmerkmal ist die darauffolgende, obligate Bildung von Heterodimeren durch parallele Assoziation von Typ-I und Typ-II Keratinpolypeptiden zu einer doppelsträngigen Coiled-Coil. Die aus antiparalleler, überlappender Zusammenlagerung dieser Heterodimere resultierenden Tetramere polymerisieren zu längeren Ketten und bilden den Grundbaustein der Keratinfilamente (Lu & Lane, 1990).

Die wichtigste Funktion der Keratine liegt in der Wahrung mechanischer Stabilität und Widerstandsfähigkeit der Epithelzellen gegen Stress (Hesse et al., 2004). Sie bilden ein Netzwerk durch das gesamte Zytoplasma, umspannen den Zellkern und erreichen an den Innenseiten der Zellmembran die Desmosomen und Hemidesmosomen (Abb. 4, 5). Diese Plaques bilden die Zell-Zell-Adhäsionskomplexe und helfen beispielsweise, mechanische Kräfte auf benachbarte Zellen zu übertragen (Jones & Green, 1991; Meng et al., 1998). Das Zytoskelett wird physisch an der Zellmembran verankert, indem die Kopfdomänen der Keratinfilamente über Desmoplakin (DSP) an die Desmosomen inserieren, die wiederum über Cadherinmoleküle wie Plakoglobin (PG) Zell-Zellkontakte herstellen. Analog inserieren sie über Plectin an Hemidesmosomen, wodurch die Verbindung zur extrazellulären Matrix geschaffen wird. (Acehan et al., 2008; Bornslaeger et al., 1996; Kouklis et al., 1994; Rezniczek et al., 1998). Dieser Prozess suggeriert, dass Keratine neben der Stabilität der einzelnen Epithelzellen auch die Integrität der Zellverbandes wahren (Hanakawa et al., 2002; Waschke, 2008). Mutationen resultieren daher in einer breiten Reihe von Gewebefragilitäts-Syndromen (Herrmann et al., 2003).

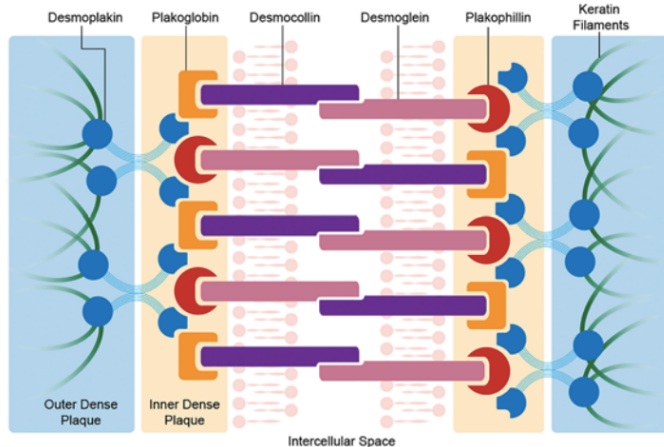


Abb. 4: **Desmosomen**. (aus: Yoon & Leube, 2019)

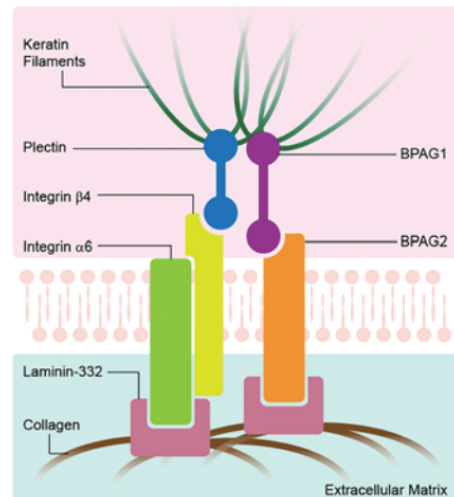


Abb. 5: **Hemidesmosomen**. (aus: Yoon & Leube, 2019)

Über diese Rolle als statische Skelettstrukturen hinaus wurde gezeigt, dass Keratine auch hochdynamische Funktionen innehaben. Dazu gehören der Schutz der Zelle vor Apoptose, die Regulation der Proteinbiosynthese und der Zellgröße bspw. während der Wundheilung, sowie eine Rolle in der Epithelpolarität und dem Membranverkehr (Caulin et al., 2000; Kim et al., 2006; Ku et al., 2003; Oriolo et al., 2007). Auch eine Rolle in der Interkommunikation zwischen Zellen wird vermutet (Ishida-Yamamoto et al., 2002; Oshima, 2002). Dass gewebespezifisch funktionelle Unterschiede vorliegen, lässt sich anhand der unterschiedlichen Expressionsmuster nachvollziehen und wird vermutlich durch gezielte Regulierung der Gentranskription erreicht (Magin et al., 2007).

Neben ihren biologischen Funktionen sind die Expressionsmuster der Keratine auch charakteristisch für verschiedene Stadien der zellulären Differenzierung. Im Laufe einer malignen Transformation verlieren epitheliale Tumoren und deren Metastasen das Keratin-Expressionsmuster ihres Ursprungsgewebes/Zelltyps in der Regel nicht. Diese wichtige Eigenschaft findet unter Zuhilfenahme spezifischer Antikörper in der immunhistochemischen Zell- und Tumortypisierung Anwendung, wenn klinische Daten und konventionelle Histopathologie nicht ausreichen. Die Auswertung der Keratinprofile ist besonders hilfreich im Falle schlecht differenzierter Histologie, der Ausbreitung von Karzinomen über mehrere Organe und vor allem Metastasen eines unbekanntem Primärtumors. Die Kombination einer großen Anzahl an Genen

und der für Zelltyp und Differenzierungsstatus charakteristischen Expressionsmuster hat die Keratine zu einem der bedeutendsten Epitheldifferenzierungs- und Tumormarker werden lassen. (Moll et al., 2008). Der sorgfältig ausgewählte Einsatz von diagnostisch relevanten Keratin-Antikörpern – gegebenenfalls als Teil eines Panels zusammen mit anderen Tumortyp-Markern – ist in der modernen klinischen Pathologie zum diagnostischen Standard geworden. Seit 1980 wurden viele Arbeiten zu den Anwendungsmöglichkeiten der Keratine als Tumormarker veröffentlicht. Allerdings haben bisher von den 54 bekannten humanen Keratinen nur wenige tatsächliche diagnostische Bedeutung erlangt (Chu & Weiss, 2002; Dabbs, 2006; Lane & Alexander, 1990; Moll, 1998; Nagle, 1994; Schaafsma & Ramaekers, 1994).

1.4 Cytokeratin 13

Cytokeratin 13 (CK13) gehört zu den sauren Typ-I Keratinen und wird auf Chromosom 17q21.2 kodiert (Romano et al., 1992; Schweizer et al., 2006; Waseem et al., 1998). Es liegt entsprechend der Heterodimer-Konformation in der Regel gepaart mit dem basischen Typ-II Keratin 4 vor (Moll et al., 2008). Es wird davon ausgegangen, dass diese Dimerisierung von CK4 und CK13 beim Übergang von der Parabasalschicht zur Stachelzellschicht stattfindet (Takashima et al., 2012). Die Kombination CK13/4 zeigt in den inneren nicht-verhornenden, mehrschichtigen Plattenepithelien die mukosale Keratinozytendifferenzierung an (Cooper et al., 1985; Moll, Franke, et al., 1982). Zu den anderen Keratinen, die in mehrschichtigen nicht-verhornenden Plattenepithelien anzutreffend sind, gehören CK6/16 und seltenerweise CK1/10 im suprabasalen Kompartiment, sowie CK5/14, CK15 in der Basalzellschicht. Neben Plattenepithelien wird CK13 auch gemeinsam mit anderen Keratinen überwiegend in Urothel exprimiert, dazu gehören CK8/18, CK7/19, CK5/14, CK17 und CK10. Letzteres findet sich in den von CK13 ausgesparten Deckzellen (umbrella cells) (Moll et al., 2008).

1.4.1 CK13 in Normalgeweben

CK13 ist das charakteristische saure Keratin der suprabasalen Schichten von nicht-keratinisierenden, mehrschichtigen Plattenepithelien, wo es zusammen mit seinem komplementären Partner CK4 exprimiert wird (Moll et al., 2008). In immunhistochemischen Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern wurde gezeigt, dass CK13 im gesamten suprabasalen Kompartiment nicht-verhornender mehrschichtiger Plattenepithelien vorhanden ist, wohingegen das basale Kompartiment vor allem die Kombination aus CK5/14 exprimiert (Moll et al., 1988; van Muijen et al., 1986). Zu den Organen mit CK13 Expression in suprabasalen Schichten von nicht-verhornendem mehrschichtigem Plattenepithel gehören Mundhöhle, Tonsillen, Larynx, Ösophagus, Analkanal, Zervix uteri und Vagina (Itakura et al., 1996; Malecha & Miettinen, 1991; Moll, Franke, et al., 1982; van Bommel et al., 1994; van Muijen et al., 1986). Es gilt hervorzuheben, dass CK13 in der Epidermis und den adnexalen Strukturen komplett fehlt (Moll et al., 2008; Moll, Franke, et al., 1982; van Muijen et al., 1986). Dabei liegt eine Besonderheit darin, dass eine vorübergehende Expression in sich bildenden Keratinozyten der fetalen Epidermis nachweisbar ist, in den Keratinozyten der reifen Epidermis aber fehlt (Moll, Moll, et al., 1982; Sun et al., 1985; Van Muijen et al., 1987). Ein Nachweis von CK13 ohne CK4 konnte auch in der regenerierenden Epidermis erbracht werden und könnte somit generell für Unreife der Epidermis charakteristisch sein (Kallioinen et al., 1995). Ausnahmen mit kontinuierlicher Expression bilden die Vorhaut des Penis und die Analepidermis (Kuruc et al., 1989).

Neben Plattenepithel ist auch die Expression in Zellen des Urothels von Nierenbecken, Harnleiter und Harnblase charakteristisch (Achtstätter et al., 1985). Im Gegensatz zu Plattenepithel macht CK13 hier den Hauptbestandteil der Basal- und Intermediärzellen aus und fehlt lediglich in den oberflächlichen Deckzellen (umbrella cells) (Moll et al., 2008). Interessanterweise zeigt sich im Verlauf der urothelialen Differenzierung ein Wechsel von einem KRT13 niedrigen/KRT14 hohen zu einem KRT13 hohen/KRT14 niedrigem Phänotyp (Southgate et al., 2007).

Jüngst wurde eine CK13 Anreicherung in Tubulus-initiiierenden Zellen (TIC) der Prostata nachgewiesen, die im übrigen Gewebe kein CK13 aufweist (Liu et al., 2016). Desweiteren wurde CK13 Reaktivität im Schmelzorgan der Zähne und der an der Zahnentwicklung beteiligten Zahnleiste nachgewiesen, und mit der Nähe zu oralem Oberflächenepithel begründet (Crivelini et al., 2003; Domingues et al., 2000). Die CK13 Expression in den Epithelien der Konjunktiva und Limbus corneae des Auges, ergo der nicht-kornealen Epithelien gilt als erwiesen und ist nützlich in der Diagnose limbaler Stammzellinsuffizienz (LSCD) (Ramirez-Miranda et al., 2011).

1.4.2 Allgemeine Pathologie

Es wurde nachgewiesen, dass Mutationen in den Helix-Initiations- oder Terminationsmotiven (HIM bzw. HTM) den sogenannten weißen Schwammnävus verursachen (Lane & McLean, 2004). Es handelt sich hierbei um eine seltene, autosomal-dominant vererbte Schleimhauterkrankung mit pathologischer Veränderung der nicht-verhornenden Plattenepithel-Differenzierung, deren klinische Manifestation die Gewebeverteilung der Keratine anschaulich darstellt. Das klinische Bild präsentiert sich als bilaterale, weiße, dicke, weiche Plaques der oralen Mukosa, vor allem im Bereich der Wangenschleimhaut. In seltenen Fällen konnten auch Nachweise in der Nase, Ösophagus, Genitalien und Rektum erbracht werden. Histologisch zeigt sich ein verdicktes, schwammartiges Epithel mit hydropischer Schwellung der suprabasalen Epithelzellen. Ursächlich sind 5 Punktmutationen des CK13 Gens im Bereich der hoch-konservierten zentralen Stabdomäne, die ausschlaggebend für die Stabilität des Gefüges ist. (Jorgenson & Levin, 1981; Moll et al., 2008; Richard et al., 1995; Rugg et al., 1999; Shibuya et al., 2003; Terrinoni et al., 2001)

1.4.3 CK13 in Tumoren

CK13-Antikörper färben neben den genannten Normalgeweben i.d.R. auch aus diesen hervorgegangene Tumorgewebe. In Plattenepithelkarzinomen (PeCa) verschiedener, physiologischerweise CK13 exprimierender Organe scheint sich das Expressionsmuster entgegen einer auf Normalgewebeexpression

basierenden Erwartung in die zwei folgenden Kategorien einteilen zu lassen. Solche mit einer Herabregulation der Expression bis hin zu nur fokalem Auftreten, und dem gegenüber solche mit komplettem Verlust der Expression, letztere Kategorie mit entschieden seltenerem Vorkommen (Malecha & Miettinen, 1991; Vaidya et al., 1989).

Die bezüglich ihres CK13 Expressionsverhaltens wohl am umfangreichsten untersuchte Entität ist die der oralen Plattenepithelkarzinome. Der immunhistochemisch vielfach festgestellte Verlust der CK13 Expression in Dys- und Neoplasien konnte in neueren Studien auch auf genetischer Ebene bestätigt werden. So wurde eine Herabregulierung des CK13 Gens in oralen PeCa mittels RT-PCR festgestellt (Hartanto et al., 2015; Ida-Yonemochi et al., 2012; Lallemand et al., 2009). Ein Verlust der Expression von CK4/13 ist demnach essenziell für eine genaue Einstufung und das wichtigste Merkmal oraler epithelialer Dysplasien und oraler PeCa (Sakamoto et al., 2011). Der Expressionsverlust geht dabei kontinuierlich mit zunehmender Schwere der epithelialen Dysplasie einher (Farrukh et al., 2015; Ohkura et al., 2005; Schaaij-Visser et al., 2010). Mit dem CK13 Verlust geht eine erhöhte CK17 Expression einher, was neben immunhistochemischen Analysen auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden konnte (Kitamura et al., 2012; Mikami et al., 2011; Whipple et al., 2004). Daher wurde die Relation von CK13/17 als Marker für die Diagnose prämaligener Läsionen mit hohem Transformationspotenzial empfohlen (Kitamura et al., 2012). Ein Panel-Ansatz bestehend aus den immunhistochemischen Profilen für CK13,17,19 und Ki-67 könnte für die Auswertung der zellulären Differenzierung dienen und somit als objektives Hilfsmittel in der Unterscheidung zwischen Karzinomata in situ (CIS) und Dysplasien von Nutzen sein (Mikami et al., 2011). In Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs wurde CK13 aufgrund seines Verlusts in Tumorgewebe gegenüber Normalgewebe bereits als Biomarker für die Diagnose der Erkrankung und die Überwachung von deren Fortschreiten vorgeschlagen (Baker et al., 2005). Dem gegenüber wird CK17 in Normalgewebe des Kopf- und Halsbereichs nicht exprimiert, dafür, wie auch in oralen Läsionen, deutlich in dysplastischem Epithel (Xu et al., 2018). Ein Muster von CK13(-)/CK17(+) wurde daher auch hier als Biomarker für die Diagnose prämaligener Läsionen mit hohem Transformationspotenzial empfohlen

(Kitamura et al., 2012). Analog zu der Situation in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Hals-Bereichs und der Mundhöhle wurden auch in PeCa der Zervix uteri ein Verlust der CK13 und Anstieg der CK17 Expression als Biomarker für eine maligne Transformation präinvasiver Stadien vorgeschlagen. Auch der Verlust der Expression von CK10 und 13 könnte als Marker für Malignität in Frage kommen (Carrilho et al., 2004). In zwei frühen Studien fehlte CK13 in Plattenepithelkarzinomen der Haut (Kuruc et al., 1989; Moll, 1998). Die Tauglichkeit von CK13 als Marker plattenepithelialer Herkunft wurde bereits infrage gestellt durch den Nachweis der CK13 Expression in Adenokarzinomen des Ösophagus, der Kardia, des Magenantrums oder der Zervix uteri (Nair et al., 1997; Raspollini et al., 2007; Tanière et al., 2001).

Auch in Urothelkarzinomen soll die CK13 Expression in Übereinstimmung mit dem Normalgewebe meistens zumindest fokal erhalten bleiben. Sowohl in nicht invasiven als auch invasiven Urothelkarzinomen wurde das gesamte typische Keratin-Expressionsmuster, das neben CK13 auch CK5, 7, 8, 17, 18, 19, 20 inkludiert, als relativ gut konserviert beschrieben (Moll, 1998; Southgate et al., 1999). Die geringere CK13 Expression in Karzinomen als in entsprechenden Normalgeweben wurde als potenzieller Indikator für epithelial-mesenchymale Transition (EMT), also eine Dedifferenzierung epithelialer Tumorzellen in einen mesenchymalen Phänotyp, und eine damit einhergehende erhöhte Zellplastizität vorgeschlagen. Eine EMT begünstigt die Infiltration in umliegendes Gewebe und die Metastasierung von Tumorzellen (Dave et al., 2012; De Craene & Berx, 2013; van der Horst et al., 2012; Worst et al., 2014). Gemeinsam mit einer verringerten Expression von IL1RN wurde der CK13 Verlust als häufiges Merkmal von Urothelkarzinomen der Harnblase und Indikator einer aggressiven Erkrankung eingestuft (Worst et al., 2014). Auch andere Studien fanden einen teilweisen oder vollständigen Verlust der CK13 Expression in fortgeschrittenen Stadien bzw. G3 Urothelkarzinomen vor (Celis et al., 1996; Moll et al., 1988; Moll et al., 2008; Schaafsma et al., 1990; Southgate et al., 1999).

Die Prostata ist eines der Organe, in deren Gewebe physiologischerweise keine CK13 Expression bekannt ist. Laut Li et al. scheint eine de novo Expression von CK13 die Bildung von Knochen- und Hirnmetastasen von Prostatakarzinomen über einen unbestimmten, RANKL-unabhängigen Mechanismus zu fördern (Q.

Li et al., 2016). Eine andere Studie fand, dass CK13 in benignen Tubuli-initiierenden Stammzellen (TIC) angereichert ist. Eine CK13 Expression wurde auch hier mit einer erhöhten Aggressivität der Karzinome in Verbindung gebracht und stellt daher einen wichtigen Biomarker für ungünstige Prognosen dar (Liu et al., 2016). Jüngst wurde CK13 auch mit dem Fortschreiten und der Metastasierung von Mammakarzinomen in Verbindung gebracht. Es konnte in vitro gezeigt werden, dass eine CK13 Überexpression zu einer erhöhten Proliferation, Migration und Invasion von Mammakarzinomzellen führte, sowie zu Tumorbildung und Metastasierung in vivo, während eine Unterdrückung von CK13 diese Auswirkungen abschwächte (Yin et al., 2022). Obwohl v.a. CK19 routinemäßig für die Differenzierung von Cholangiokarzinomen und hepatozellulären Karzinomen verwendet wird, wurde auch CK13 als Marker für diese Anwendung vorgeschlagen (Lee et al., 2003; Maeda et al., 1996). In Magenkarzinomen unterschiedlichen Typs, sowie Adenokarzinomen von Kolon, Gallenblase und Pankreas wurde CK13 ebenfalls nachgewiesen (Kim et al., 2004; Lee et al., 2003). Ein CK13 Nachweis findet sich auch in den von zahnschmelzbildenden Zellen ausgehenden Ameloblastomen, ameloblastischen Fibromen sowie kalzifizierenden epithelialen odontogenen Tumoren (Crivelini et al., 2003). Weitere CK13 Nachweise erfolgten in Merkelzellkarzinomen, Mucoepidermoidkarzinomen, Thymomen und nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen (Azevedo et al., 2008; Cohen et al., 1997; Fukai et al., 1993; Inoue et al., 1997). Bezüglich der Häufigkeit der CK13 Positivität bestehen für viele Tumorarten sehr diskrepante Literaturdaten. Dies geht v.a. aus der Zusammenstellung der bisherigen Studiendaten in Abb. 6 hervor. Ursachen für diese diskrepanten Befunde dürften unterschiedliche Antikörper, Färbeprotokolle und Kriterien für eine Positivität darstellen.

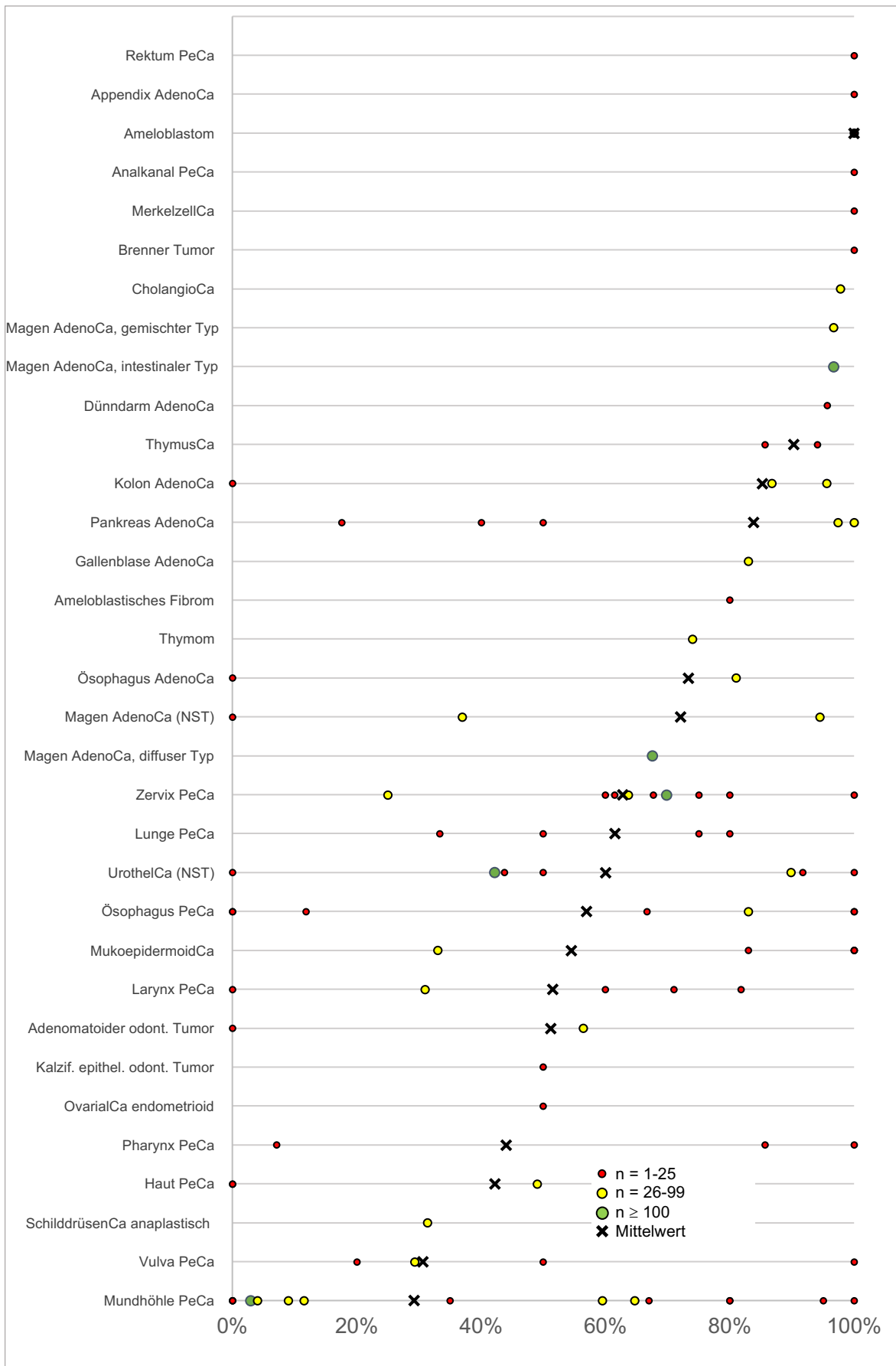


Abb. 6: **Darstellung der bisherigen Studienergebnisse zur CK13-Immunhistochemie.** Entitäten sortiert nach Mittelwert der Positivitätsrate. Ca: Karzinom, PeCa: Plattenepithelkarzinom, NST: no special type

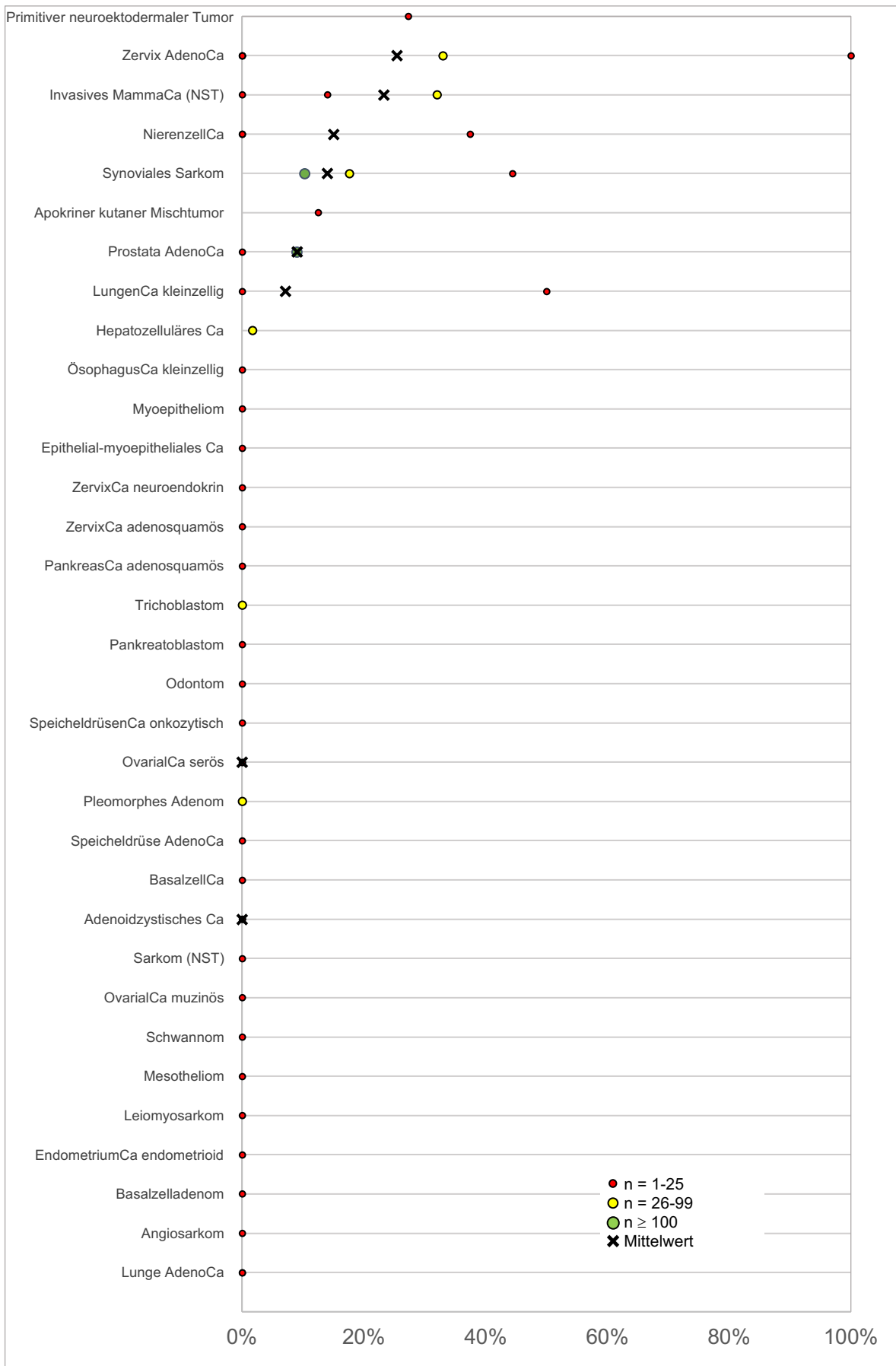


Abb. 6 Fortsetzung: **Darstellung der bisherigen Studienergebnisse zur CK13-Immunhistochemie.** Entitäten sortiert nach Mittelwert der Positivitätsrate. Ca: Karzinom, PeCa: Plattenepithelkarzinom, NST: no special type

Literaturverweise zu den Daten aus Abb. 6:

- Adenomatoider odontogener Tumor: (Crivelini et al., 2003; Leon et al., 2005)
- Ameloblastisches Fibrom: (Crivelini et al., 2003)
- Ameloblastom: (Crivelini et al., 2003; Kishino et al., 2007; Malecha & Miettinen, 1991; Pal et al., 2013)
- Analkanal Plattenepithelkarzinom: (Lee et al., 2003)
- Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom: (Miettinen & Franssila, 2000)
- Angiosarkom: (Agaimy et al., 2012)
- Apokriner kutaner Misch tumor: (Yamamoto & Yasuda, 1999)
- Appendix Adenokarzinom: (Lee et al., 2003)
- Basalzellkarzinom: (Schirren et al., 1997)
- Brenner Tumor: (Riedel et al., 2001)
- Cholangiokarzinom: (Lee et al., 2003)
- Dünndarm AdenoCa: (Lee et al., 2003)
- Endometriumkarzinom endometrioid: (Malecha & Miettinen, 1991)
- Epithelial-myoepitheliales Karzinom: (de Araújo et al., 2000)
- Gallenblase AdenoCa: (Lee et al., 2003)
- Haut Plattenepithelkarzinom: (Hudson et al., 2010; Suo et al., 1993; van Dorst et al., 1998)
- Hepatozelluläres Karzinom: (Lee et al., 2003)
- Invasives Mammakarzinom (NST): (Malecha & Miettinen, 1991; van Dorst et al., 1998; Yin et al., 2022)
- Kalzifizierender epithelialer odontogener Tumor: (Crivelini et al., 2003)
- Kolon Adenokarzinom: (Lee et al., 2003; Madoz-Gúrpide et al., 2007; van Dorst et al., 1998)
- Larynx Plattenepithelkarzinom: (Malecha & Miettinen, 1991; Suo et al., 1993; Ueno et al., 2003; van der Velden et al., 1997; van Dorst et al., 1998)
- Leimyosarkom: (Miettinen, 1991)
- Lunge Adenokarzinom: (Malecha & Miettinen, 1991; van Dorst et al., 1998)
- Lunge kleinzelliges Karzinom: (Malecha & Miettinen, 1991; Sarbia et al., 1997)
- Lunge Plattenepithelkarzinom: (Fukai et al., 1995; Malecha & Miettinen, 1991; Suo et al., 1993; van Dorst et al., 1998)
- Magen Adenokarzinom, diffuser Typ: (Kim et al., 2004)
- Magen Adenokarzinom, intestinaler Typ: (Kim et al., 2004)
- Magen Adenokarzinom, gemischter Typ: (Kim et al., 2004)
- Magen Adenokarzinom (NST): (Lee et al., 2003; Tanière et al., 2001; van Dorst et al., 1998)
- Merkelzellkarzinom: (Inoue et al., 1997)
- Mesotheliom: (Malecha & Miettinen, 1991)
- Mukoepidermoidkarzinom: (Azevedo et al., 2008; Daltoe et al., 2015; de Araújo et al., 2000; do Prado et al., 2007; Pires et al., 2004)
- Mundhöhle PeCa: (Adami et al., 2017; Al-Eryani et al., 2016; Bloor et al., 2001; Farrukh et al., 2015; Garcia et al., 2016; Hasegawa et al., 2017; Ibrahim, Bertelsen, et al., 1998; Kobayashi et al., 2010; Malecha & Miettinen, 1991; Mikami et al., 2011; Romañach et al., 2010; Suo et al., 1993; Ueno et al., 2003; van Dorst et al., 1998)

Literaturverweise zu den Daten aus Abb. 6:

Myoepitheliom: (de Araújo et al., 2000)

Nierenzellkarzinom: (Leuschner et al., 1991; Malecha & Miettinen, 1991; van Dorst et al., 1998)

Odontom: (Crivelini et al., 2003)

Onkozytisches Speicheldrüsenkarzinom: (Muramatsu et al., 2003)

Ösophagus Adenokarzinom: (Tanière et al., 2001; van Dorst et al., 1998)

Ösophagus kleinzelliges Karzinom: (Lu et al., 2010)

Ösophagus Plattenepithelkarzinom: (Glickman et al., 2001; Lam et al., 1995; Lu et al., 2010; Malecha & Miettinen, 1991; Sarbia et al., 1997; Suo et al., 1993; van Dorst et al., 1998)

Ovarialkarzinom endometrioid: (Riedel et al., 2001)

Ovarialkarzinom muzinös: (Riedel et al., 2001)

Ovarialkarzinom serös: (Malecha & Miettinen, 1991; Riedel et al., 2001)

Pankreas Adenokarzinom: (Lee et al., 2003; Malecha & Miettinen, 1991; Schüssler et al., 1992; van Dorst et al., 1998)

Pankreas adenosquamöses Karzinom: (Malecha & Miettinen, 1991)

Pankreatoblastom: (Nishimata et al., 2005)

Pharynx Plattenepithelkarzinom: (Klijanienko et al., 1989; Murakami & Saito, 1990; Ueno et al., 2003)

Pleomorphes Adenom: (de Araújo et al., 2000)

Primitiver neuroektodermaler Tumor: (Grieshammer et al., 1991)

Prostata Adenokarzinom: (Liu et al., 2016; Malecha & Miettinen, 1991)

Rektum Plattenepithelkarzinom: (van Dorst et al., 1998)

Sarkom (NOS): (Miettinen, 1991)

Schwannom: (Miettinen, 1991)

Speicheldrüse Adenokarzinom: (de Araújo et al., 2000)

Speicheldrüse adenoidzystisches Karzinom: (de Araújo et al., 2000; Sarbia et al., 1997)

Speicheldrüse Basalzelladenom: (de Araújo et al., 2000)

Synoviales Sarkom: (Lopes et al., 1994; Miettinen, 1991; Miettinen et al., 2000)

Thymom: (Fukai et al., 1993)

Thymuskarzinom: (Fukai et al., 1993; Fukai et al., 1995)

Trichoblastom: (Schirren et al., 1997)

Urothelkarzinom (NST): (Malecha & Miettinen, 1991; Reedy et al., 1990; Riedel et al., 2001; Schaafsma et al., 1990; Schaafsma et al., 1991; Worst et al., 2014)

Vulva Plattenepithelkarzinom: (Ansink et al., 1995; Malecha & Miettinen, 1991; Suo et al., 1993; van Dorst et al., 1998)

Zervix Adenokarzinom: (Ivanyi et al., 1990; Lang & Dallenbach-Hellweg, 1990; Nair et al., 1997; Smedts et al., 1994; van Dorst et al., 1998)

Zervix adenosquamöses Karzinom: (Smedts et al., 1994)

Zervix neuroendokrines Karzinom: (Smedts et al., 1994)

Zervix Plattenepithelkarzinom: (Carrilho et al., 2004; Fay et al., 2009; Ivanyi et al., 1990; Malecha & Miettinen, 1991; Nair et al., 1997; Smedts et al., 1994; Suo et al., 1993; van Bommel et al., 1994; van Dorst et al., 1998)

1.5 Zielsetzung

Es gilt, diese teilweise widersprüchlichen Ergebnisse zur Häufigkeit und Bedeutung der CK13 Expression in einer Studie mit großem Patientenkollektiv, einheitlichem Antikörper, Färbeprotokoll und Auswertkriterien zu untersuchen, um die Ergebnisse immunhistochemischer CK13 Untersuchungen besser einordnen zu können. Folglich lag die Zielsetzung der nachfolgenden Arbeit darin, die Prävalenz der CK13 Expression an einer großen Anzahl unterschiedlicher Normal- sowie Tumorgewebe zu untersuchen. Zusätzlich galt es, mögliche klinische Bedeutungen von aberranten Befunden wie Expressionsverlusten und Neoexpressionen zu analysieren.

2. Material und Methode

2.1 Tissue-Microarray Technik

Durch das Verfahren der Tissue-Microarray (TMA) Technik ist es möglich, auf einem einzigen Objektträger mehrere hundert Gewebeproben simultan zu untersuchen (Kononen et al., 1998). Die Methode wurde 1997 von der Arbeitsgruppe von Prof. Guido Sauter (damals Institut für Pathologie, Universitätsklinik Basel, Schweiz) und Prof. Olli Kallioniemi (damals National Human Genome Research Institute, Bethesda, Maryland, USA) entwickelt. Bei dem Verfahren werden zylindrische Gewebefragmente aus Paraffinblöcken von Geweben (meistens Tumorgewebe) in leere, vorgegossene Paraffinblöcke eingebracht, sodass am Ende TMA-Blöcke bestehen, welche 600 oder mehr Gewebezylinder beinhalten. Von diesen TMA-Blöcken hergestellte Schnitte können dann histologisch begutachtet oder mit allen möglichen Färbeverfahren untersucht werden, welche an Schnittpräparaten möglich sind. Die meisten TMA-Studien verwenden entweder die Immunhistochemie zum Nachweis von Proteinen, die RNA-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis von messenger RNA oder die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zum Nachweis und der Quantifizierung von spezifischen DNA-Segmenten (Al Kuraya et al., 2004; Skacel et al., 2002). Der größte Vorteil der TMA-Methode liegt in der Geschwindigkeit und Kosteneffizienz von derartigen Untersuchungen (Mengel et al., 2003). Bei 600 Gewebeproben pro TMA-Block können theoretisch 24'000 Tumoren auf 40 Gewebeschnitten untersucht werden. 40 Gewebeschnitte können an einem Tag von einer MTA hergestellt und am Folgetag immunhistochemisch gefärbt werden. Ausgehend von der realistischen Annahme von Kosten von fünf Euro für die Färbung eines Gewebeschnittes an einem automatischen Färbegerät wären die Kosten für die Untersuchung von 24'000 Tumoren 120'000€. Dieser Kostenpunkt kann mit dem TMA-Verfahren auf 800€ reduziert werden. Auch die Auswertung der molekularen Färbeergebnisse wird deutlich beschleunigt, da die Gesamttumorfläche von 0,6mm im Durchmesser viel schneller von einem Pathologen durchgemustert werden kann als ein klassischer Großschnitt, wo gegebenenfalls die neoplastisch transformierten Areale zuerst identifiziert werden müssen. Die Erfahrungen vom Institut für Pathologie des UKE haben gezeigt, dass ein Pathologe für die Interpretation der Färbeergebnisse eines TMA-Spots weniger als fünf Sekunden benötigt.

Der größte Nachteil der TMA-Technik liegt darin, dass dieses hocheffiziente Forschungsinstrument nur auf sehr aufwändige Art und Weise hergestellt werden kann (Bubendorf et al., 2001). Der erste Schritt des TMA-Herstellungsprozesses liegt in der Identifikation potenziell tauglicher Fälle, was normalerweise am UKE mit einer Volltextsuche nach geeigneten Stichworten im Zusammenhang mit dem gesuchten Tumortyp beginnt. Typischerweise wird der Name des Tumors und des Organs in Kombination mit Begriffen wie pT1, pT2, pT3 oder pT4 verwendet, um sicherzustellen, dass nicht nur der gewünschte Tumortyp, sondern auch ein Operationspräparat mit einer potenziell größeren Menge an Tumoren identifiziert wird. Kleine Biopsien aus Magen, Kolon oder Lunge sind vom Volumen her ungeeignet für eine TMA-Herstellung. Die gesamten Texte der gestellten Diagnosen werden dann von einem Arzt oder Medizinstudenten auf eine mögliche Eignung des Tumors vorgescannt. In dieser Phase sollen Tumoren ausgeschlossen werden, welche für eine TMA-Herstellung zu klein, zu nekrotisch oder sonst zu regressiv verändert sind um eine ausreichend große stanzbare Tumormenge erwarten zu dürfen. Gleichzeitig werden Tumoren aussortiert, bei denen aus dem Diagnosetext hervorgeht, dass die gestellte Diagnose eine leichte Unsicherheit beinhaltet. Von den so identifizierten Fällen werden dann alle Gewebeschnitte aus dem Archiv herausgesucht und von einem Pathologen auf das Vorliegen ausreichend großer Tumorareale untersucht. Angestrebt wird eine Tumorfläche von mindestens 1x1cm. Dabei soll vermieden werden, Tumoren nach ihrem Tumorzellgehalt zu selektionieren. Vielen molekulare Studien limitieren die in die Projekte eingeschlossenen Tumoren auf Neoplasien mit einem Tumorzellgehalt von mindestens 50 oder 70%. Am UKE wird ein derartiges Vorgehen als tumorbiologisch gefährlich betrachtet, da Tumoren mit besonders hohem Stromaanteil biologisch wahrscheinlich Unterschiede aufweisen gegenüber Tumoren mit einem geringen Stromaanteil (Wu et al., 2016). Die Eliminierung von Tumoren mit geringem Stromaanteil könnte somit zu einem Bias bei der Datenerhebung führen. Bei den als potenziell geeignet empfundenen Schnitten markiert der Pathologe mit einem Filzstift die Tumorareale (Abb. 7). Von den potenziell geeigneten Schnitten werden in einer nächsten Phase aus einem anderen Archiv die dazugehörigen Gewebeblöcke herausgesucht und auf ihre Eignung für die TMA-Herstellung überprüft. Die Blockkriterien für TMA-Tauglichkeit sind im Wesentlichen die Dicke des im Paraffinblock enthaltenen Gewebestücks, wobei angestrebt wird mindestens

zwei mm dicke/tiefe Paraffinblöcke zu verwenden. Die Dicke der Paraffinblöcke, die für die Herstellung des TMA verwendet werden, ist entscheidend für die Länge der aus dem Paraffinblock entnehmbaren Gewebezylinder. Die Länge der Gewebezylinder eines TMAs ist wiederum entscheidend für die Zahl der Schnitte, welche von einem TMA-Block hergestellt werden können, an dem Anteile des entsprechenden Zylinders auch enthalten sind. Naturgemäß sind die in einen TMA-Block eingebrachten Gewebezylinder ungleich lang, da die Dicke von Paraffinblöcken nicht standardisiert ist. Je länger ein Gewebezylinder ist, desto mehr Schnitte können von dem entsprechenden Tumor auf dem TMA gewonnen werden.



Abb. 7: **Pharynxkarzinom**. Filzstift-Markierung des Tumorareals.

Nach Abschluss der Evaluation von Schnitten und Blöcken ist die finale Anzahl der für ein Projekt verfügbaren Fälle definiert, sodass als nächstes der Bauplan des TMAs festgelegt werden kann. Die TMA-Blöcke des UKE werden nach einem standardisierten „Design“ hergestellt, wobei die TMA-Blöcke sechs Sektoren beinhalten, bezeichnet mit Großbuchstaben (A-F). Die Sektoren sind zum Zweck der Orientierbarkeit und der konstanten Ausrichtung ungleich groß und asymmetrisch angeordnet. Die Spalten in diesen Sektoren werden mit Kleinbuchstaben (a bis maximal r) bezeichnet und die neun Zeilen mit Zahlen (1-9). Ein Schema des UKE TMA-Aufbaus ist in Abb. 8 dargestellt. Die Blöcke werden dann zusammen mit den markierten Schnitten in der Reihenfolge ihres geplanten Einbaus in den TMA-Block zusammensortiert.

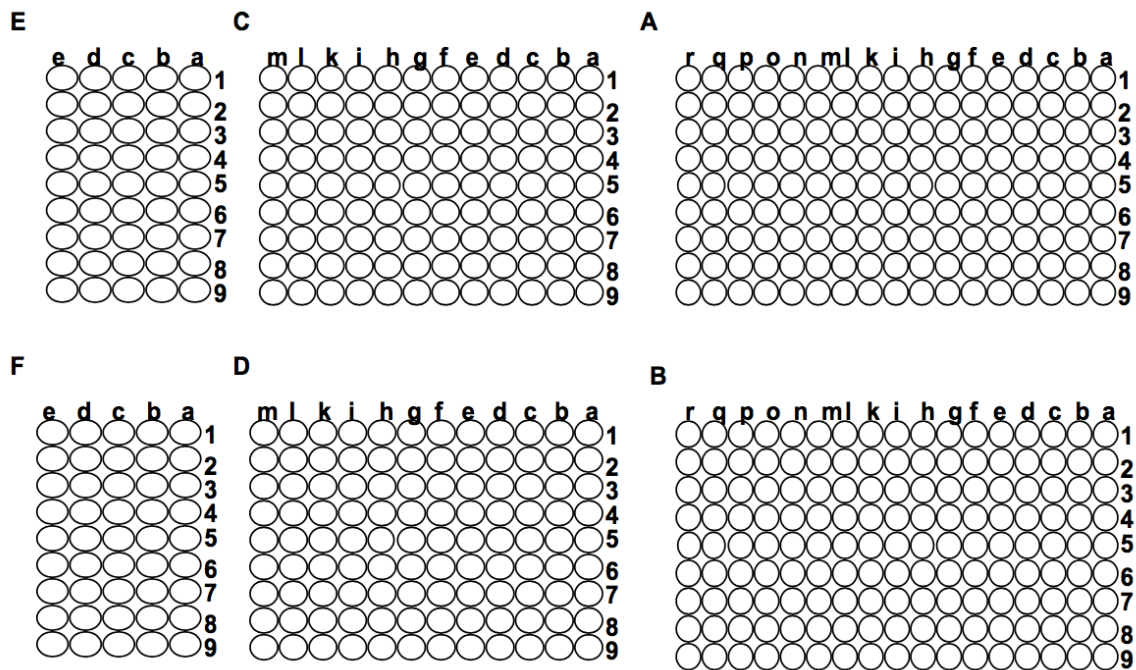


Abb. 8: **Schema.** Klassischer TMA-Block-Aufbau. Dreistelliges Koordinatensystem (Sektor, Zeile, Spalte) ordnet jeden der 612 Spots exakt einer Gewebeprobe zu. Sektor F beinhaltet in der Regel Referenzgewebe.

Die nun folgende TMA-Herstellung ist die in diesem Prozess technisch aufwändigste Prozedur, macht aber deutlich weniger als 5% der gesamten Arbeitsleistung aus (Simon et al., 2004). Für die TMA-Herstellung wird am UKE ein Gerät verwendet, welches von Mitarbeitern des Instituts (Martina und Christian Mirlacher) entwickelt worden ist. Die wesentlichsten vier Module des Gerätes sind

- a) eine Vorrichtung, die es ermöglicht an identischer Stelle wechselweise einen Bohrer zum Bohren von Löchern in leere Empfänger-Paraffinblöcke und eine Hohlzahn zum Entfernen von Gewebezylindern aus Spender-Blöcken zu betätigen
- b) ein Minipodest zur Abdeckung der vulnerablen Empfänger-Paraffinblöcke
- c) ein Mehrfachblockhalter zur parallelen Herstellung von sechs nahezu identischen TMA-Blöcken und
- d) ein Elektromotor, welcher die Bohrer/Nadelvorrichtung automatisch von einer TMA-Position zur nächsten fortbewegt.

Die TMA-Herstellungsprozedur ist in den Abbildungen 9-16 dargestellt. Sie beginnt an der Position A1a mit der Herstellung eines Bohrlochs durch einen Bohrer mit einem äußeren Durchmesser von 0,6mm. Danach wird der Empfängerblock durch

das Minipodest abgedeckt und der zu stanzende Spenderblock darauf platziert. Durch Abgleich des vom Pathologen markierten Tumorbereichs auf dem HE-Schnitt wird nach Umschaltung von Bohrer auf Hohnadel (Abb. 12) aus der tumorhaltigen Zone ein 0,6mm messendes Gewebefragment entnommen. Hierzu wird eine Hohnadel verwendet, deren innerer Durchmesser 0,6mm beträgt. Nach der Entnahme werden Spenderblock und Podest entfernt und die Hohnadel wird auf das Niveau des Empfängerblocks gebracht, sodass der Gewebezylinder unter Verwendung eines Stahldrahtes aus der Nadel ausgestoßen und so in das vorgefertigte Bohrloch deponiert werden kann. Es wird darauf geachtet, dass das obere Ende des Zylinders möglichst auf Ebene der Blockoberfläche zu liegen kommt. Danach wird der Mehrfachblockhalter eine Position verschoben, sodass an der gleichen Position A1a nun wieder ein neuer, nicht gelochter Empfänger-Paraffinblock liegt, wo nach Umschalten auf Bohren erneut ein Bohrloch angefertigt wird. Danach wird das Gerät auf Hohnadel umgestellt, das Podest erneut platziert und es wird ein weiterer Gewebezylinder aus dem tumorhaltigen Bereich entnommen. Dabei wird darauf geachtet, dass die zweite Stanze aus der unmittelbaren Nachbarschaft der ersten Stanze entnommen wird, um mögliche Einflüsse einer Tumorerogenität auf die Ergebnisse molekularer Untersuchungen an verschiedenen Replikaten eines TMA's möglichst zu limitieren. Der Prozess wird dann fortgesetzt, bis alle sechs Replikate des Blockhalters an Position A1a gefüllt sind. Je nachdem könnte ein zweiter Blockhalter verwendet werden um die Replikate 7-12 herzustellen. Nach Herstellung aller geplanten Replikate wird der Schrittmotor betätigt und die Bohr-/Nadelvorrichtung auf die Position A1b bewegt. Der Prozess wird dann bis zur Fertigstellung des TMA-Blockes beziehungsweise seiner Replikate fortgesetzt.

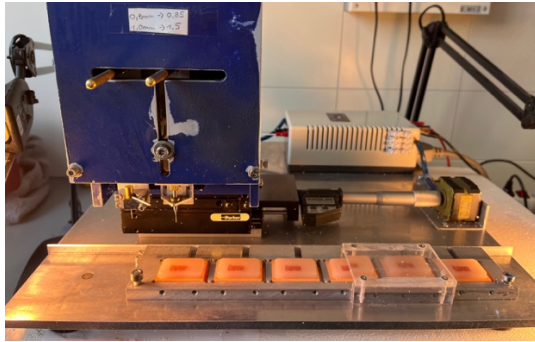


Abb. 9: Aufbau mit Bohrer/Nadelvorrichtung, Minipodest, Mehrfachblockhalter, Elektromotor.

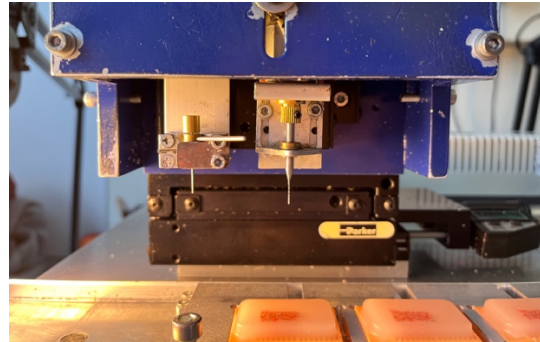


Abb. 10: Bohrer und Hohlzylinder.

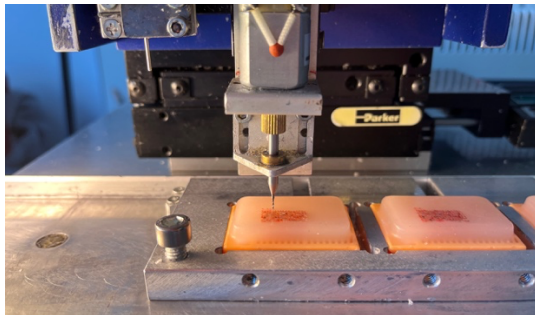


Abb. 11: Bohren eines Lochs in den Empfänger-Paraffinblock.

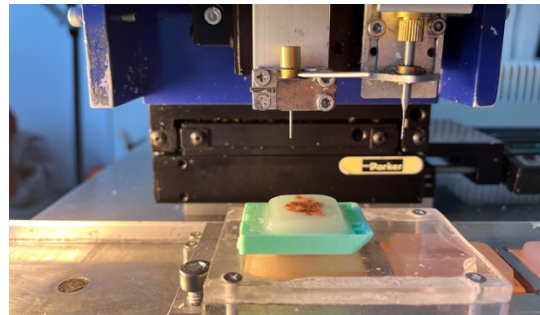


Abb. 12: Umschalten von Bohrer auf Hohlzylinder, Heranschieben des Minipodests und Auflegen des Spenderblocks.

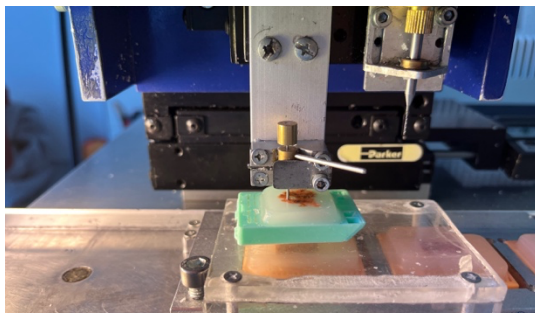


Abb. 13: Einbringen der Hohlzylinder in den Spenderblock zur Gewebeatnahme.

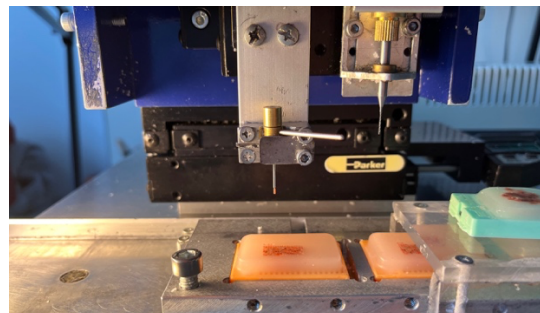


Abb. 14: Herausschieben des Gewebezylinders aus der Hohlzylinder.

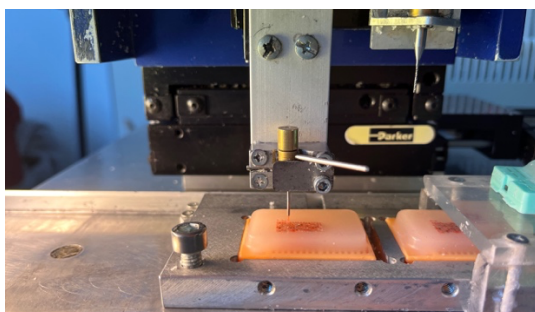


Abb. 15: Einbringen des Gewebezylinders in den Empfänger-Paraffinblock.

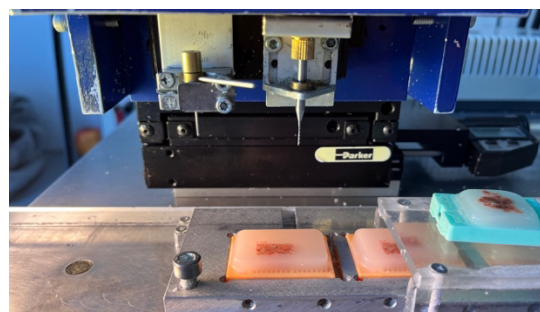


Abb. 16: Fertig eingebrachter Gewebezylinder in Empfänger-Paraffinblock.

Da die für die Herstellung eines TMA-Blockes verwendeten E-Nummern, mit denen Schnitte und Blöcke in Pathologie-Instituten markiert und zugeordnet werden können, nach Abschluss der TMA-Herstellung nichtmehr benötigt werden, werden diese dann entweder ausgeblendet (Pseudonymisierung) oder definitiv gelöscht (Anonymisierung). Die Verwendung von einem dieser Verfahren ist sinnvoll, um im Falle einer potenziellen Cyberattacke auf das Informatiksystem des Instituts die Gefahr eines unbefugten Zugriffs auf Klarnamen zu eliminieren. Die TMA-Methode ist für den Schutz der Daten von Patienten außerordentlich gut geeignet, denn nach Abschluss der Herstellung können alle molekularen, histopathologischen oder auch klinischen Verlaufsdaten für immer ausschließlich über die TMA-Koordinate zugeordnet werden. Ein Beispiel eines typischen TMA-Files mit histopathologischen, molekularen und klinischen Daten ist in Tabelle 2 gezeigt.

Array-Titel	Koordinate	Entität	Geschlecht	Alter bei Einsendung	Grading	pT	pN	L-Status	V-Status
...
MTA	A9p	PeCa Ösophagus	M	71	3	3	1	0	0
MTA	A9q	PeCa Ösophagus	M	63	2	3	0	0	0
MTA	A9r	PeCa Ösophagus	W	58	2	4a	2	1	0
MTA	B1a	PeCa Zervix	M	90	2	1b	0	0	0
MTA	B1b	PeCa Zervix	W	81	3	3b	0	0	0
MTA	B1c	PeCa Zervix	W	68	2	4	1	1	0
...

*Tabelle 2: **Beispiel TMA-File.** Datenfile eines Multi-Tumor-Arrays. Patientendaten wurden hier anonymisiert. Die eindeutige Zuordnung von Gewebeslots geschieht anhand der Koordinate. Zusätzliche patientenbezogene Daten können in weiteren Spalten aufgelistet werden.*

2.2 TMAs für das CK13-Projekt

Für das CK13-Projekt wurden Normalgewebe- und Tumor-TMAs eingesetzt. Der Normalgewebe-TMA beinhaltet von 76 verschiedenen Normalgewebstypen jeweils acht Proben von acht unterschiedlichen Patienten (608 Gewebeproben auf einem Schnitt). Alle Proben stammten von verschiedenen Patienten. Tabelle 3 stellt die genaue Zusammenstellung des Normalgewebe-TMAs dar.

Nr.	Organ	Nr.	Organ
1	Endothel, Aorta	39	Rektum, Mucosa
2	Media, Aorta	40	Gallenblase, Epithel
3	Herz	41	Leber
4	Muskulatur, gestreift	42	Pankreas
5	Zunge, Muskulatur	43	Parotis
6	Uterus, Myometrium	44	Gl. submandibularis
7	Appendix, Muskel	45	Gl. sublingualis
8	Ösophagus, Muskel	46	Knochenmark
9	Magen, Muskel	47	Duodenum, Gl. duodenales
10	Ileum, muscularis	48	Niere, Cortex
11	Colon descendens, Muskel	49	Niere, Mark
12	Nierenbecken, Muskel	50	Prostata
13	Harnblase, Muskel	51	Gl. vesiculosa
14	Penis, Corpus spongiosum	52	Epididymis
15	Ovar, Stroma	53	Hoden
16	Fett	54	Bronchus, Mucosa
17	Haut	55	Bronchus, Drüsen
18	Haut, Haarfollikel und Talgdrüse	56	Sinus paranasales
19	Lippe, orale Mucosa	57	Lunge
20	Mundhöhle	58	Brust
21	Tonsille, Oberflächenepithel	59	Endozervix
22	Analkanal, Haut	60	Endometrium, Proliferation
23	Analkanal, Übergang Mucosa	61	Endometrium, Sekretion
24	Ektozervix	62	Eileiter, Mucosa
25	Ösophagus, Plattenepithel	63	Plazenta frühe, Decidua
26	Nierenbecken, Urothel	64	Ovar, Corpus luteum
27	Harnblase, Urothel	65	Ovar, folliculäre Zyste
28	Plazenta, reife, Amnion	66	Plazenta, frühe
29	Lymphknoten	67	Plazenta, reife
30	Milz	68	Nebenniere
31	Thymus	69	Nebenschilddrüse
32	Tonsille	70	Schilddrüse
33	Magen, Antrum	71	Cerebellum, Cortex (Stratum moleculare)
34	Magen, Corpus	72	Cerebellum, Substantia nigra
35	Duodenum, Mucosa	73	Cerebrum, grau
36	Ileum, Mucosa	74	Cerebrum, weiß
37	Appendix, Mucosa	75	Hypophyse, Hinterlappen/Infundibulum
38	Colon descendens, Mucosa	76	Hypophyse, Vorderlappen

Tabelle 3: **Normalgewebe-Array (NTA)**. Zusammenstellung des NTA mit jeweils acht Proben pro Gewebetyp. Reihenfolge entspricht der Lokalisation.

Der Tumor-TMA beinhaltet Proben von insgesamt 10.439 Tumoren von 131 verschiedenen Tumortypen und Subtypen. Detaillierte histopathologische Daten zu Grad, pT oder pN Stadium waren von einem Großteil der urothelialen Neoplasien (n=1.063), von Plattenepithelkarzinomen der Zervix uteri (n=179) sowie von 1.160 Plattenepithelkarzinomen von 11 verschiedenen Ursprungsorganen bekannt. Klinische Verlaufsdaten waren von 157 Patientinnen mit Plattenepithelkarzinomen der Zervix uteri vorhanden. Die mediane Nachverfolgungszeit war 46 (Gesamtüberleben) oder 49 (rezidivfreies Überleben) Monate bei diesen Patientinnen (Bereich 0-181 Monate). Tabelle 4 enthält die genaue Zusammenstellung des Tumor-TMAs. Alle Gewebeproben stammten aus den Archiven von drei Pathologie-Instituten. Dazu gehört das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE), das Institut für Pathologie am Klinikum Osnabrück und der Abteilung für Pathologie des akademischen Lehrkrankenhauses Fürth (Deutschland). Die Gewebe waren alle in 4%igem gepuffertem Formalin fixiert und danach in Paraffin eingebettet worden. Die Verwendung von diagnostischem Restmaterial von zum Zwecke der Diagnostik entnommenen Geweben zur Anfertigung von TMAs und ihre Verwendung für Forschungszwecke ist durch das Hamburger Krankenhausgesetz (HmbKHG, §12) erlaubt und wurde durch das lokale Ethik-Komitee (Ethikkommission Hamburg, WF-049/09) bewilligt. Alle Arbeiten erfolgten in Übereinstimmung mit der Helsinki-Deklaration.

Organsystem	Entität bzw. Subentität	Fallzahl
Tumoren der Haut	Pilomatrixom	35
	Basalzellkarzinom	88
	Benigner Naevus	29
	Haut Plattenepithelkarzinom	90
	Malignes Melanom	46
	Malignes Melanom Lymphknoten-Metastase	86
	Merkelzellkarzinom	46

Kopf-Hals-Tumoren	Larynx Plattenepithelkarzinom	109
	Pharynx Plattenepithelkarzinom	60
	Mundboden Plattenepithelkarzinom	130
	Parotis pleomorphes Adenom	50
	Parotis Warthin Tumor	49
	Speicheldrüsen Basalzelladenom	15

Tumoren der Lunge, Pleura und Thymus	Lunge Adenokarzinom	196
	Lunge Plattenepithelkarzinom	80
	Lunge kleinzelliges Karzinom	16
	Mesotheliom, epitheloid	39
	Mesotheliom, sonstiges	76
	Thymom	29

Gynäkologische Tumoren	Vagina Plattenepithelkarzinom	78
	Vulva Plattenepithelkarzinom	130
	Zervix Plattenepithelkarzinom	308
	Zervix adenosquamöses Karzinom	19
	Zervix Adenokarzinom	54
	Endometriumkarzinom endometrioid	50
	Endometriumkarzinom serös	50
	Uterus Karzinosarkom	20
	Ovarialkarzinom endometrioid	69
	Ovarialkarzinom serös	130
	Ovarialkarzinom muzinös	52
	Ovarialkarzinom klarzellig	22
	Karzinosarkom des Ovars	17
	Granulosazelltumor des Ovars	37

Tabelle 4: **Tumor-TMA**. Organsystematische Auflistung der untersuchten Tumorentitäten bzw. Subentitäten (n=131) mit Angabe der untersuchten Fallzahl.

Organsystem	Entität bzw. Subentität	Fallzahl
Gynäkologische Tumoren	Leydigzelltumor des Ovars	4
	Sertolizelltumor des Ovars	1
	Sertoli-Leydig-Zell-Tumor des Ovars	3
	Steroidzelltumor des Ovars	3
	Brennertumor	41

Tumoren der Brust	Invasives Mammakarzinom NST	1764
	Mammakarzinom lobulär	363
	Mammakarzinom medullär	34
	Mammakarzinom tubulär	29
	Mammakarzinom muzinös	65
	Phylloidestumor der Mamma	50

Gastrointestinale Tumoren	Adenomatöser Polyp, low-grade Dysplasie	50
	Adenomatöser Polyp, high-grade Dysplasie	50
	Colon Adenokarzinom	81
	Magen Adenokarzinom, diffuser Typ	80
	Magen Adenokarzinom, intestinaler Typ	80
	Ösophagus Adenokarzinom	83
	Ösophagus Plattenepithelkarzinom	76
	Analkanal Plattenepithelkarzinom	89
	Cholangiokarzinom	50
	Hepatozelluläres Karzinom	50
	Pankreas duktales Adenokarzinom	81
	Pankreas/Papille Adenokarzinom	28
	Pankreas Azinuszellkarzinom	10
	Gastrointestinaler Stromatumor (GIST)	50

Urogenitale Tumoren	Urothelkarzinom pTa G2 low grade	177
	Urothelkarzinom pTa G2 high grade	141
	Urothelkarzinom pTa G3	219
	Urothelkarzinom pT2-4 G3	735
	Harnblase Plattenepithelkarzinom	22
	Harnblasenkarzinom kleinzellig neuroendokrin	22
	Urothelkarzinom sarkomatoid	25
	Urothelkarzinom des Nierenbeckens	62

Tabelle 4 Fortsetzung: **Tumor-TMA**. Organsystematische Auflistung der untersuchten Tumorentitäten bzw. Subentitäten (n=131) mit Angabe der untersuchten Fallzahl.

Organsystem	Entität bzw. Subentität	Fallzahl
Urogenitale Tumoren	Nierenzellkarzinom klarzellig	50
	Nierenzellkarzinom papillär	50
	Nierenzellkarzinom chromophob	50
	Onkozytom	50
	Prostata Adenokarzinom Gleason 3+3	83
	Prostata Adenokarzinom Gleason 4+4	80
	Prostata Adenokarzinom Gleason 5+5	85
	Prostatakarzinom kleinzellig neuroendokrin	17
	Seminom	50
	embryonales Karzinom des Hodens	50
	Leydigzelltumor des Hodens	30
	Sertolizelltumor des Hodens	2
	Keimstrang-Stroma-Tumor des Hodens	1
	Spermatozytischer Tumor des Hodens	1
	Dottersacktumor des Hodens	50
	Teratom	50
Penis Plattenepithelkarzinom	80	

Endokrine Tumoren	Schilddrüsenadenom	113
	Schilddrüsenkarzinom papillär	391
	Schilddrüsenkarzinom follikulär	154
	Schilddrüsenkarzinom medullär	111
	Nebenschilddrüsenadenom	43
	Schilddrüsenkarzinom anaplastisch	45
	Nebennierenrindenadenom	50
	Nebennierenrindenkarzinom	26
	Phäochromozytom	50
	Appendix neuroendokriner Tumor (NET)	22
	Kolorektal neuroendokriner Tumor	11
	Ileum neuroendokriner Tumor	49
	Lunge neuroendokriner Tumor	19
	Pankreas neuroendokriner Tumor	97
	Kolorektal neuroendokrines Karzinom (NEC)	12
	Gallenblase neuroendokrines Karzinom	4
Pankreas neuroendokrines Karzinom	13	

Tabelle 4 Fortsetzung: **Tumor-TMA**. Organsystematische Auflistung der untersuchten Tumorentitäten bzw. Subentitäten (n=131) mit Angabe der untersuchten Fallzahl.

Organsystem	Entität bzw. Subentität	Fallzahl
Hämatopoetische und lymphatische Tumoren	Hodgkin Lymphom	103
	Kleinzelliges lymphozytisches B-Zell-Lymphom (B-SLL/B-CLL)	50
	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)	113
	Lymphom follikulär	88
	T-Zell Non Hodgkin Lymphom	25
	Mantelzelllymphom	18
	Marginalzonenlymphom	16
	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom des Hodens	16
	Burkitt Lymphom	5

Knochen- und Weichgewebstumoren	Riesenzell-Sehnenscheiden Tumor	45
	Granularzelltumor	53
	Leiomyom	50
	Leiomyosarkom	87
	Liposarkom	132
	Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST)	13
	Myofibrosarkom	26
	Angiosarkom	73
	Angiomyolipom	91
	Dermatofibrosarkoma protuberans	21
	Ganglioneurom	14
	Kaposi-Sarkom	8
	Neurofibrom	117
	Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS)	74
	Paragangliom	41
	Ewing Sarkom	23
	Rhabdomyosarkom	6
	Schwannom	121
	Synoviales Sarkom	12
	Osteosarkom	43
Chondrosarkom	38	
Rhabdoidtumor	5	

Tabelle 4 Fortsetzung: **Tumor-TMA**. Organsystematische Auflistung der untersuchten Tumorentitäten bzw. Subentitäten (n=131) mit Angabe der untersuchten Fallzahl.

2.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist die in der diagnostischen Pathologie am häufigsten durchgeführte Zusatzuntersuchung und das Verfahren ermöglicht die Visualisierung von spezifischen Proteinen an Gewebeschnitten. Da die mögliche morphologische Variabilität gerade bei Tumorgeweben begrenzt ist, hilft der Nachweis von gewebespezifischen Proteinen wie beispielsweise

prostata-spezifisches Antigen (PSA) oder Thyreoglobulin (spezifisch für Schilddrüse) häufig bei der Zuordnung von Tumorgeweben zu definierten Ursprungsorganen (Epstein, 1993; Whitley & Ain, 2004). Das Verfahren beruht auf der Anwendung von Antikörpern, welche auf einen Gewebeschnitt gegeben werden und sich – wenn dieses im Gewebe vorhanden ist – an das Zielprotein binden. Da Antikörper farblos sind muss diese Antikörperbindung durch einen zweiten Schritt visualisiert werden. Dabei werden mit einem Farbmarkierungssystem gekoppelte Antikörper verwendet, welche spezifisch sind für den Fc-Teil der verwendeten Primärantikörper (Magaki et al., 2019; Mori & Cardiff, 2016). Das Prinzip der Immunhistochemie ist in Abb. 17 dargestellt. Die prinzipiellen Möglichkeiten der Visualisierung einer Immunreaktion an Gewebeschnitten ist in Abb. 18 gezeigt (Hantschke & Palmedo, 2015). Obwohl die Immunhistochemie prinzipiell ein einfach verständliches Verfahren darstellt, gibt es einige schwerwiegende praktische Probleme. Problem 1 ist die erhebliche Variabilität von Antikörpern. Das heißt, Antikörper von verschiedenen Firmen, welche alle gegen CK13 gerichtet sind, unterscheiden sich grundsätzlich voneinander. Dies ist bedingt durch die Art und Weise der Antikörper-Herstellung, wobei typischerweise Labortiere (Maus, Kaninchen, Hamster, Ratte) mit dem Zielprotein beimpft werden, wonach das Immunsystem des Tieres viele tausende verschiedene Antikörper gegen das Zielprotein herstellt. Schätzungen gehen davon aus, dass das Spektrum verschiedener Antikörper gegen ein bestimmtes Peptid bei Kaninchen zwischen 12 und 30 liegt (Cheung et al., 2012; Wine et al., 2013), bei Mäusen zwischen 30 und 77 (Eyer et al., 2020; Gerard et al., 2020). Bei Menschen

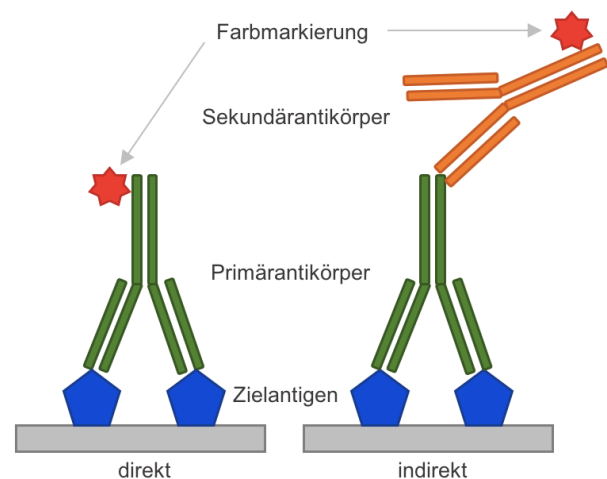


Abb. 17: **Immunhistochemie.** Prinzip der direkten und indirekten Immunhistochemie

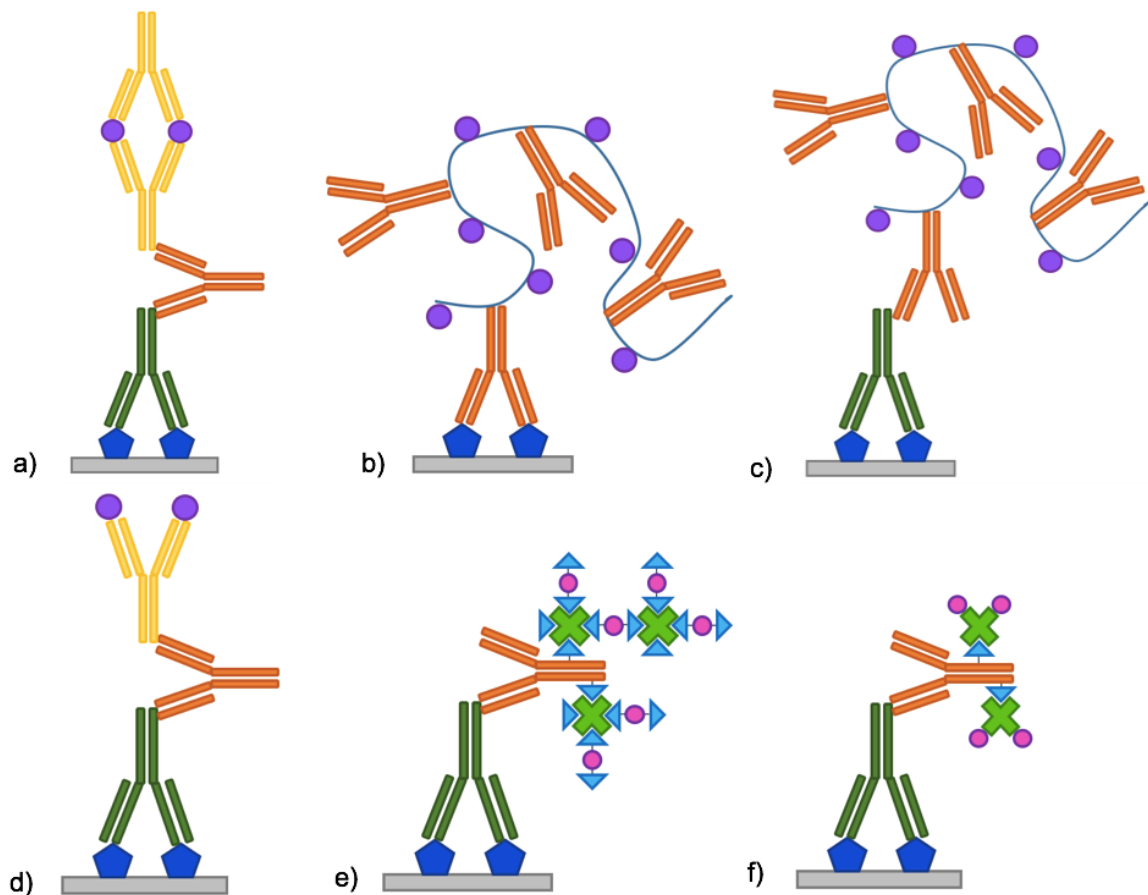


Abb. 18: **Visualisierung.** Möglichkeiten der Visualisierung von Immunreaktionen an Gewebeschnitten. Adaptiert aus: (Hantschke & Palmedo, 2015)

- a) PAP-Methode: Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex und Brückenantikörper
- b) EPOS-Methode (Enhanced-Polymer-one-step): Dextranpolymer konjugiert mit Enzymmolekülen und spezifischen Antikörpern
- c) EnVision-Polymer-Konjugat-Methode: Dextranpolymer konjugiert mit Enzymmolekülen und spezifischen Sekundärantikörpern
- d) APAAP-Methode: Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex und Brückenantikörper
- e) (S)ABC-Methode: biotinylierter Brückenantikörper und präformierter (Strept-)Avidin-Biotin-Enzymkomplex (ABC)
- f) L(S)AB-Methode (Labeled-(Strept-)Avidin-Biotin): biotinylierter Brückenantikörper und direkt mit Enzym konjugiertes (Strept-)Avidin

wäre die entsprechende Zahl ca. 50-400 (Wine et al., 2015). Die Antikörper-Hersteller sind aus technischen/logistischen Gründen nicht in der Lage, alle diese Antikörper zu monoklonalen Antikörpern zu konvertieren und dann die gewonnenen monoklonalen Antikörper so zu validieren, dass der absolut beste Antikörper eines bestimmten Tieres übrig bleibt. Für die meisten Proteine, für die viele verschiedene Antikörper kommerziell zur Verfügung stehen, unterscheiden sich die Färbereigenschaften der Antikörper erheblich und viele kommerzielle Antikörper zeigen unspezifische Färbemuster und auch Kreuzreaktionen (Begley & Ellis, 2012; Bucur et al., 2013; Voskuil, 2014).

Problem Nr. 2 stellt die fixationsbedingte Veränderung von Geweben dar. Zum Zwecke der histologischen Untersuchung gewonnenes Gewebe wird typischerweise in Formalin fixiert. Die Fixation hat die Aufgabe die Autolyse von nichtmehr perfundierten Geweben zu verhindern und so die Struktur/Morphologie von Geweben zu erhalten. Das Formalin erfüllt diesen Zweck durch eine Vernetzung (Crosslinking) von Proteinen untereinander und mit DNA (Helander, 1994). Dadurch verändert sich die Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen, wodurch die Zugänglichkeit und Konfiguration von Epitopen verändert wird (Werner et al., 2000). Als Folge davon sind gewisse Antikörper-Bindungsstellen nicht mehr zugänglich und es entstehen neue Bindungsstellen. Antikörper, welche an unfixierten Proteinen oder Geweben eine spezifische Färbereaktion mit dem Zielprotein gezeigt haben, können somit plötzlich entweder nichtmehr funktionieren oder aber eine unerwartete Kreuzreaktivität zeigen. Antikörper sollen deswegen vor Anwendung an formalinfixiertem Gewebe an formalinfixiertem Gewebe validiert werden. Die internationale Arbeitsgruppe für Antikörper-Validierung (International Working Group for Antibody Validation IWGAV) empfiehlt eine Validierung von Antikörpern für die Immunhistochemie an formalinfixierten Geweben entweder durch den Vergleich mit einer zweiten Methode zur Expressionsmessung oder aber mit dem Vergleich der Färbeergebnisse des zu validierenden Antikörpers mit einem zweiten, unabhängigen, gegen das gleiche Zielprotein gerichteten Antikörper (Uhlen et al., 2016). Die Effekte der Formalinfixierung sind mit Hilfe der sogenannten hitzeinduzierten Epitopdemaskierung (heat induced epitope retrieval, HIER) zumindest partiell reversibel. Bei diesem Verfahren werden die Schnitte vor Exposition mit dem Primärantikörper bei Temperaturen um die 100°C oder darüber gekocht, wobei der pH der hierfür verwendeten Flüssigkeit einen wichtigen Einfluss hat. Viele Proteine sind nach Kochen bei basischem pH (pH9) besser zugänglich als nach Kochen bei saurem pH (meist pH6) (Yamashita, 2007).

2.4 CK13-Immunhistochemie

Frisch präparierte TMA-Schnitte wurden an einem Tag in einem einzigen Experiment gefärbt. Dabei wurden die Schnitte zuerst in Xylol deparaffiniert und danach in einer absteigenden Alkohol-Reihe rehydriert. Danach erfolgte die HIER-Behandlung für fünf Minuten in einem Autoklav bei 121°C bei pH 7,8 (DAKO Target Retrieval Solution™, Agilent, CA, USA). Endogene Peroxidase-Aktivität wurde mit dem DAKO Peroxidase-Blocking Solution™ (Agilent, CA, USA; #52023) blockiert durch eine Inkubation für 10 Minuten. Der Primärantikörper für CK13 (mouse monoclonal, MSVA-613M, MS Validated Antibodies GmbH, Hamburg, Deutschland) wurde bei 37°C für 60 Minuten und einer Verdünnung von 1:150 appliziert. Zum Zweck der Antikörper-Validierung wurde der Normalgewebe-TMA auch mit dem Antikörper EP69 (rabbit monoclonal, BSB 6678, BioSB, Santa Barbara, California, USA) bei einer Verdünnung von 1:300 und einem ansonsten identischen Protokoll analysiert. Der gebundene Antikörper wurde dann mit dem EnVision Kit™ (Agilent, CA, USA; #K5007) visualisiert entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die Schnitte wurden mit Hämalaun gegengefärbt. Eine genaue Darstellung der experimentellen Schritte ist in Tabelle 5 dargestellt. Für die Auswertung der Färbereaktionen wurden in Tumoren die Färbeintensität auf einer Skala von 0 bis 3 und der prozentuale Anteil der CK13 positiven Tumorzellen von einem Pathologen registriert. Für statistische Auswertungen wurden die Ergebnisse dann in die vier Gruppen negativ, schwach positiv, mäßig stark positiv und stark positiv eingeteilt gemäß den Vorgaben, welche in Tabelle 6 dargestellt sind.

Färbeprotokoll
<p><i>Objektträger-Vorbereitung</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - 2,5µm Schnitte, 60°C über Nacht - Xylol 3x5 Minuten - Absteigende Alkoholreihe bis A. Dest
<p><i>Vorbehandlung</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Schnitte in TEC Puffer (pH 7,8) in Autoklav, 121°C, 5 Minuten - Spülung A. Dest 2x - Spülung TBST Puffer, 5 Minuten
<p><i>Peroxidase-Block</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Feuchte Kammer, Schnitte auslegen - Peroxidase Blocking Solution (#S2023) RTU, 10 Minuten - Spülung TBST Puffer 2x5 Minuten
<p><i>Antikörper-Inkubation</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Inkubation anti-CK13 Primärantikörper (MSVA-613M) 1:150, 37°C, 60 Minuten - Spülung TBST Puffer 3x5 Minuten - Inkubation Sekundärantikörper EnVision (mouse/rabbit) #K5007, 37°C, 30 Minuten - Spülung TBST Puffer 3x5 Minuten
<p><i>Visualisierung</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - DAB Chromogen #K5007, Raumtemperatur, 10 Minuten - Spülung A. Dest - Gegenfärbung Hämatoxylin (DAKO Hämalan) 1 Minute - Bläuen in Leitungswasser 1 Minute - Aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol - Eindeckeln (Eindeckautomat)

Tabelle 5: **Experimentelle Schritte.** Genaue Darstellung des Ablaufs. Abkürzungen: A. Dest: destilliertes Wasser, TEC: Tris-EDTA-Citrat, TBST: Tris-buffered-saline-with-Tween, RTU: ready to use

Gruppe	Definition
Negativ	Intensität 0
Schwach positiv	Intensität 1 in ≤70% der Tumorzellen oder Intensität 2 in ≤30% der Tumorzellen
Mäßig stark positiv	Intensität 1 in >70% der Tumorzellen oder Intensität 2 in 31-70% der Tumorzellen oder Intensität 3 in ≤30% der Tumorzellen
Stark positiv	Intensität 2 in >70% der Tumorzellen oder Intensität 3 in >30% der Tumorzellen

Tabelle 6: **Auswertung.** Kriterien zur semiquantitativen Interpretation der Färbeergebnisse

2.5 Statistik

Für die statistischen Auswertungen wurde die JMP 16 Software (SAS Institute Inc., NC, USA) genutzt. Zur Identifikation statistischer Assoziationen zwischen CK13 Immunfärbung und Tumorphänotyp bei Urothelkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen unterschiedlichen Ursprungs wurden Kontingenztabellen und der Chi-Quadrat-Test angewandt. Unter Verwendung des Kaplan-Meier-Verfahrens wurden Überlebenskurven erstellt. Zum Nachweis signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen wurde der Log-Rank Test herangezogen. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Technische Aspekte

Insgesamt 9.156 (87,7%) von 10.439 auf den Tumor-TMAs enthaltenen Gewebeproben waren auswertbar. Die Ursachen für nicht auswertbare Proben lagen im Fehlen von eindeutigen Tumorzellen auf den Gewebeproben oder im kompletten Fehlen einzelner Gewebesparts auf dem TMA. Dass nicht der komplette TMA-Schnitt an jeder einzelnen Position ein Gewebefragment aufweist, ist ein unvermeidbares Problem der TMA-Methode. Der Grund dafür liegt in der ungleichen Länge der in einen TMA-Block eingebrachten Stenzen und technische Schwierigkeiten dabei, das obere Ende der in den TMA-Empfängerblock eingebrachten Zylinder genau auf der Ebene der Blockoberfläche zu platzieren. Falls der Tumorgewebszylinder ein wenig zu tief in den Block eingebracht wurde, enthalten die obersten Schnitte durch den TMA-Block kein Gewebe von den zu tief eingedrückten Stenzen. Während diese Stenzen auf späteren Schnitten korrekt angeschnitten werden und dann in die Untersuchungen mit eingehen, werden mit der zunehmenden Anzahl von hergestellten Schnitten die kürzeren Gewebestänzen nach und nach aufgebraucht, sodass diese auf den späteren Schnitten durch den Gewebeblock nicht mehr enthalten sind. Vom Normalgewebe-TMA waren von jeder der 76 Gewebekategorien eine ausreichende Zahl ($n \geq 4$) auswertbar um die entsprechenden Zelltypen der Gewebe beurteilen zu können.

3.2 CK13 Expression in Normalgeweben

Eine starke CK13 Färbung fand sich regelmäßig in allen suprabasalen Zelllagen von nicht-verhornendem Plattenepithel. In Basalzellen von nicht-verhornenden Plattenepithelien war die CK13 Färbung in der Regel nicht sichtbar oder deutlich abgeschwächt. Im Ösophagus-Plattenepithel schien die CK13 Anfärbung auch die Basalzellschicht mit einzunehmen. In verhornendem Plattenepithel der Haut war CK13 in der Regel nicht nachweisbar und auch Hautanhangsstrukturen wie Haarfollikel und Talgdrüsen waren CK13 negativ. Einzelne CK13 positive Zellen fanden sich aber in vereinzelt Hautgewebeproben z.B. in der Analhaut. Eine starke CK13 Färbung fand sich auch in Hassall'schen Körperchen und Epithelzellen der Medulla des Thymus, während der Kortex des Thymus CK13 negativ war. In

der Tonsille waren viele Plattenepithelzellen stark CK13 positiv, auch hier waren aber basale Zelllagen CK13 negativ. Eine kräftige CK13 Anfärbung fand sich auch im Urothel, wo die Deckzellschicht (umbrella cells) sich allerdings deutlich schwächer anfärbte oder gar negativ war und auch im Übergangsepithel des Analkanals. Vereinzelte CK13 positive Zellen fanden sich auch in serösen Drüsenzellen der Glandula submandibularis, im Endometrium, sowie in Basalzellen der Prostata und der Samenblase. In einzelnen Proben von respiratorischem Epithel zeigten die Basalzellen eine schwache CK13 Anfärbung. CK13 war immer negativ in gastrointestinalem Epithel, Gallenblase, Leber, Pankreas, Lungenparenchym, Tuba uterina, endozervikalen Drüsen des Uterus, Ovar, Plazenta, Lymphozyten, Zellen der Hämatopoese, mesenchymalen Geweben, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Nebenniere, Hypophyse und dem Gehirn. Repräsentative Bilder von CK13 angefärbten Normalgeweben sind in Abb. 19-31 dargestellt.

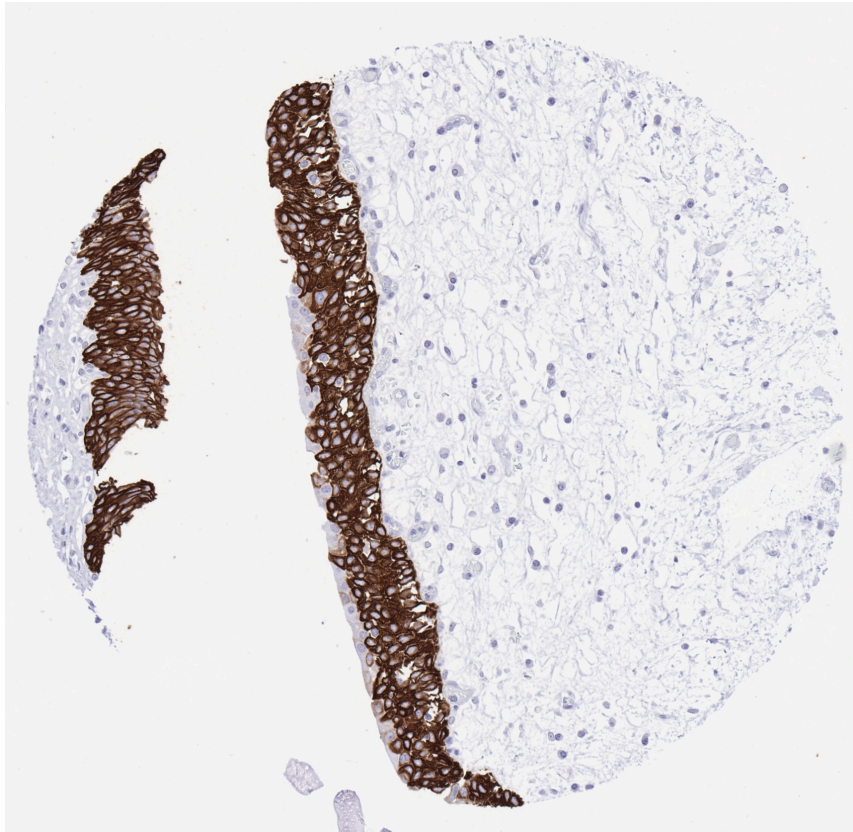


Abb. 19: **Urothel der Harnblase.** Kräftige CK13 Anfärbung von allen Urothelzellen mit Ausnahme der Deckzellen (umbrella cells).



Abb. 20: **Ösophagus.** Kräftige CK13 Anfärbung von allen Zelllagen, wobei die Färbung in Basalzellen schwächer ausfällt.

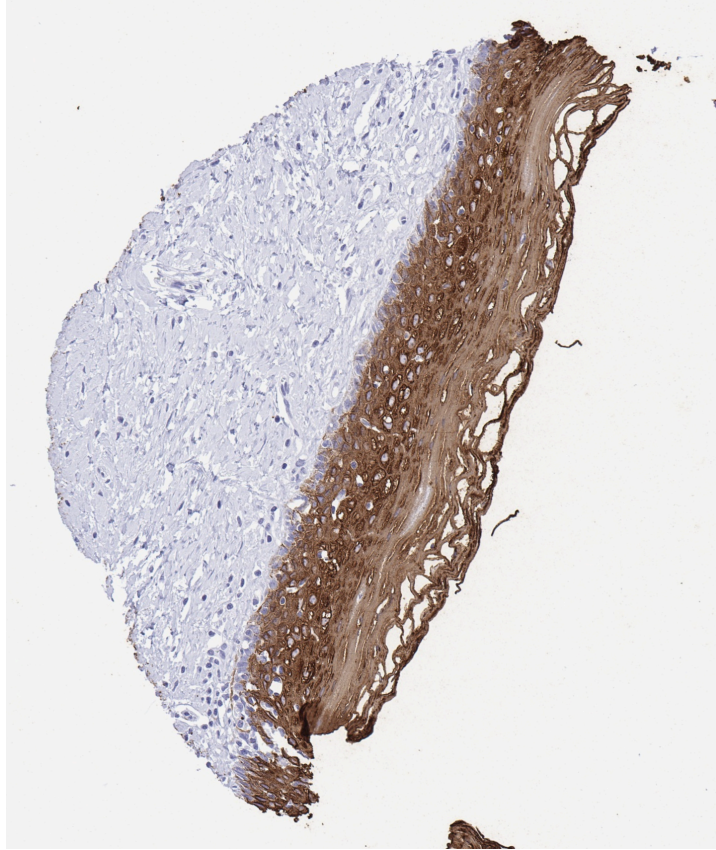


Abb. 21: **Uterus, Zervix (Portio)**. Kräftige Anfärbung des nicht-verhornenden Plattenepithels der Ektozervix. Die Basalzellschicht zeigt keine oder nur diskrete CK13 Anfärbung.

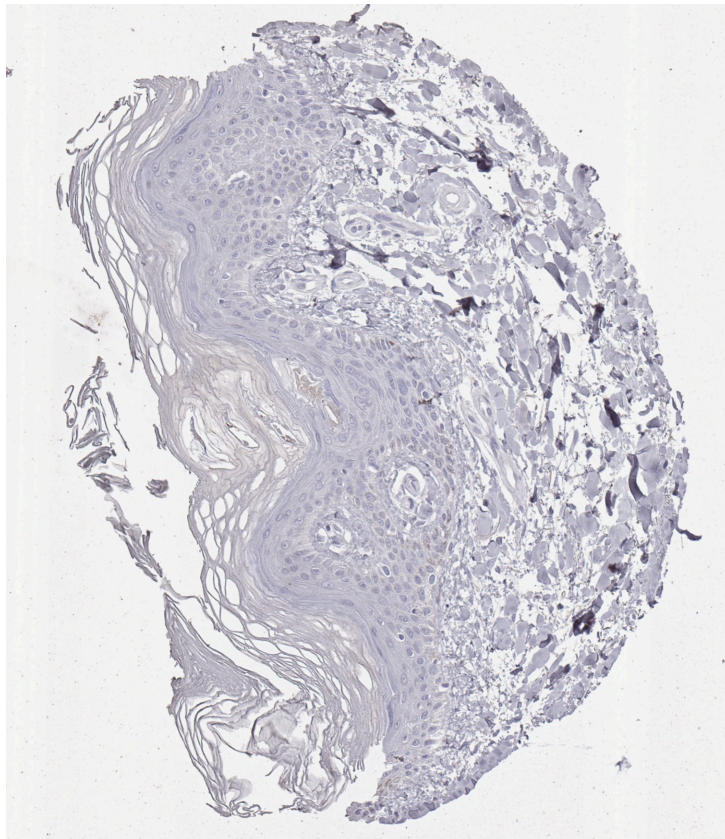


Abb. 22: **Haut**. Keine CK13 Anfärbung von verhornendem Plattenepithel der Epidermis.

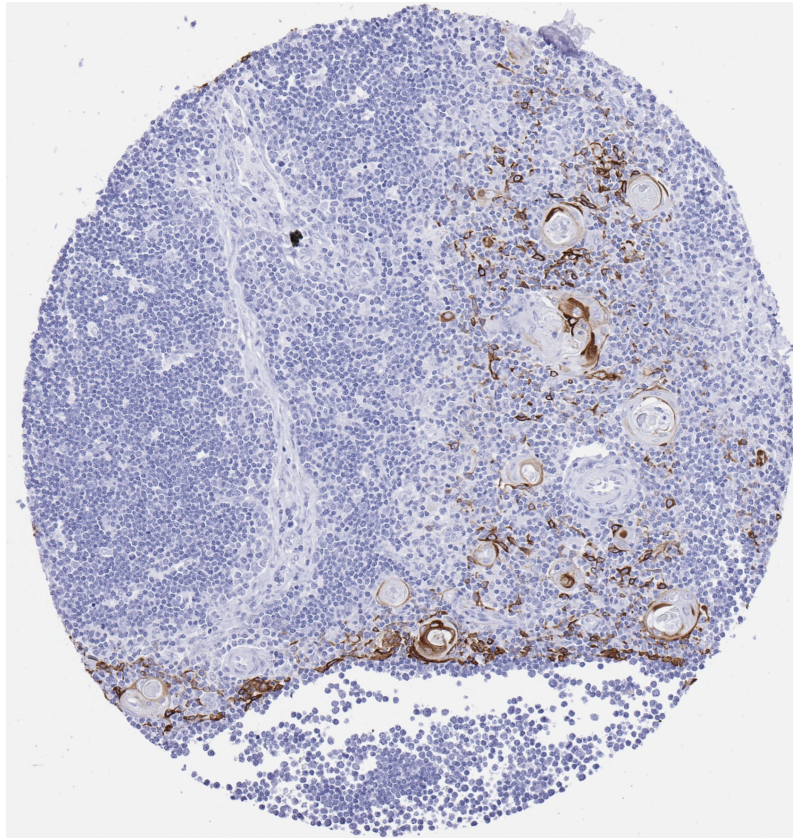


Abb. 23: **Thymus**. Mäßig starke CK13 Anfärbung von plattenepithelial differenzierten Zellen von Hassall'schen Körperchen und von Epithelzellen der Medulla aber nicht des Kortex.

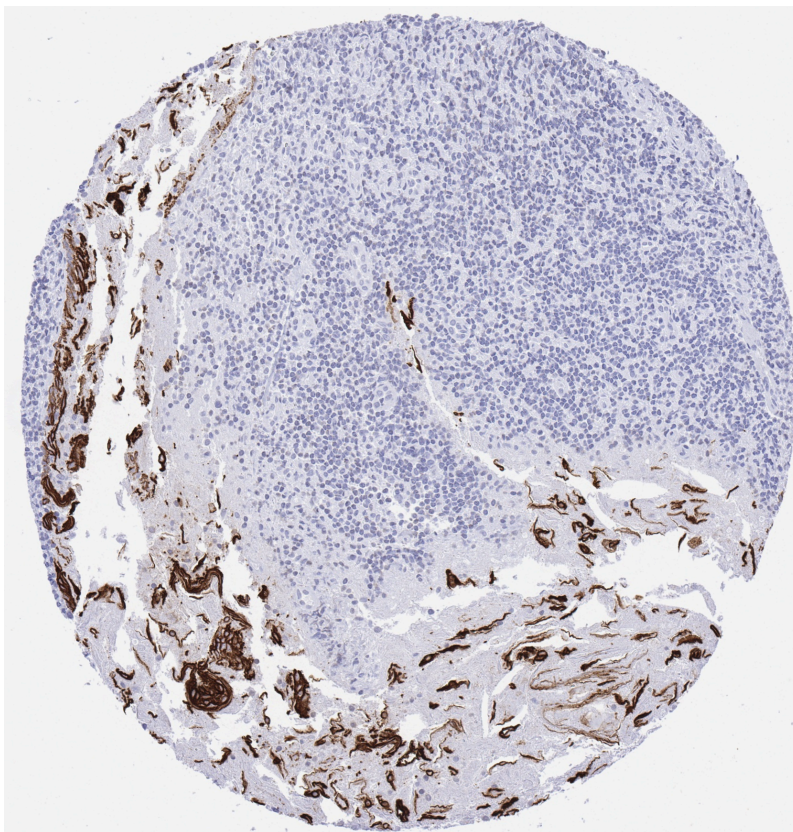


Abb. 24: **Tonsille**. Kräftige CK13 Anfärbung in einem Teil der desquamierten Plattenepithelien von Krypten.

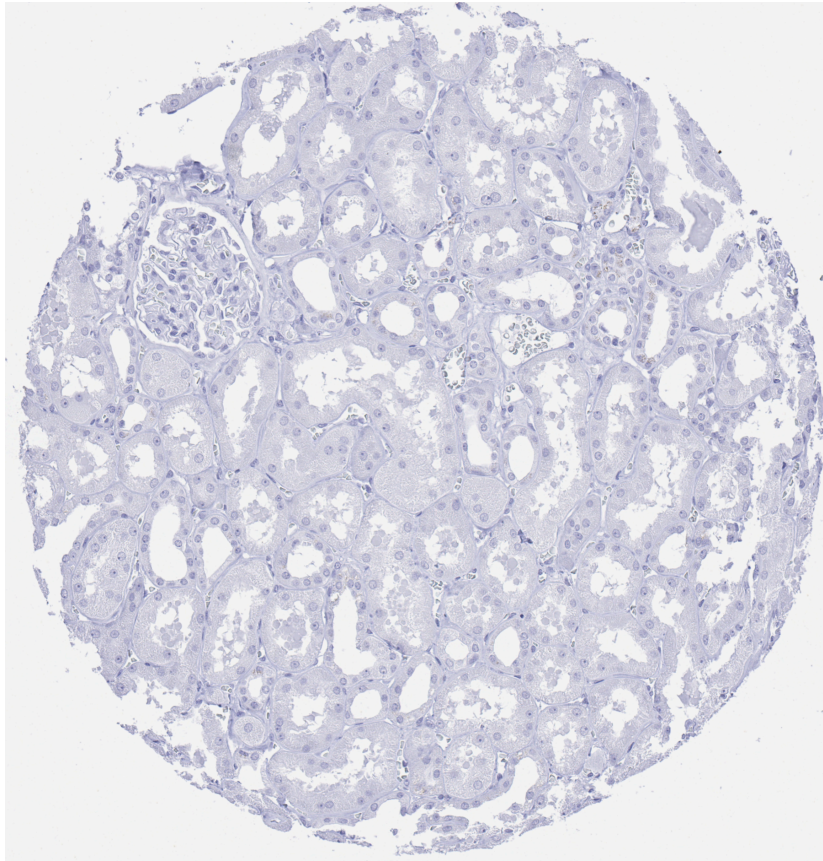


Abb. 25: **Niere, Rinde.** Keine CK13 Anfärbung.

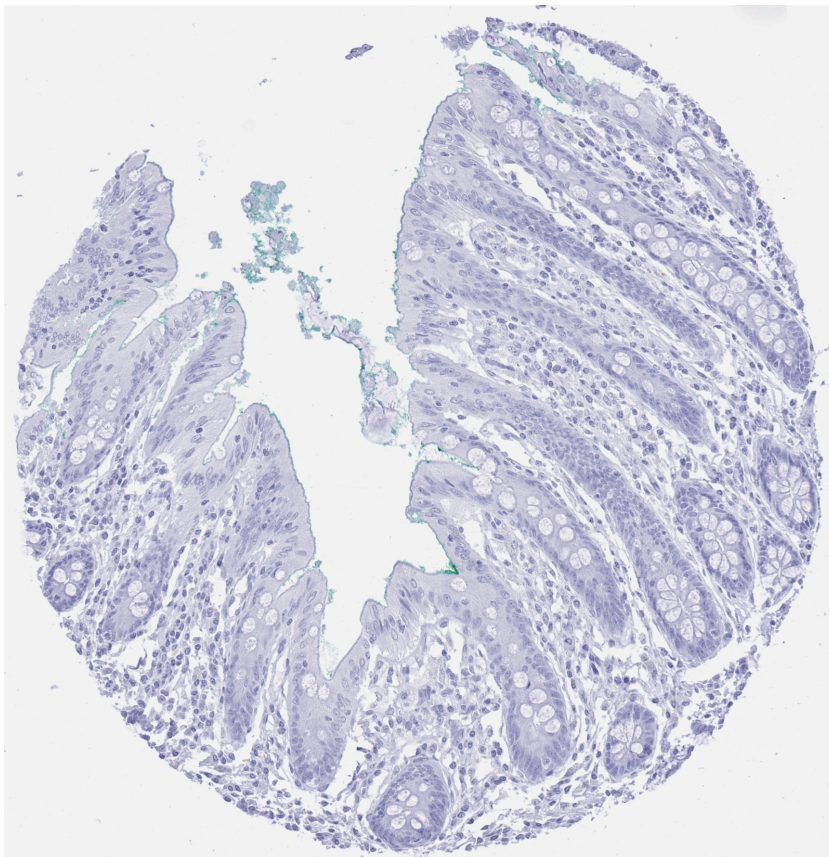


Abb. 26: **Appendix (Mucosa).** Keine CK13 Anfärbung.

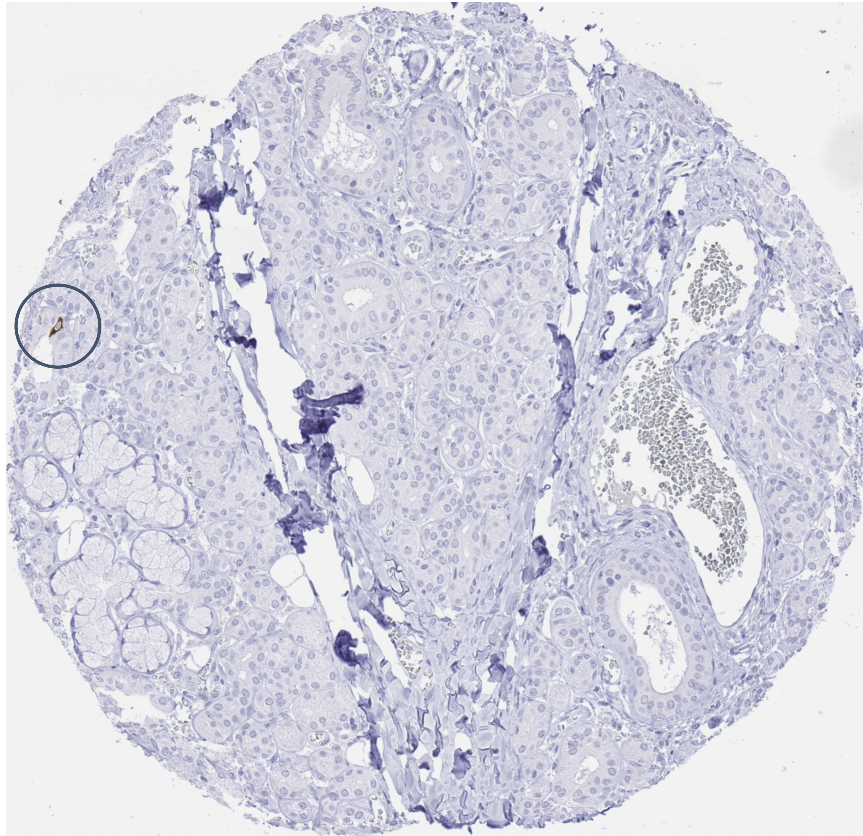


Abb. 27: **Glandula submandibularis**. Mäßig starke CK13 Positivität in einer einzelnen serösen Drüsenzelle.

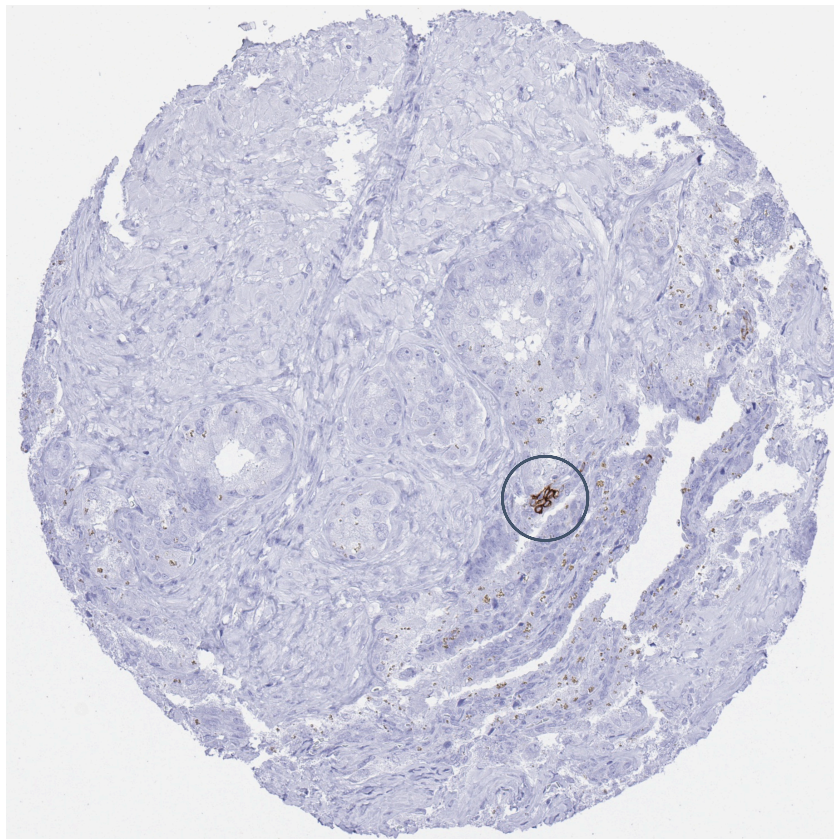


Abb. 28: **Samenblase**. Umschriebene kräftige CK13 Positivität in einer kleinen Gruppe von Basalzellen.

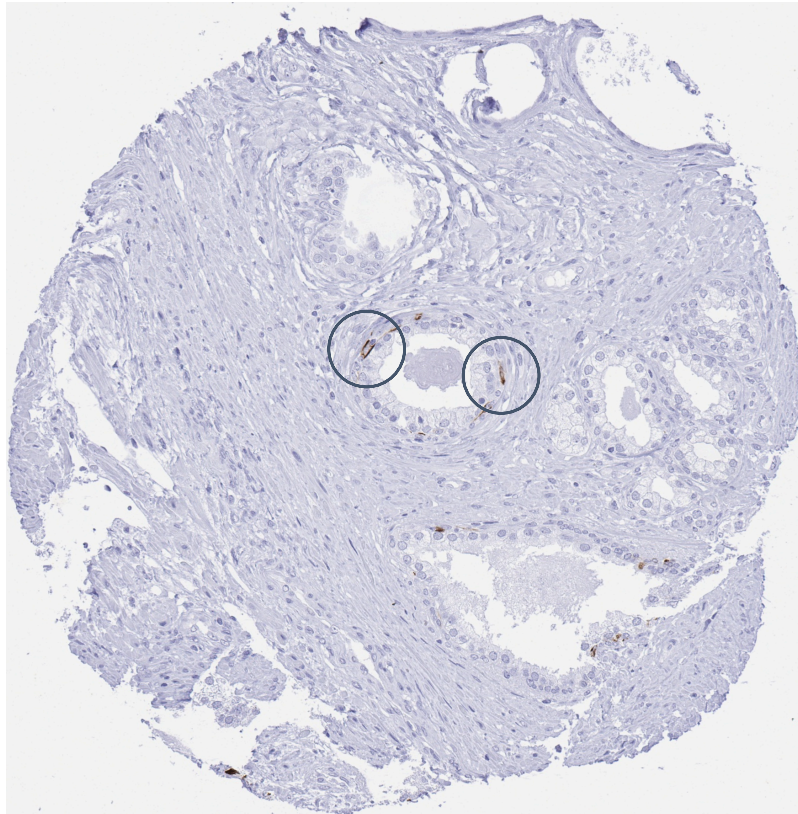


Abb. 29: **Prostata**. Schwache bis mäßiggradige CK13 Positivität von einzelnen Basalzellen der Prostata Drüsen.

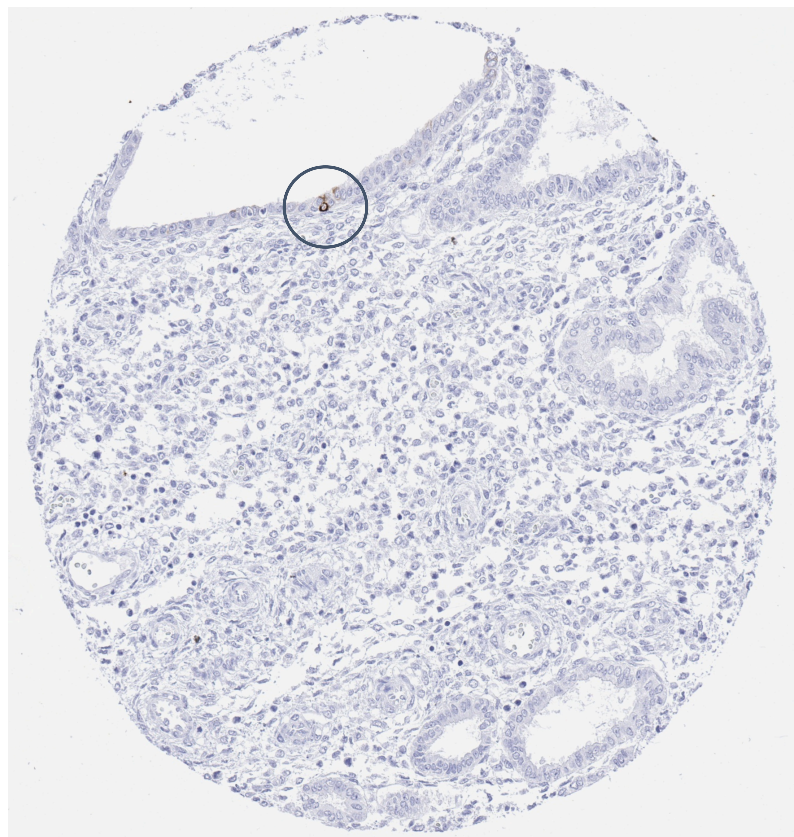


Abb. 30: **Uterus, Endometrium (Sekretionsphase)**. Mäßig starke CK13 Positivität einer solitären Endometriumepithelzelle.

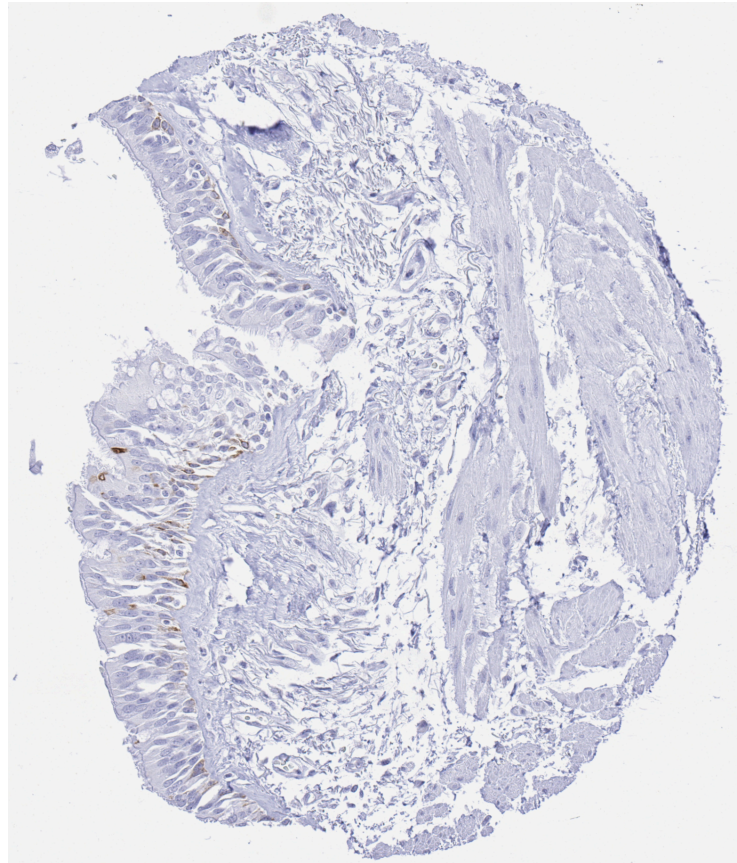


Abb. 31: **Bronchus (respiratorisches Epithel)**. Schwache CK13 Anfärbung der meisten Basalzellen in dieser Gewebeprobe.

3.3 CK13 in Tumoren

Eine CK13 Immunfärbung war in 1.563 (17,1%) der 9.156 auswertbaren Tumoren nachweisbar. Davon zeigten 665 (7,3%) der Tumoren eine schwache, 258 (2,8%) eine mäßiggradige und 640 (7,0%) eine starke CK13 Färbung. Insgesamt 42 (32,1%) von 131 Tumorkategorien zeigten in mindestens einem Fall eine nachweisbare CK13 Anfärbung, und 24 (18,3%) unserer Tumorkategorien beinhalteten zumindestens einen Fall mit einer starken CK13 Positivität. Die Ergebnisse der Untersuchung sind organsystematisch in Tabelle 7 dargestellt. Zudem zeigen Abb. 32 und Tabelle 8 eine Darstellung der CK13 positiven und stark positiven Fälle, sortiert nach der Häufigkeit der Positivität beziehungsweise starken Positivität. Die höchsten Positivitätsraten fanden sich für CK13 in verschiedenen Kategorien von urothelialen Neoplasien (52,1-92,3%) einschließlich von Brenner Tumoren des Ovars (86,8%) und in Plattenepithelkarzinomen von verschiedenen Ursprungsorten (39,1-77,6%), Warthin-Tumoren der Speicheldrüsen (66,7%), adenosquamösen Karzinomen der Zervix uteri (33,3%), Thymomen (16,0%) und in endometrioiden Karzinomen des Ovars (15,3%). 20 andere epitheliale oder Keimzellneoplasien zeigten eine – meistens schwache – CK13 Positivität in weniger als 15% der Fälle. In einem Teil dieser nur seltenerweise CK13 positiven Tumorentitäten fand sich eine CK13 Positivität insbesondere in Arealen mit wahrscheinlicher plattenepithelialer Differenzierung (Abb. 39). Allerdings konnte eine CK13 Expression auch in Tumoren nachgewiesen werden, bei denen ein derartiges morphologisches Phänomen eindeutig nicht bestand (Abb. 37, 38). Eine CK13 Anfärbung fand sich in hämatopoetischen, lymphatischen und mesenchymalen Neoplasien nie. Repräsentative Bilder von Tumoren nach CK13 Immunfärbung sind in Abb. 33-40 dargestellt.

Organ-system	Entität bzw. Subentität	% neg.	% schwach pos.	% mäßig stark pos.	% stark pos.	% gesamt pos.
Tumoren der Haut	Pilomatrixom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Basalzellkarzinom	97,3	2,7	0,0	0,0	2,7
	Benigner Naevus	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Haut Plattenepithelkarzinom	60,9	33,3	3,4	2,3	39,0
	Malignes Melanom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Malignes Melanom Lymphknoten-Metastase	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Merkelzellkarzinom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Kopf-Hals-Tumoren	Larynx Plattenepithelkarzinom	32,0	33,0	5,2	29,9	68,1
	Pharynx Plattenepithelkarzinom	25,0	30,4	16,1	28,6	75,1
	Mundboden Plattenepithelkarzinom	44,1	32,3	11,0	12,6	55,9
	Parotis pleomorphes Adenom	95,7	2,2	2,2	0,0	4,4
	Parotis Warthin Tumor	33,3	56,3	8,3	2,1	66,7
	Speicheldrüsen Basalzelladenom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tumoren der Lunge, Pleura und Thymus	Lunge Adenokarzinom	98,9	1,1	0,0	0,0	1,1
	Lunge Plattenepithelkarzinom	36,8	20,6	14,7	27,9	63,2
	Lunge kleinzelliges Karzinom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Mesotheliom, epitheloid	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Mesotheliom, sonstiges	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Thymom	84,0	12,0	4,0	0,0	16,0

Gynäkologische Tumoren	Vagina Plattenepithelkarzinom	33,8	25,4	8,5	32,4	66,3
	Vulva Plattenepithelkarzinom	44,6	34,7	6,6	14,0	55,3
	Zervix Plattenepithelkarzinom	22,4	21,4	10,8	45,4	77,6
	Zervix adenosquamöses Karzinom	66,7	22,2	5,6	5,6	33,4
	Zervix Adenokarzinom	86,5	11,5	1,9	0,0	13,4
	Endometriumkarzinom endometrioid	95,9	0,0	4,1	0,0	4,1
	Endometriumkarzinom serös	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Uterus Karzinosarkom	88,9	11,1	0,0	0,0	11,1
	Ovarialkarzinom endometrioid	84,7	10,2	5,1	0,0	15,3
	Ovarialkarzinom serös	93,5	6,5	0,0	0,0	6,5
	Ovarialkarzinom muzinös	93,5	4,3	2,2	0,0	6,5
	Ovarialkarzinom klarzellig	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Karzinosarkom des Ovars	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabelle 7: CK13 Expression in Tumoren.

Organ-system	Entität bzw. Subentität	% neg.	% schwach pos.	% mäßig stark pos.	% stark pos.	% gesamt pos.
Gynäkologische Tumoren	Granulosazelltumor des Ovars	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Leydig-Zelltumor des Ovars	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Sertoli-Leydig-Zelltumor des Ovars	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Sertoli-Leydig-Zell-Tumor des Ovars	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Steroidzelltumor des Ovars	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Brennertumor	13,2	13,2	0,0	73,7	86,9

Tumoren der Brust	Invasives Mammakarzinom NST	98,4	1,3	0,1	0,2	1,6
	Mammakarzinom lobulär	99,3	0,7	0,0	0,0	0,7
	Mammakarzinom medullär	96,6	3,4	0,0	0,0	3,4
	Mammakarzinom tubulär	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Mammakarzinom muzinös	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Phylloides tumor der Mamma	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Gastrointestinale Tumoren	Adenomatöser Polyp, low-grade Dysplasie	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Adenomatöser Polyp, high-grade Dysplasie	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Colon Adenokarzinom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Magen Adenokarzinom, diffuser Typ	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Magen Adenokarzinom, intestinaler Typ	92,3	5,1	1,3	1,3	7,7
	Ösophagus Adenokarzinom	98,8	0,0	1,3	0,0	1,3
	Ösophagus Plattenepithelkarzinom	48,6	22,9	8,6	20,0	51,5
	Analkanal Plattenepithelkarzinom	31,6	31,6	10,1	26,6	68,3
	Cholangiokarzinom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Hepatozelluläres Karzinom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Pankreas duktales Adenokarzinom	85,1	11,9	0,0	3,0	14,9
	Pankreas/Papille Adenokarzinom	87,5	12,5	0,0	0,0	12,5
	Pankreas Azinuszellkarzinom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Gastrointestinaler Stromatumor (GIST)	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabelle 7 Fortsetzung: **CK13 Expression in Tumoren.**

Organ-system	Entität bzw. Subentität	% neg.	% schwach pos.	% mäßig stark pos.	% stark pos.	% gesamt pos.
Urogenitale Tumoren	Urothelkarzinom pTa G2 low grade	7,7	13,8	11,5	66,9	92,2
	Urothelkarzinom pTa G2 high grade	30,1	17,7	10,6	41,6	69,9
	Urothelkarzinom pTa G3	34,0	30,2	14,5	21,4	66,1
	Urothelkarzinom pT2-4 G3	47,9	20,4	11,9	19,7	52,0
	Harnblase Plattenepithelkarzinom	40,0	30,0	10,0	20,0	60,0
	Harnblasenkarzinom kleinzellig neuroendokrin	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Urothelkarzinom sarkomatoid	85,7	4,8	4,8	4,8	14,4
	Urothelkarzinom des Nierenbeckens	41,0	27,9	8,2	23,0	59,1
	Nierenzellkarzinom klarzellig	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Nierenzellkarzinom papillär	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Nierenzellkarzinom chromophob	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Onkozytom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Prostata Adenokarzinom Gleason 3+3	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Prostata Adenokarzinom Gleason 4+4	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Prostata Adenokarzinom Gleason 5+5	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Prostatakarzinom kleinzellig neuroendokrin	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Seminom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	embryonales Karzinom des Hodens	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Leydigzelltumor des Hodens	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Sertolizelltumor des Hodens	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Keimstrang-Stroma-Tumor des Hodens	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Spermatozytischer Tumor des Hodens	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Dottersacktumor des Hodens	97,5	0,0	2,5	0,0	2,5
	Teratom	90,6	0,0	9,4	0,0	9,4
	Penis Plattenepithelkarzinom	39,0	33,8	11,7	15,6	61,1

Tabelle 7 Fortsetzung: **CK13 Expression in Tumoren.**

Organ-system	Entität bzw. Subentität	% neg.	% schwach pos.	% mäßig stark pos.	% stark pos.	% gesamt pos.
Endokrine Tumoren	Schilddrüsenadenom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Schilddrüsenkarzinom papillär	97,6	2,4	0,0	0,0	2,4
	Schilddrüsenkarzinom follikulär	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Schilddrüsenkarzinom medullär	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Nebenschilddrüsenadenom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Schilddrüsenkarzinom anaplastisch	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Nebennierenrindenadenom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Nebennierenrindencarzinom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Phäochromozytom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Appendix neuroendokriner Tumor (NET)	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Kolorektal neuroendokriner Tumor	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Ileum neuroendokriner Tumor	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Lunge neuroendokriner Tumor	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Pankreas neuroendokriner Tumor	98,9	1,1	0,0	0,0	1,1
	Kolorektal neuroendokrines Karzinom (NEC)	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Gallenblase neuroendokrines Karzinom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Pankreas neuroendokrines Karzinom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Hämatopoetische und lymphatische Tumoren	Hodgkin Lymphom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Kleinzelliges lymphozytisches B-Zell-Lymphom (B-SLL/B-CLL)	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Lymphom follikulär	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	T-Zell Non Hodgkin Lymphom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Mantelzelllymphom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Marginalzonenlymphom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Diffuse large b cell lymphoma DLBCL des Hodens	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Burkitt Lymphom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabelle 7 Fortsetzung: **CK13 Expression in Tumoren.**

Organ-system	Entität bzw. Subentität	% neg.	% schwach pos.	% mäßig stark pos.	% stark pos.	% gesamt pos.
Knochen- und Weichgewebstumoren	Riesenzell-Sehnenscheiden Tumor	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Granularzelltumor	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Leiomyom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Leiomyosarkom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Liposarkom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST)	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Myofibrosarkom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Angiosarkom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Angiomyolipom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Dermatofibrosarkoma protuberans	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Ganglioneurom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Kaposi-Sarkom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Neurofibrom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS)	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Paragangliom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Ewing Sarkom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Rhabdomyosarkom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Schwannom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Synoviales Sarkom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Osteosarkom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Chondrosarkom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rhabdoidtumor	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

Tabelle 7 Fortsetzung: CK13 Expression in Tumoren.

Tumorentität	≥ schwach pos. (%)	≥ mäßig stark pos. (%)	stark pos. (%)
Urothelkarzinom pTa G2 low grade	92,3	78,5	66,9
Brenner Tumor	86,8	73,7	73,7
Zervix Plattenepithelkarzinom	77,6	56,3	45,4
Pharynx Plattenepithelkarzinom	75,0	44,6	28,6
Urothelkarzinom pTa G2 high grade	69,9	52,2	41,6
Analkanal Plattenepithelkarzinom	68,4	36,7	26,6
Larynx Plattenepithelkarzinom	68,0	35,1	29,9
Parotis Warthin Tumor	66,7	10,4	2,1
Vagina Plattenepithelkarzinom	66,2	40,8	32,4
Urothelkarzinom pTa G3	66,0	35,8	21,4
Lunge Plattenepithelkarzinom	63,2	42,6	27,9
Penis Plattenepithelkarzinom	61,0	27,3	15,6
Harnblase Plattenepithelkarzinom	60,0	30,0	20,0
Urothelkarzinom des Nierenbeckens	59,0	31,1	23,0
Mundboden Plattenepithelkarzinom	55,9	23,6	12,6
Vulva Plattenepithelkarzinom	55,4	20,7	14,0
Urothelkarzinom pT2-4 G3	52,1	31,7	19,7
Ösophagus Plattenepithelkarzinom	51,4	28,6	20,0
Haut Plattenepithelkarzinom	39,1	5,7	2,3
Zervix adenosquamoses Karzinom	33,3	11,1	5,6
Thymom	16,0	4,0	0,0
Ovarialkarzinom endometrioid	15,3	5,1	0,0
Pankreas duktales Adenokarzinom	14,9	3,0	3,0
Urothelkarzinom sarkomatoid	14,3	9,5	4,8
Zervix Adenokarzinom	13,5	1,9	0,0
Pankreas/Papille Adenokarzinom	12,5	0,0	0,0
Uterus Karzinosarkom	11,1	0,0	0,0
Teratom	9,4	9,4	0,0
Magen Adenokarzinom, intestinaler Typ	7,7	2,6	1,3
Ovarialkarzinom muzinös	6,5	2,2	0,0
Ovarialkarzinom serös	6,5	0,0	0,0
Parotis Pleomorphes Adenom	4,3	2,2	0,0
Endometriumkarzinom endometrioid	4,1	4,1	0,0
Mammakarzinom medullär	3,4	0,0	0,0
Basalzellkarzinom	2,7	0,0	0,0
Dottersacktumor des Hodens	2,5	2,5	0,0
Schilddrüsenkarzinom papillär	2,4	0,0	0,0
Invasives Mammakarzinom NST	1,6	0,3	0,2
Ösophagus Adenokarzinom	1,3	1,3	0,0
Pankreas neuroendokriner Tumor (NET)	1,1	0,0	0,0
Lunge Adenokarzinom	1,1	0,0	0,0
Mammakarzinom lobulär	0,7	0,0	0,0

Tabelle 8: **CK13 Positivität in Tumoren (Rangliste).**

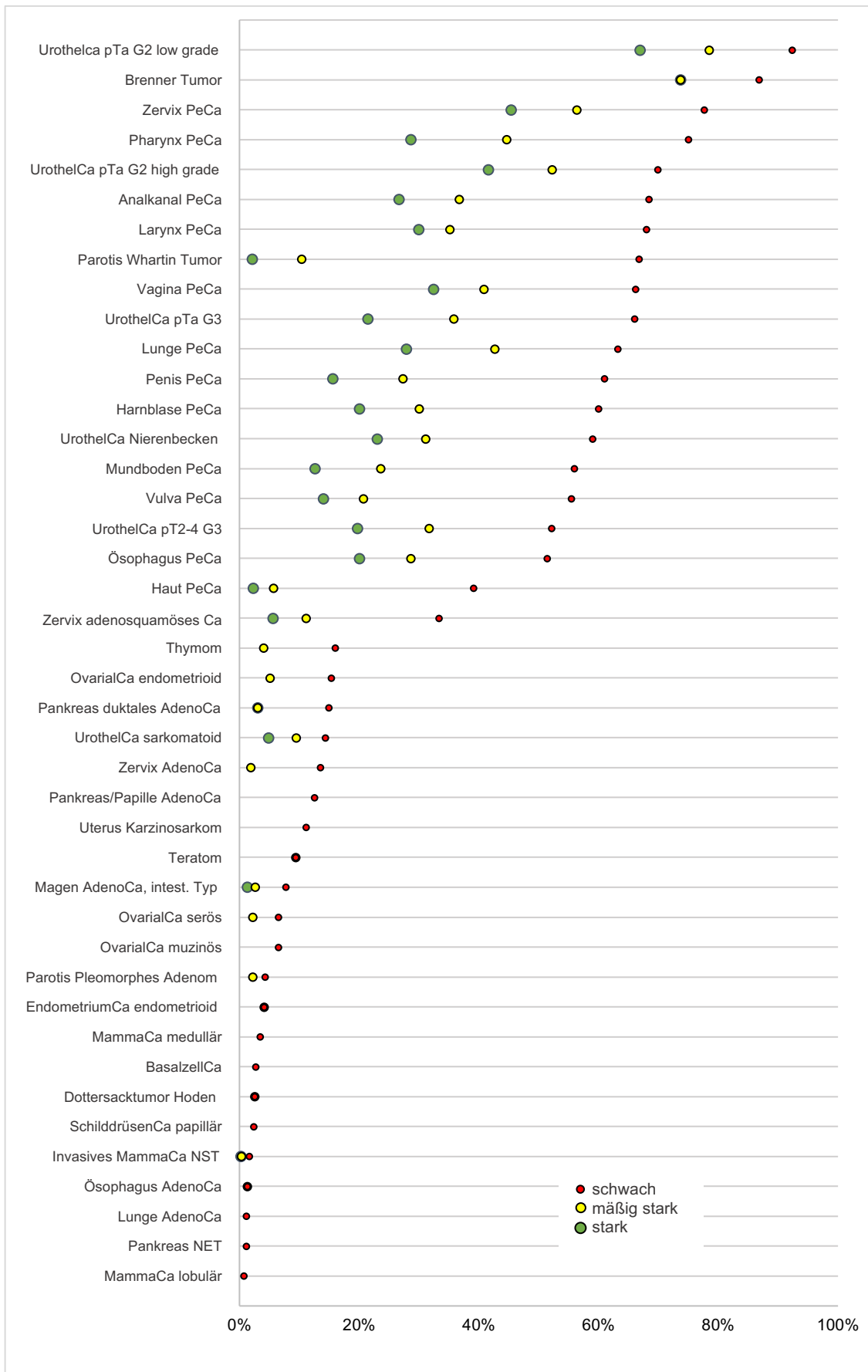


Abb. 32: **Positive Fälle.** Darstellung der CK13 schwach, mäßig stark und stark positiven Fälle, sortiert nach der Häufigkeit der Positivität.

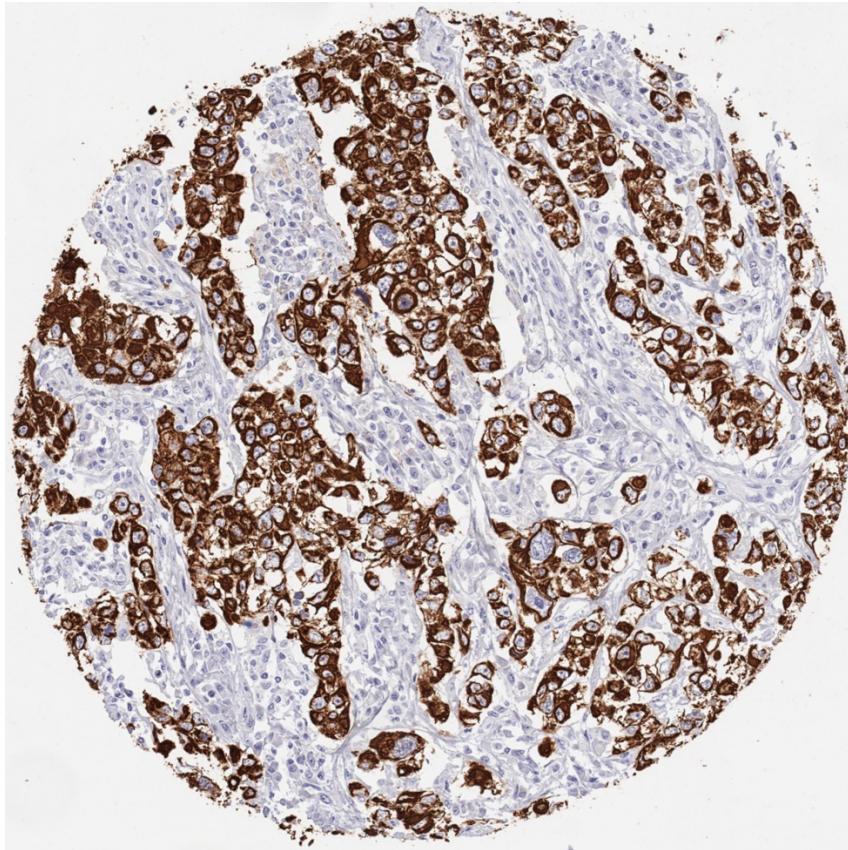


Abb. 33: **Harnblase.** Kräftige zytoplasmatische CK13 Positivität in einem muskelinvasiven Urothelkarzinom.

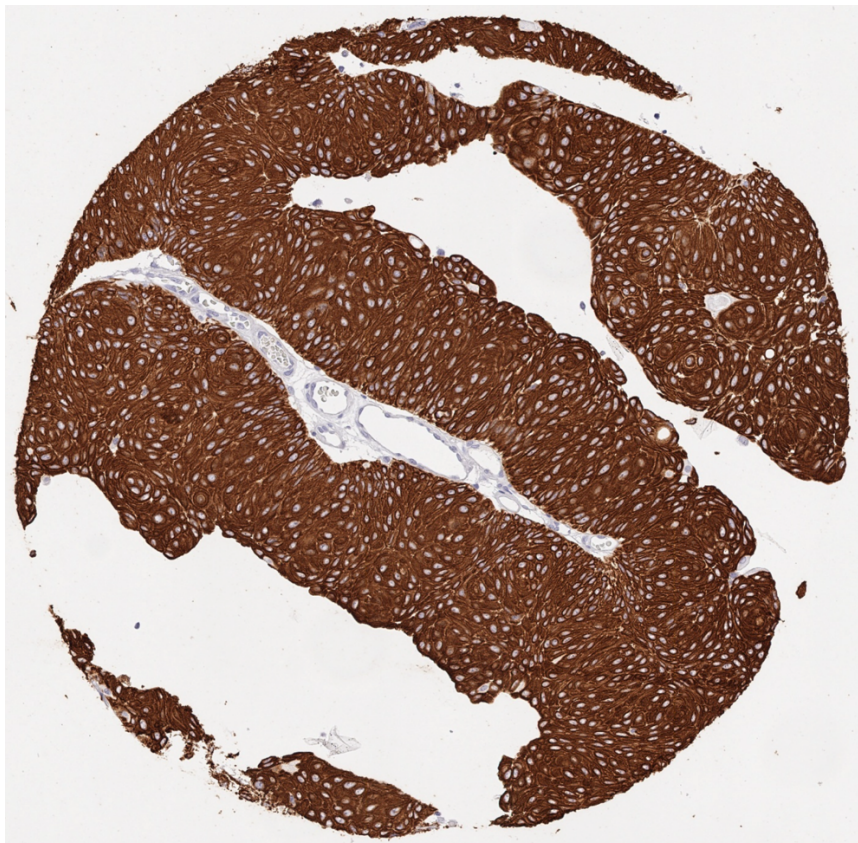


Abb. 34: **Harnblase.** Kräftige CK13 Positivität in allen Zellen eines nicht-invasiven papillären Urothelkarzinoms (low-grade, pTaG2).

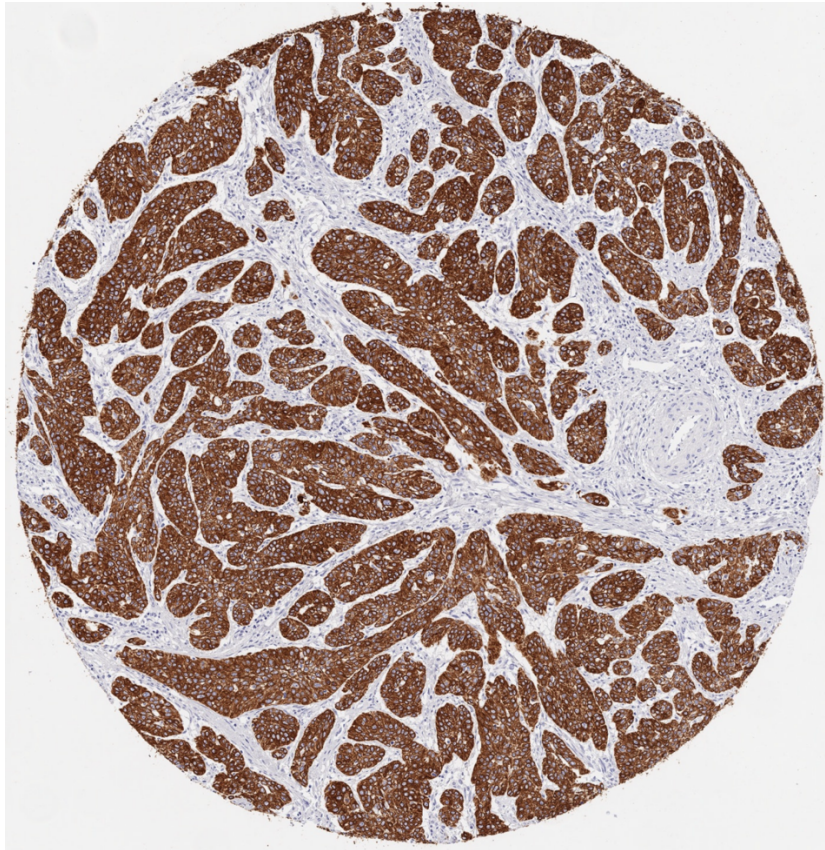


Abb. 35: **Uterus, Zervix.** Starke CK13 Anfärbung in allen Zellen eines Plattenepithelkarzinoms der Zervix.

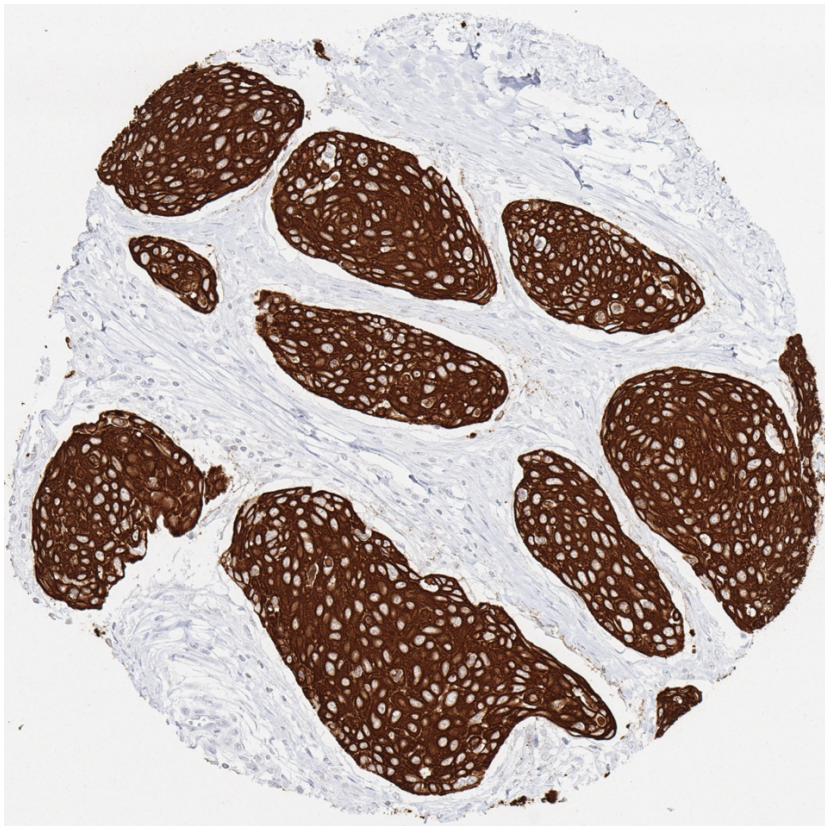


Abb. 36: **Analkanal.** Sehr starke CK13 Expression in allen Tumorzellen eines analen Plattenepithelkarzinoms.

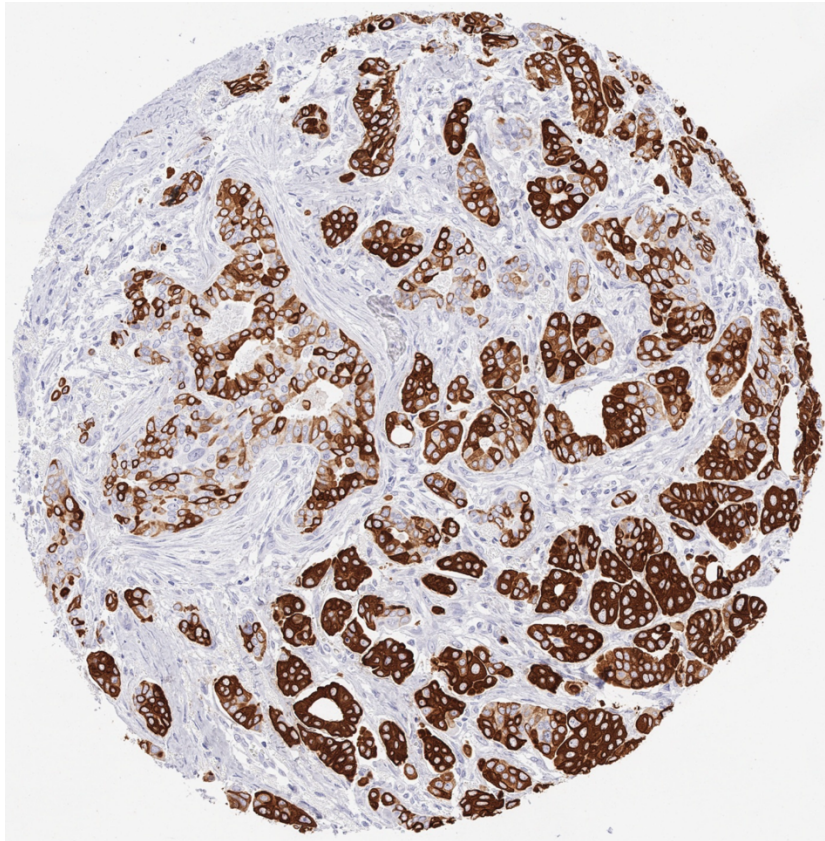


Abb. 37: **Mamma.** Mäßig starke bis starke CK13 Positivität in den Tumorzellen eines invasiven Mammakarzinoms vom nicht speziellen Typ (NST).

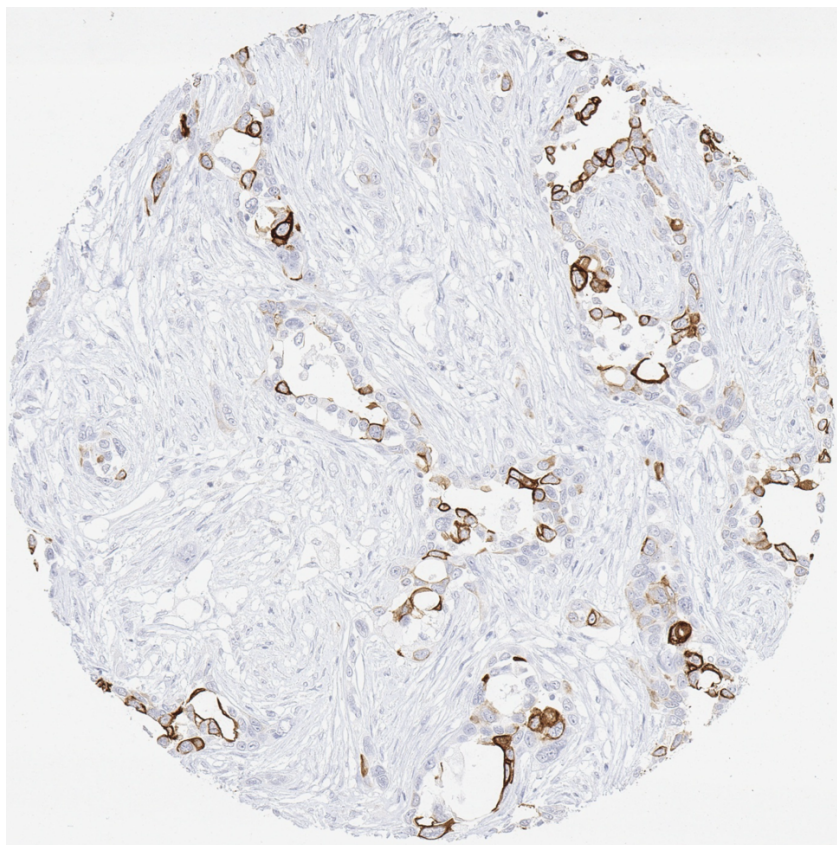


Abb. 38: **Magen.** Mäßig starke CK13 Positivität in knapp 50% der Tumorzellen eines Adenokarzinoms des Magens (intestinaler Typ).

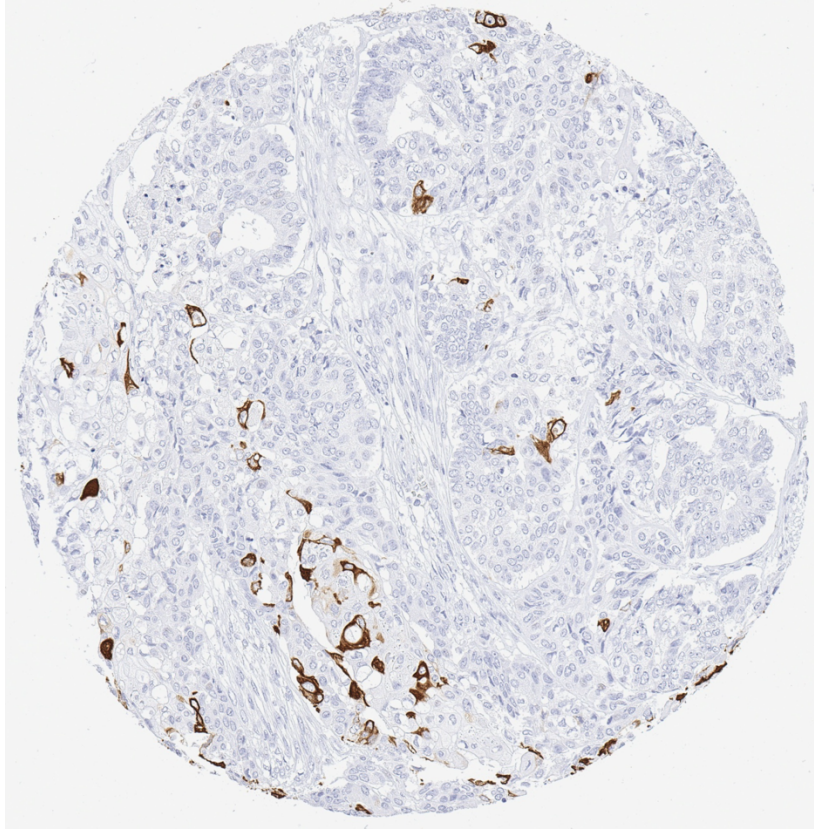


Abb. 39: **Ovar.** Endometrioides Ovarialkarzinom mit fokaler CK13 Expression in einem Bereich mit plattenepithelialer Differenzierung des Tumors.

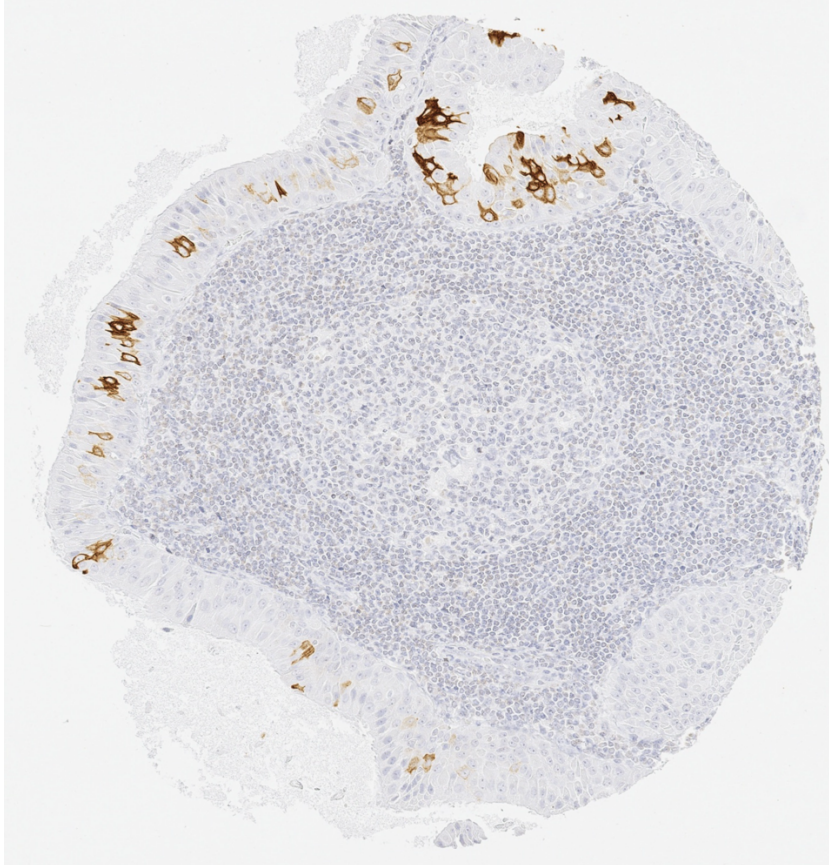


Abb. 40: **Parotis.** Warthin-Tumor mit zahlreichen eingestreuten CK13 positiven Epithelzellen.

3.4 CK13 und Tumorphänotyp in Urothel- und Plattenepithelkarzinomen

Die Beziehung zwischen CK13 Färbemustern und histopathologischen Parametern beim Urothelkarzinom sind in Tabelle 9 dargestellt. Es zeigt sich bei urothelialen Neoplasien eine signifikante Verminderung der CK13 Expression in Tumoren mit höherem Malignitätsgrad und fortgeschrittenem pT Stadium ($p < 0,0001$).

	n	CK13 Status (%)				p
		negativ	schwach	mäßig stark	stark	
Alle	868	35,3	18,8	12,4	33,5	
pTa G2 low	130	7,7	13,8	11,5	66,9	<0,0001
pTa G2 high	113	30,1	17,7	10,6	41,6	
pTa G3	136	36,0	31,6	12,5	19,9	
pT2-4	436	47,9	17,7	13,1	21,3	
pTa G2 low	130	7,7	13,8	11,5	66,9	<0,0001
pTa G2 high	113	30,1	17,7	10,6	41,6	
pTa G3	136	36,0	31,6	12,5	19,9	
pT2	116	49,1	18,1	10,3	22,4	0,7250
pT3	206	49,5	17,5	12,6	20,4	
pT4	102	43,1	17,6	18,6	20,6	
G2*	20	25,0	5,0	5,0	65,0	0,0002
G3*	403	48,9	18,4	13,9	18,9	
pN0*	244	50,4	19,3	10,2	20,1	0,1492
pN+*	170	43,6	17,3	17,9	21,2	

Tabelle 9: **Urothelkarzinome.** Ergebnisse der CK13-Immunhistochemie der untersuchten Urothelkarzinome in Bezug zu ihren histopathologischen Parametern. *nur >pT2

Die Beziehung zwischen CK13 Befunden und dem Tumorphänotyp ist für Plattenepithelkarzinome der Zervix uteri in Tabelle 10 dargestellt. Dabei fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen verminderter CK13 Färbung und einem hohen Malignitätsgrad ($p=0,0295$). Ein signifikanter Zusammenhang fand sich auch zwischen einer verminderten CK13 Immunfärbung und einem verkürztem rezidivfreien ($p=0,0094$, Abb. 41) und Gesamtüberleben ($p=0,0274$, Abb. 42).

	n	CK13 Status (%)				p
		negativ	schwach	mäßig stark	stark	
Alle	176	23,9	23,3	10,8	42,0	
pT1	113	23,0	22,1	9,7	45,1	0,5446
pT2	52	23,1	25,0	15,4	36,5	
pT3-4	11	36,4	27,3	0,0	36,4	
pN0	129	24,8	25,6	9,3	40,3	0,5216
pN1	45	22,2	17,8	15,6	44,4	
Grade 1	1	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0295
Grade 2	80	12,5	28,8	13,8	45,0	
Grade 3	93	34,4	19,4	8,6	37,6	

Tabelle 10: **Plattenepithelkarzinome Zervix uteri.** Ergebnisse der CK13-Immunhistochemie aller untersuchten Plattenepithelkarzinome der Zervix uteri in Bezug zu ihrem Tumorphänotyp.

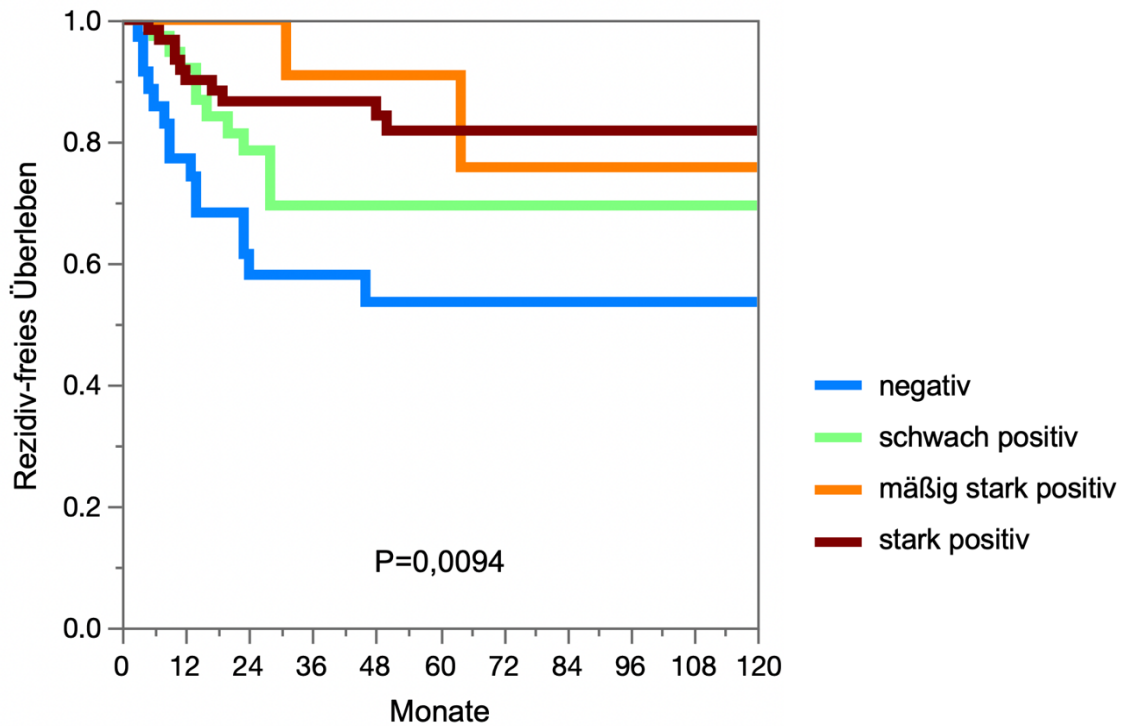


Abb. 41: **Plattenepithelkarzinome Zervix uteri (Rezidivfreies Überleben)**. Signifikanter Zusammenhang zwischen verminderter CK13-Immunfärbung und verkürztem rezidivfreiem Überleben.

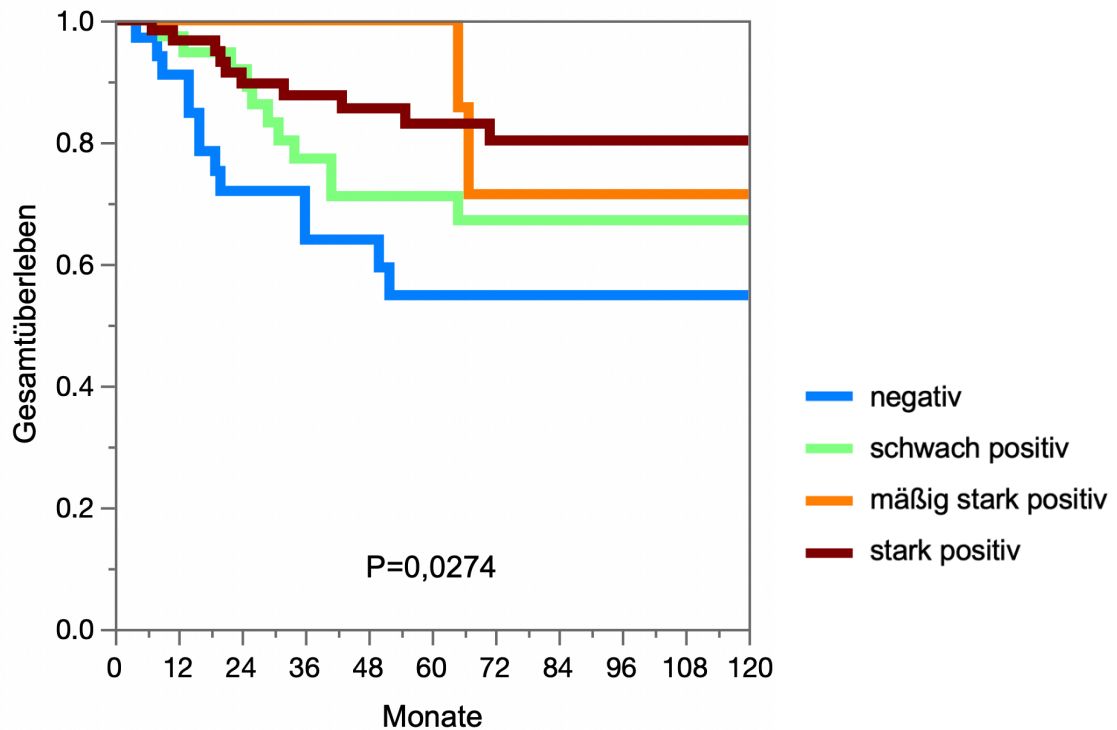


Abb. 42: **Plattenepithelkarzinome Zervix uteri (Gesamtüberleben)**. Signifikanter Zusammenhang zwischen verminderter CK13-Immunfärbung und verkürztem Gesamtüberleben.

In einer kombinierten Analyse von 1.151 Plattenepithelkarzinomen von 11 verschiedenen Ursprungsorten fand sich ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen verminderter CK13 Expression und hohem Malignitätsgrad ($p=0,0050$, Tabelle 11). Darüber hinaus war bei Betrachtung aller Tumoren ein signifikanter Zusammenhang zwischen verminderter CK13 Expression und dem Fehlen einer HPV-Infektion nachweisbar ($p=0,0002$, Tabelle 12). Die separate Analyse der neun in diese Analyse eingegangenen unterschiedlichen Subentitäten von Plattenepithelkarzinomen ergab allerdings in keiner dieser Gruppen einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem HPV-Status und der CK13 Expression. Es bestand auch keine einheitliche Tendenz zu mehr oder weniger HPV-Infektionen in Tumoren mit geringer oder kräftiger CK13 Expression.

	n	CK13 Status (%)				p
		negativ	schwach	mäßig stark	stark	
pT1	391	34,0	24,6	10,2	31,2	0,1722
pT2	325	34,2	31,7	9,2	24,9	
pT3	152	34,2	30,3	14,5	21,1	
pT4	134	37,3	30,6	9,0	23,1	
pN0	449	31,2	27,8	10,7	30,3	0,8061
pN+	356	34,3	27,5	10,1	28,1	
G1	37	43,2	24,3	16,2	16,2	0,0050
G2	468	29,7	33,1	10,9	26,3	
G3	351	40,2	23,1	8,8	27,9	

Tabelle 11: Histopathologische Daten und CK13 Expression in Plattenepithelkarzinomen.

	HPV Status	n	CK13 Status (%)				p
			negativ	schwach	mäßig stark	stark	
Alle PeCa	negativ	284	41,2	33,1	7,7	18,0	0,0002
	positiv	239	26,8	31,0	10,9	31,4	
Orale PeCa	negativ	65	38,5	38,5	9,2	13,8	0,7639
	positiv	13	30,8	53,8	7,7	7,7	
PeCa Pharynx	negativ	20	15,0	45,0	20,0	20,0	0,2444
	positiv	33	27,3	24,2	12,1	36,4	
PeCa Larynx	negativ	49	34,7	32,7	4,1	28,6	0,2765
	positiv	9	11,1	33,3	0,0	55,6	
PeCa Zervix	negativ	10	30,0	20,0	10,0	40,0	0,9105
	positiv	68	22,1	16,2	10,3	51,5	
PeCa Vagina	negativ	15	53,3	26,7	0,0	20,0	0,1293
	positiv	15	26,7	26,7	20,0	26,7	
PeCa Vulva	negativ	53	47,2	26,4	7,5	18,9	0,2150
	positiv	26	30,8	50,0	7,7	11,5	
PeCa Penis	negativ	30	43,3	30,0	13,3	13,3	0,7647
	positiv	43	32,6	39,5	11,6	16,3	
PeCa Haut	negativ	37	59,5	37,8	0,0	2,7	0,3866
	positiv	1	0,0	100,0	0,0	0,0	
PeCa Analkanal	negativ	5	20,0	20,0	20,0	40,0	0,8504
	positiv	31	29,0	32,3	12,9	25,8	

Tabelle 12: HPV-Status und CK13 Expression.

4. Diskussion

Unsere erfolgreiche Analyse von 9.156 Tumoren von 131 verschiedenen Tumortypen und Subtypen identifizierte eine CK13 Expression in 42 von 131 untersuchten Tumorkategorien und ermöglichte die Etablierung einer Rangliste dieser Tumortypen nach der Rate der positiven Fälle dieser Tumorarten. Die so ermittelten Daten passen gut zu der bereits bekannten wichtigen Rolle von CK13 für Plattenepithelneoplasien. Alle 12 analysierten Kategorien von Plattenepithelkarzinomen zeigten eine Positivitätsrate von >39% und waren alle in den top 19 Positionen unserer Rangliste. Ähnlich hohe CK13 Positivitätsraten fanden sich für urotheliale Neoplasien. Zu Urothelkarzinomen gibt es eine neuere Studie an 109 Proben welche einen Verlust der CK13 Expression in 57,8% der Urothelkarzinome nachweist und diesen mit einem aggressivem Krankheitsverlauf assoziiert (Worst et al., 2014). Einige ältere Publikationen hatten bereits darauf hingewiesen, dass CK13 sowohl in normalem Urothel wie auch in urothelialen Karzinomen exprimiert wird und mit zunehmendem Malignitätsgrad und fortgeschrittenem Stadium abnimmt. (Celis et al., 1996; Malecha & Miettinen, 1991; Moll et al., 1988; Riedel et al., 2001; Schaafsma et al., 1990; Schaafsma et al., 1991). RNA-Expressionsdaten welche mittels Next Generation Sequencing (NGS) im Rahmen des The Cancer Genome Atlas (TCGA) und des International Cancer Genome Consortiums (ICGC) erstellt worden waren, stellen heute ein wichtiges Nachschlagewerk dar zur Ermittlung der Expression von interessierenden Genen in relevanten Tumorarten (Consortium, 2020; International Cancer Genome et al., 2010). Unsere Befunde werden von den TCGA-Daten unterstützt, denn auch hier stellen plattenepitheliale Karzinome und urotheliale Neoplasien die mit Abstand am häufigsten CK13 exprimierenden Tumortypen dar. Dieses Expressionsverhalten in Tumoren passt letztlich gut zum Expressionsverhalten von CK13 in Normalgeweben, wo das Protein auch ganz überwiegend in Plattenepithel und Urothel exprimiert wird. Das weitgehende Fehlen einer CK13 Färbung in Basaliomen der Haut passt ebenfalls gut zum CK13 Muster von Normalgeweben, denn die Basalzellschicht ist in Plattenepithelien typischerweise CK13 negativ.

Eine geringe Rate an CK13 positiven Fällen (<15%) fand sich bei immerhin 20 verschiedenen Tumorarten. Diese gelegentliche Expression von CK13 in Tumoren,

welche sich weder vom Urothel noch vom Plattenepithel ableitet, könnte prinzipiell durch drei verschiedene Mechanismen erklärt werden. Dazu gehört eine CK13 Expression in fokal plattenepithelial differenzierten Tumoranteilen von ursprünglich nicht plattenepithelialen Karzinomen, eine Neoexpression von CK13 in nicht plattenepithelialen und nicht urothelialen Karzinomen ohne morphologische Plattenepitheldifferenzierung oder (wahrscheinlich seltener anzutreffen) eine Entstehung eines Tumors aus einer kleinen Subpopulation von physiologischerweise CK13 positiven Zellen des Ausgangsnormalgewebes. Eine physiologische CK13 Expression findet sich beispielsweise in sehr kleinen Subpopulationen von Speicheldrüsenepithelien oder Endometriumdrüsen und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass solche Zellen seltenerweise Ausgangspunkt einer neoplastischen Transformation sein könnten. Eine Plattenepitheldifferenzierung kommt in einem breiten Spektrum von Tumoren gelegentlich vor. Dies gilt insbesondere für Karzinome des Magens, Pankreas, der Mamma, des Ovars aber auch des Urothels (Ahn et al., 2015; Cimino-Mathews et al., 2016; Mahe & Sur, 2011; Minato et al., 2018; Voong et al., 2010). Die relativ neue Kategorie der metaplastischen Mammakarzinome beinhaltet eine heterogene Gruppe invasiver Karzinome, bestehend aus Adenokarzinomen mit Anteilen spindelzelliger, plattenepithelialer oder mesenchymaler Differenzierung. Über die genaue Definition dieser Entität treffen einige Autoren jedoch noch unterschiedliche Aussagen (Langlands et al., 2016, Pezzi et al., 2007). Diese metaplastischen Mammakarzinome machen 0,2-5% aller Mammakarzinome aus (Lakhani et al., 2012). Innerhalb dieser Gruppe werden diejenigen mit plattenepithelialen Anteilen verschiedensten Ausmaßes mit 11-60% angegeben (Cimino-Mathews et al., 2016; Jung et al., 2010). Eine ältere, gezieltere Studie identifizierte in einer Kohorte von 1000 Patientinnen mit invasiven Mammakarzinomen einen Anteil von insgesamt 3,6% mit plattenepithelialen Foci (Fisher et al., 1975; Fisher et al., 1983). Im Magen wurde bisher nur über 4 Fälle von Plattenepithelkarzinomen berichtet (darunter 3 PeCa, 1 PeCa in situ) (Callery et al., 1985; Oono et al., 2010; Takita et al., 2005; Vaughan et al., 1977). Auch das adenosquamöse Magenkarzinom mit plattenepithelialer Differenzierung von definitionsgemäß $\geq 25\%$ gilt mit $< 0,5\%$ aller Magenkarzinome als Seltenheit (Chen et al., 2015). Pankreaskarzinome werden als adenosquamös eingestuft, wenn sie einen plattenepithelialen Anteil von mindestens 30% aufweisen (Hruban et al., 2007; Gill et al., 2019). Dieser Entität wird ein Anteil

von 0,38-10% der Pankreaskarzinome zugeschrieben, die meisten Studien sprechen allerdings von maximal 4% und die bisher größte Studie wies einen Anteil von nur 0,4% auf (Baylor & Berg, 1973; Borazanci et al., 2015; Kardon et al., 2001). Lediglich Voong et al. berücksichtigten in ihrer Studie an 3651 Präparaten sämtliche Anteile plattenepithelialer Differenzierung und identifizierten eine solche in 1,2% aller Fälle, innerhalb derer 31,6% einen Anteil von <30% hatten (Voong et al., 2010). Auch in Bezug auf das Kolon gibt es sehr seltene Fallberichte über plattenepitheliale Differenzierung in undifferenzierten oder Adenokarzinomen (Onishi et al., 1996; Santos et al., 1992). Tabelle 13 zeigt eine Darstellung der gut erforschten Häufigkeit von Plattenepitheldifferenzierung in Urothelkarzinomen.

Autor, Jahr	Organ	Subgruppe	Anzahl	Plattenepitheliale Differenzierung (%)	Plattenepitheliale & glanduläre Differenzierung (%)
Shapur et al., 2011	HB		760	2,9	/
Ehdaie et al., 2012	HB		2031	3,3	/
Shah et al., 2013	HB		589	5,4	/
Mitra et al., 2014	HB		2444	5,8	0,9
Lee et al., 2014	HB		355	5,9	/
C.E.Li et al., 2016	HB	nicht invasiv	158	6	/
Lee et al., 2014	oH		341	6,7	/
Tang et al., 2016	oH		687	7,7	1,2
Krasnow et al., 2017	HB	invasiv	303	7,9	0,7
Kastritis et al., 2006	HB,U,NB		446	9,5	/
Rink et al., 2012	oH		1648	9,9	/
Linder et al., 2013	HB		1211	10	/
Wasco et al., 2007	HB		448	10	/
Kim et al., 2010	oH	pTa-pT3N0M0	238	10,1	/
Moschini et al., 2017	HB		1067	10,2	/
Monn, Kaimakliotis, Pedrosa et al., 2015	HB		624	10,9	/
Xylinas et al., 2013	HB		1983	11,4	/
Sefik et al., 2018	HB	invasiv	146	11,6	/
Erdemir et al., 2007	HB		223	12,1	/
Soave et al., 2015	HB		485	12,6	/
Kim et al., 2012	HB		1013	13	1,3
Turker et al., 2012	HB		379	13	2
Perez-Montiel et al., 2006	NB	high-grade	108	13	/
Monn, Kaimakliotis, Cary et al., 2015	HB	invasiv	411	13,6	/
Lopez-Beltran et al., 1988	HB	papillär	145	13,8	2,8

Li et al., 2017	HB	pT1	1676	14	/
Gluck et al., 2014	HB	invasiv	348	14,9	/
Lopez-Beltran et al., 1988	HB	solide	45	15,6	/
Erdemir et al., 2008	HB		236	15,7	/
Makise et al., 2015	oH		140	16	/
Yang et al., 2002	HB	invasiv	310	16,8	/
Hsieh et al., 2015	HB, oH	unresektabel/ metastasierend	206	18	/
Langner et al., 2006	oH		268	18	/
Liu et al., 2017	HB		244	19,3	/
Minato et al., 2018	HB	invasiv	101	19,8	/
Jankovic Velickovic et al., 2011	oH		44	20	/
Vecchioli Scaldazza & Morosetti, 1992	HB		224	20,1	/
Lopez-Beltran et al., 2007	HB		115	21	/
Antunes et al., 2007	HB		113	22,1	/
Xu et al., 2017	HB	nicht invasiv	869	22,4	1,2
Jang et al., 2013	oH		56	23,2	/
Minato et al., 2017	HB	invasiv	38	23,7	/
Fung et al., 1991	HB	invasiv	39	28	/
Choi et al., 2014	HB	invasiv	73	32	/
Mazzucchelli et al., 1994	HB	invasiv	70	33	/
Lopez-Beltran et al., 2007	NB		30	43,3	/
Jozwicki et al., 2005	HB	invasiv	38	47	/
Jenkins et al., 1990	HB	invasiv	125	58	/
Martin et al., 1989	HB	invasiv	100	60	/

Tabelle 13: Plattenepithelialer Differenzierung in Urothelkarzinomen (Literatur). Sortiert nach ansteigender Häufigkeit. HB: Harnblase, oH: obere Harnwege, NB: Nierenbecken, U: Ureter. Berichte über gemischte Varianten nicht angegeben, wenn nicht spezifiziert, ob plattenepithelial beinhaltet war.

In Zusammenschau ist aus der Variabilität dieser Daten zu entnehmen, dass das Erkennen von fokaler plattenepithelialer Differenzierung unter den Bedingungen der Routinediagnostik nicht trivial ist. Möglicherweise ist die nicht komplett konsequente Registrierung des Befundes „fokale plattenepitheliale Differenzierung“ bedingt durch die unklare klinische Bedeutung dieses Befundes. Allerdings gibt es verschiedene Daten, die auf eine klinische Bedeutung einer fokalen Plattenepithelmetaplasie hindeuten. Metaplastische Mammakarzinome haben insgesamt eine schlechtere Prognose als die sehr aggressiven triple-negativen Mammakarzinome (TNBC) (Tray et al., 2019). Dabei scheint ein plattenepithelialer Anteil mit zwar niedrigerem Staging im Vergleich zu z.B. gemischt plattenepithelial/spindelzelligem einherzugehen, dafür aber mit häufiger Lymphknoten-Beteiligung (Leyrer et al., 2017; Rakha et al., 2015). Pai et al. berichten, dass metaplastische Mammakarzinome mit einem plattenepithelialen Anteil von >90% ein kürzeres krankheitsfreies Überleben zeigten als bei Anteilen

<40% und sprechen sich daher für eine Quantifizierung des Anteils im Rahmen der Prognosestellung aus (Pai et al., 2016). Adenosquamöse Karzinome des Pankreas werden im Vergleich zu den reinen Adenokarzinomen mit schlechterer Differenzierung, häufigeren Lymphknoten-Metastasen und perineuraler Invasion, insgesamt aggressiverem Verlauf und schlechterer Prognose assoziiert (Boyd et al., 2012; Madura et al., 1999; Voong et al., 2010). Aktuell liegt für diese Entität der Cutoff bei mind. 30% plattenepithelialem Anteil. Es wird jedoch von mehreren Autoren empfohlen, Karzinome mit jeglicher plattenepithelialer Beteiligung in diese Kategorie mit aufzunehmen da auch ein sehr geringer Anteil für ein aggressives Verhalten sprechen könnte (Kardon et al., 2001; Murakami et al., 2003). So fanden bspw. Voong et al. in ihrer Studie keinen Unterschied in Überlebensraten zwischen Patienten mit >30% oder <30% plattenepithelialem Anteil (Voong et al., 2010). Bei Urothelkarzinomen zeigten bspw. Ehdai et al., dass eine plattenepitheliale Differenzierung mit schlechterem Gesamt- und krankheitsspezifischem Überleben assoziiert ist (Ehdai et al., 2012). Makise et al. fand hingegen, wie viele andere Autoren, dass eine Assoziation mit Überlebensdaten in multivariaten Analysen nicht standhielt und spricht der plattenepithelialen Differenzierung aufgrund ihrer Assoziation mit hohem Staging und Grading, häufiger lymphovaskulärer Invasion und Lymphknoten-Metastasen zwar eine Rolle in der Progression der Erkrankung aber keine individuelle prognostische Rolle zu (Makise et al., 2015). Eine tabellarische Darstellung von Studien, welche die klinische Bedeutung einer fokalen plattenepithelialen Differenzierung in Urothelkarzinomen untersucht haben, ist in Tabelle 14 dargestellt.

Autor, Jahr	Anzahl n	Überleben p	Rekurrenz p	Staging p	Grading p	LVI p	LK+ p	Ansprechen Radiotherapie p	Ansprechen Chemotherapie p
Izard et al., 2015	3.387	OS / 0,268		hoch <0,001			/ 0,519		
Ehdai et al., 2012	2.031	CSS,OS invers <0,001							
Xylinas et al., 2013	1.984	CSS / 0,52		hoch <0,001		häufig <0,001	häufig 0,007		
Li et al., 2017	1.676	CSS invers <0,001	häufig 0,026		hoch 0,022	häufig <0,001			

Rink et al., 2012	1.648		häufig <0,05	hoch ≤0,005		häufig ≤0,005	häufig ≤0,005		
Kim et al., 2012	1.013	CSS /* 0,71	/* 0,14	hoch* <0,0001		/* 0,95	häufig* 0,05		
Xu et al., 2017	869	RFS invers* <0,001 PFS /* 0,813	häufig* 0,008	/* 0,909	hoch* <0,001				
Yu et al., 2019	770	CSS / 0,051	/ 0,074	hoch 0,022	hoch 0,001	häufig 0,024			
Lee et al., 2014	696	CSS invers* 0,025 OS /* 0,053		hoch* <0,001	hoch* <0,001	häufig* 0,034	/* 0,151		
Tang et al., 2016	687	CSS /* 0,076 RFS /* 0,126		hoch* <0,001	hoch* <0,001		häufig* 0,001		
Monn, Kaimaklitis, Pedrosa et al., 2015	624	OS / 0,213							
Frazier et al., 1993	531	CSS / >0,05							
Mitra et al., 2014	518	OS / 0,40 RFS / 0,79		hoch <0,001					
Kastritis et al., 2006	446	OS / 0,720							gleich 0,210
Li et al., 2018	426								schlecht 0,019
Yang et al., 2002	310	CSS / 0,06							
Krasnow et al., 2017	303	CSS/*0,7 OS/*0,6							
Scosyrev et al., 2011	295								besser* 0,09
Langner et al., 2006	268	MFS invers 0,001		hoch <0,001	hoch <0,001				
Liu et al., 2017	244			hoch 0,003			häufig 0,04		
Kim et al., 2010	238	RFS invers 0,019 CSS / 0,353				häufig 0,001			
Minato et al., 2022	224	MFS invers 0,027 OS invers 0,048							
Erdemir et al., 2007	223	invers* <0,027	häufig* 0,022	hoch* 0,001	hoch* 0,001				
Billis et al., 2001	165			hoch* <0,0001					

C. E. Li et al., 2016	158		oH häufig <0,001 HB / 0,1808						
Sefik et al., 2018	146	CSS / 0,743 OS / 0,626		hoch 0,040	hoch 0,020		/ 0,723		
Makise et al., 2015	140	CSS / 0,69 OS / 0,72 MFS / 0,99		hoch 0,021	hoch 0,014	häufig 0,022	häufig 0,0006		
Zargar-Shoshtari et al., 2016	126	OS /* 0,73		/* 0,81		/* 0,16	/* 0,74		gleich* 0,77 (n.a.)
Antunes et al., 2007	113	CSS invers 0,002	häufig 0,001	hoch 0,031					
Minato et al., 2018	101	OS invers 0,024 RFS / 0,064		hoch 0,020		häufig 0,048	häufig 0,044		
Martin et al., 1989	100							schlecht <0,005	
Jankovic Velickovic et al., 2011	44			hoch <0,05	hoch <0,05	häufig <0,005			
Minato et al., 2017	38	DFS, OS invers <0,001	häufig 0,009						schlecht 0,031 (n.a.)
Lopez-Beltran et al., 2007	145 (115 HB, 30 NB)	HB / 0,169 NB / 0,273	HB Ta/T1 häufig 0,021	HB hoch 0,005 NB / 0,106	HB hoch 0,05 NB / 0,439				

Tabelle 14: Klinische Bedeutung fokaler plattenepithelialer Differenzierung in Urothelkarzinomen (Literatur). Aufführung signifikanter, in multivariater Analyse bestehender Assoziationen im Vergleich zu reinen Urothelkarzinomen, sortiert nach absteigender Studiengröße. LVI: Lymphovaskuläre Invasion, CSS: Cancer Specific Survival, OS: Overall Survival, DFS: Disease Free Survival, MFS: Metastasis Free Survival, PFS: Progress Free Survival, RFS: Recurrence Free Survival, /: keine signifikante Assoziation, *: plattenepitheliale und glanduläre Anteile, HB: Harnblase, NB: Nierenbecken, oH: obere Harnwege, n.a.: neoadjuvant. Genaue Organe und eingrenzende pathologische Parameter wurden im Interesse der Übersichtlichkeit nicht angeführt.

Möglicherweise wäre eine zuverlässigere (z.B. durch den Einsatz einer immunhistochemischen Zusatzuntersuchung) Identifizierung einer Plattenepitheldifferenzierung die Voraussetzung, um klare Studienergebnisse zur klinischen Relevanz dieses Befundes zu erzielen. Da CK13 sowohl Plattenepithelmetaplasien wie auch Urothel färbt, kommt die CK13 Immunhistochemie hierfür nicht in Frage. Auch beim Warthin-Tumor der Speicheldrüsen, einem weiteren Tumor in den top 19 unserer CK13-Rangliste, sind

platteneitheliale Metaplasien und auch platteneitheliale Karzinome bekannt (Damjanov et al., 1983; Kim & Kim, 2019). Eine de novo CK13 Expression in einem malignen Tumor ist nicht immer mit einer platteneithelialen Tumormorphologie assoziiert. Dies ist tumorbiologisch nicht überraschend, denn es ist gut bekannt, dass im Rahmen der mit der Tumorprogression einhergehenden zellulären Entdifferenzierung es zu einer zunehmenden Deregulierung der Expression von zahlreichen Genen kommt, welche im Vergleich zu der Ausgangszelle entweder vermindert oder vermehrt exprimiert werden können (Bishop & Weinberg, 1996). Die aberrante Expression vieler dieser Gene ist tumorbiologisch funktionell nicht relevant (Greenman et al., 2007; Stratton, 2011; Wood et al., 2007). Dies dürfte auch für CK13 zutreffen, denn für dieses Intermediärfilamentprotein sind keine signifikanten tumorsuppressiven oder onkogenen Funktionen bekannt. Gerade angesichts fehlender onkogener Eigenschaften des CK13 Proteins ist davon auszugehen, dass eine de novo Expression von CK13 in Tumoren, welche nicht von Urothel oder Platteneithel ausgehen und nicht mit einer fokalen platteneithelialen Differenzierung assoziiert sind, eher einen biologisch irrelevanten „Bystander-Effekt“ darstellen. Der Bystander-Effekt beschreibt Reaktionen benachbarter (Nichtziel-) Zellen auf von stressexponierten Zielzellen freigesetzte Faktoren. Stress löst sowohl in den direkt betroffenen als auch in umstehenden Zellen aufgrund der Vielfalt an Mechanismen eine komplexe biologische Reaktion aus. Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung von unter anderem RNA, Proteinfaktoren und DNA-Molekülen und somit Signalwegen, die zu Veränderungen in der Genexpression führen können (Verma & Tiku, 2017).

Die statistisch signifikante Assoziation zwischen einer verminderten CK13 Expression und einem hohen Malignitätsgrad beziehungsweise einer ungünstigen Prognose in unseren 176 Zervixplatteneithelkarzinom-Patientinnen und die signifikante statistische Beziehung zwischen einem CK13 Expressionsverlust und einem hohen Malignitätsgrad in einer Zusammenstellung von 1.151 Platteneithelkarzinomen von 11 verschiedenen Ursprungsorganen passt gut zu Daten einer Reihe früherer Studien, welche bereits über einen Zusammenhang zwischen CK13 Verlust und ungünstigem Tumorverlauf bei Platteneithelkarzinomen berichtet hatten. Tabelle 15 zeigt eine Zusammenstellung von Studien, welche die Beziehung zwischen der CK13 Expression und

Patientenprognose oder histopathologischen Malignitätsparametern beim Plattenepithelkarzinom untersucht hatten, zusammen mit Angaben über identifizierte statistisch signifikante Zusammenhänge.

Erstautor, Jahr	Entität	Anzahl	Überleben	Metastasen	Rezidive	Progression maligner Transformation/Entdifferenzierung
Yagyu et al., 2015	Mundhöhle PeCa	94	keine (EFS)		keine	keine
Hartanto et al., 2015	Mundhöhle PeCa	41		keine		
Kitamura et al., 2012	Mundhöhle PeCa	213				invers
Sakamoto et al., 2011	Mundhöhle PeCa	143				invers
Wils et al., 2020	Mundhöhle Dysplasie	84				invers
Schaaij-Visser et al., 2010	Mundhöhle Leukoplakie	48				keine
Depondt et al., 1999	Mundhöhle & Pharynx PeCa	26		invers	invers	
Safadi et al., 2019	Mundhöhle & Pharynx PeCa	100				invers
Yanagawa et al., 2007	Zunge PeCa	121			invers	
Pandey et al., 2021	Zunge PeCa	146	positiv*		keine	invers
Xu et al., 2018	Kopf & Hals PeCa	106				invers
He et al., 2015	Ösophagus PeCa	106				invers
van Bommel et al., 1994	Zervix PeCa	80	positiv**	keine	keine	invers
Carrilho et al., 2004	Zervix PeCa	54				invers
Nair et al., 1997b	Zervix PeCa	106				invers
Kruse et al., 2004	Zervix CIN	90				invers
Southern et al., 2001	Zervix CIN	59				invers***
Cohen et al., 1997	Lunge NSCLC	66	keine			
Kim et al., 2004	Magen Adenokarzinom	329				invers
Reedy et al., 1990	Harnblase Urothelkarzinom	7		positiv		
Schaafsma et al., 1990	Harntrakt Urothelkarzinom	59				invers

Tabelle 15: **Prognostik** (Literatur). Beziehung zwischen CK13-Expression und Patientenprognose. EFS: Event Free Survival, *in Kombination mit Involucrin, ** in Gruppe mit LK-Metastasen, *** in high-grade Läsionen.

Bei einem Teil der Studien mit inkonklusiven Daten dürfte eine eher geringe Zahl der untersuchten Patienten eine Teilursache für das Fehlen eindeutiger Zusammenhänge dargestellt haben. Einige, insbesondere größere Studien hatten aber signifikante Assoziationen gezeigt. So fanden Pandey et al. in einer Untersuchung der CK13 und Involucrin (IVL) Expression von 146 PeCa der Zunge, dass ein Verlust der beiden mit schlechter Differenzierung und einem reduzierten 5-Jahres Gesamtüberleben assoziiert ist und empfehlen die Kombination als

prognostischen Biomarker (Pandey et al., 2021). Auch Kitamura et al. zeigten in 213 Fällen oraler Leukoplakien und PeCa eine Abnahme der CK13 Expression mit Voranschreiten der Entdifferenzierung und schlugen eine Kombination von CK13-/CK17+ als Marker für maligne Transformation vor (Kitamura et al., 2012). Van Bommel et al. zeigten an 80 PeCa der Zervix lediglich in der Gruppe mit Lymphknoten-Metastasen eine geringere Rezidivrate und besseres Gesamtüberleben bei CK13 Positivität. Dazu war die CK13 Expression höher in besser differenzierten als in wenig differenzierten Karzinomen (van Bommel et al., 1994). Auch für Urothelkarzinome der Harnblase konnten Schaafsma et al. an 59 Proben zeigen, dass die Expression von CK13 mit steigendem Grading abnahm und in infiltrierenden Karzinomen komplett verloren ging (Schaafsma et al., 1990). Insgesamt war eine reduzierte CK13 Expression bei Plattenepithelkarzinomen von 4 verschiedenen Ursprungsorganen, nämlich Mundhöhle (incl. Zunge), Pharynx, Zervix sowie Kopf und Hals Tumoren mit ungünstiger Prognose und bei Plattenepithelkarzinomen von 5 verschiedenen Ursprungsorganen mit ungünstigem histologischem Phänotyp assoziiert. Da für das Protein CK13 keine tumorsuppressiven Eigenschaften bekannt sind, ist am ehesten davon auszugehen, dass auch der Verlust der CK13 Expression keine spezifische tumorbiologische Rolle spielt, sondern eher eine „Bystander-Läsion“ darstellt welche im Rahmen der Tumordifferenzierung entstanden ist. Der Verlust von Proteinen im Rahmen der Tumorentdifferenzierung betrifft meistens primär Proteine, welche für Tumorzellen nicht essenziell sind, beziehungsweise nicht unbedingt benötigt werden. Ein Verlust von CK13 scheint bei einigen Tumoren schon früh in der Tumorentwicklung aufzutreten, denn ein CK13 Verlust wurde bei Plattenepithelien verschiedener Organe auch in dysplastischen beziehungsweise präkanzerösen Läsionen gefunden, bevor es zur Entstehung eines invasiven Karzinoms kam (Kitamura et al., 2012; Carrilho et al., 2004; Ueno et al., 2003). Die Befunde zur Untersuchung von CK13 in Dysplasien und Karzinomata in situ sind in Tabelle 16 dargestellt. Es wurde auch vorgeschlagen, dass die CK13 Immunhistochemie ein Hilfsmittel zur objektiveren Diagnose einer Dysplasie von Plattenepithel darstellen könnte (Abé et al., 2017; Bloor et al., 2001; Garcia et al., 2016; Ikeda et al., 2020; Yagyuu et al., 2015). Eine Kombination mit den Markern Ki-67 und CK19 oder CK17 könnte in der Unterscheidung zwischen oralen plattenepithelialen Dysplasien und CIS zusätzlich helfen (Kobayashi et al., 2010; Mikami et al., 2011).

Organ	Erstautor, Jahr	Milde Dysplasie/ CIN I	Moderate Dysplasie/ CIN II	Schwere Dysplasie/ CIN III	Karzinoma in situ	Invasives Karzinom
Mundhöhle	Noguchi et al., 2011		V(n=8)			SV(n=8)
	Hasegawa et al., 2017		11%(n=9)			0%(n=19)
	Kobayashi et al., 2010	100%(n=57)	89%(n=36)		16%(n=75)	11,5%(n=26)
	Mikami et al., 2011	100%(n=71)	100%(n=102)		6,5%(n=152)	4%(n=82)
	Bloor et al., 2001	100%(n=9)	100%(n=7)	0%(n=7)		52,2%(n=23)
	Nobusawa et al., 2014	100%(n=43)	51%(n=63)		28%(n=40)	
	Farrukh et al., 2015				fokal in 56,2%(n=16)*	fokal in 59,5%(n=37)
	Ikeda et al., 2020	~77%(n=30)		~85%(n=46)	40%(n=53)	
	Noguchi et al., 2017				100%(n=1)	
	Wils et al., 2021		47%(n=53)			
	Ohkura et al., 2005	LV(n=1)	LV(n=5)	SV(n=4)		SV(n=21)
	Kitamura et al., 2012	30%(n=20)	50%(n=8)	16,7%(n=6)		3%(n=105)
	Ibrahim, Warnakulasuriya et al., 1998		100%(n=40)			
Lippe (aktinische Cheilitis)	Garcia et al., 2016		100%(n=33)			95%(n=20)
	dos Santos et al., 2003	62,5%(n=8)	83%(n=18)	75%(n=8)		
Zervix	Raspolini et al., 2007				100% (n=428)	
	Carrilho et al., 2004			22,2%(n=9)		SCC: 25%(n=40)
	Smedts et al., 1994	75-100% (n=16)	75-100% (n=25)	50-75% (n=26)		SCC: 50-75%(n=23) divers**: 0%(n=16)
	Nair et al., 1997	97%(n=72)		76%(n=93)		SCC: 69,8% (n=106) AdenoCa: 33% (n=42)
	Malecha & Miettinen, 1992		28,6%(n=7)	58,3%(n=12)		
	Southern et al., 2001	100%(n=49)		76%(n=10)		
	Litvinov et al., 1996		75-100% (n=39)			
Larynx	Malecha & Miettinen, 1991		60%(n=10)***			60%(n=20)
	Ueno et al., 2003		100%(n=3)			81,8%(n=11)
Ösophagus	Takashima et al., 2012	69%(n=64)			48%(n=66)*	
Sinus piriformis	Murakami & Saito, 1990	100%(n=2)	100%(n=3)	40%(n=5)		fokal in 85,7%(n=7)
Vulva	Dasgupta et al., 2018	85% (n=54)****				

Tabelle 16: **Studien.** Ergebnisse aus Untersuchungen zur Positivitätsrate von CK13 in Dysplasien, Karzinomata in situ und invasiven Karzinomen. Falls keine Angabe über Grad der Dysplasie: Zuteilung in moderate Dysplasie. V: Verlust, LV: Leichter Verlust, SV: Schwerer Verlust
*Kategorieangabe: schwere Dysplasie/CIS, **AdenoCa, Adenosquamöses Ca, Neuroendokrines Ca, ***larynx, epiglottis, pyriform sinus, ****differentiated vulvar intraepithelial neoplasia

Bei der Besprechung der Rolle von Überexpression und verminderter Expression von CK13 in der Entstehung und Progression von Neoplasien muss der besondere Status der Haut berücksichtigt werden. Die Haut ist das einzige von Plattenepithel bedeckte Organ, dessen Plattenepithel normalerweise CK13 negativ ist. Hierzu passt, dass die Plattenepithelkarzinome der Haut das Plattenepithelkarzinom mit der geringsten Positivitätsrate für CK13 darstellen (39,1% in unserer Studie). Allerdings muss für die Haut davon ausgegangen werden, dass hier kein CK13 Expressionsverlust in einem Teil der Fälle, sondern im reziproken Teil der Fälle ein Zugewinn von CK13 vorliegt. Es wäre also damit zu rechnen, dass im Plattenepithel der Haut der Nachweis von CK13 für eine Dysplasie sprechen würde und in invasiven Plattenepithelkarzinomen der Haut für eine ungünstigere Prognose oder ein ungünstigeres Tumorstadium. Die wenigen Studien, die es zu diesem Thema gibt, haben folgendes gezeigt: Nischt et al. wiesen 1988 erstmals eine CK13-Expression, bzw. einen CK1/CK13-Switch von epidermaler zu mucosaler Differenzierung in differenzierten suprabasalen Bereichen epidermaler Plattenepithelkarzinome von Mäusen nach, was von anderen Untersuchern bestätigt wurde (Mitsunaga et al., 1995; Nischt et al., 1988; Rundhaug et al., 1997; Tong et al., 1998). Dies konnte in frühen Untersuchungen an kleinen Patientenkollektiven ($n \leq 8$) für humane epidermale Plattenepithelkarzinome zunächst nicht bestätigt werden (Kuruc et al., 1989; Moll, Franke, et al., 1982; Suo et al., 1993). Hudson et al. berichteten später in einer größeren Studie ($n=71$) hingegen von einer de novo CK13-Expression in Plattenepithelkarzinomen der Haut sowie von einer hochregulierten Genexpression. Sie fanden eine Expression in 58% der gut, 43% der mäßig und 0% der schlecht differenzierten Plattenepithelkarzinome und lieferten damit Hinweise auf eine reziproke Korrelation zu dem Tumorgrad (Hudson et al., 2010). In unserer Studie war die Zahl der untersuchten Plattenepithelkarzinome der Haut ($n=87$) zu gering, um Beziehungen zu Grad und Stadium zu evaluieren. Die große Zahl der in unserer Studie untersuchten urothelialen Neoplasien erlaubte bei Urothelkarzinomen der Harnblase ($n=980$) eine umfassende Evaluation der Beziehung zwischen CK13 Immunfärbung und dem Tumorphänotyp. Die hierbei aufgefundene statistisch signifikante Assoziation zwischen einem Verlust von CK13 in Tumorzellen und einem hohen Malignitätsgrad beziehungsweise einem invasiven Tumorwachstum von urothelialen Neoplasien entspricht im Wesentlichen den Befunden der meisten

anderen Arbeitsgruppen bei Plattenepithelkarzinomen. In unserer Studie fand sich eine CK13 Positivität in 75,6% der nicht invasiven und 52,1% der muskelinvasiven Urothelkarzinome. Frühere Studien hatten eine CK13 Positivität von 0%-67% von muskelinvasiven Urothelkarzinomen berichtet (Schaafsma et al., 1990; Worst et al., 2014). Eine weitere Studie zeigte für muskelinvasive Karzinome eine Positivität von 88,9% bis 100% (Riedel et al., 2001). Berichte über die CK13 Positivität in nicht-invasiven Tumoren waren meist nur eingeschränkt vergleichbar mit unseren Daten. Schaafsma et al. fanden eine CK13-Positivität in 100% der immunhistochemisch untersuchten nicht-invasiven pTa Tumoren, Celis et al. konnten dies mittels Gelelektrophorese bestätigen (Celis et al., 1996; Schaafsma et al., 1990). Worst et al. fanden in einer Kohorte, die neben den nicht-invasiven pTa Tumoren auch die in unserer Studie nicht enthaltenen pTis und pT1 Tumoren umfasste, eine CK13-Positivität von 46,9% (Worst et al., 2014). Rubenwolf et al. hatten an Harnblasenbiopsien über eine verminderte CK13 Expression im Urothel von Patienten mit vorangegangener Blasenextrophie berichtet (Rubenwolf et al., 2021). Die Blasenextrophie gilt als fakultative Präkanzerose für die Entstehung von urothelialen Neoplasien. Die Befunde von Rubenwolf et al. könnten somit darauf hindeuten, dass auch im Falle von urothelialen Neoplasien der Verlust von CK13 auf eine Dysplasie hindeuten könnte. Studien an ausreichend großen Patientenkollektiven zur Klärung der Frage, ob dies von möglicher klinischer Bedeutung sein könnte, fehlen allerdings bisher.

Unsere Studie stellt mit 9.156 erfolgreich untersuchten Tumoren die mit Abstand größte Studie zur CK13 Immunhistochemie an humanen Tumoren dar. Eine PubMed® Suche mit den Kriterien Cytokeratin13/CK13/Keratin13/K13/KRT13, immunohisto*, cancer/carcinoma/tumor hatte für den Zeitraum bis zum 26.06.2022 65 Studien ergeben, welche immunhistochemisch die Expression von CK13 bei Tumoren untersucht hatten. Die Ergebnisse der 53 anhand ihrer Entitäten vergleichbaren Studien an insgesamt 2.880 Tumoren (31,5% der in unserer Studie untersuchten Tumoren) im Vergleich zu unseren eigenen Daten ist in Abb. 43 dargestellt.

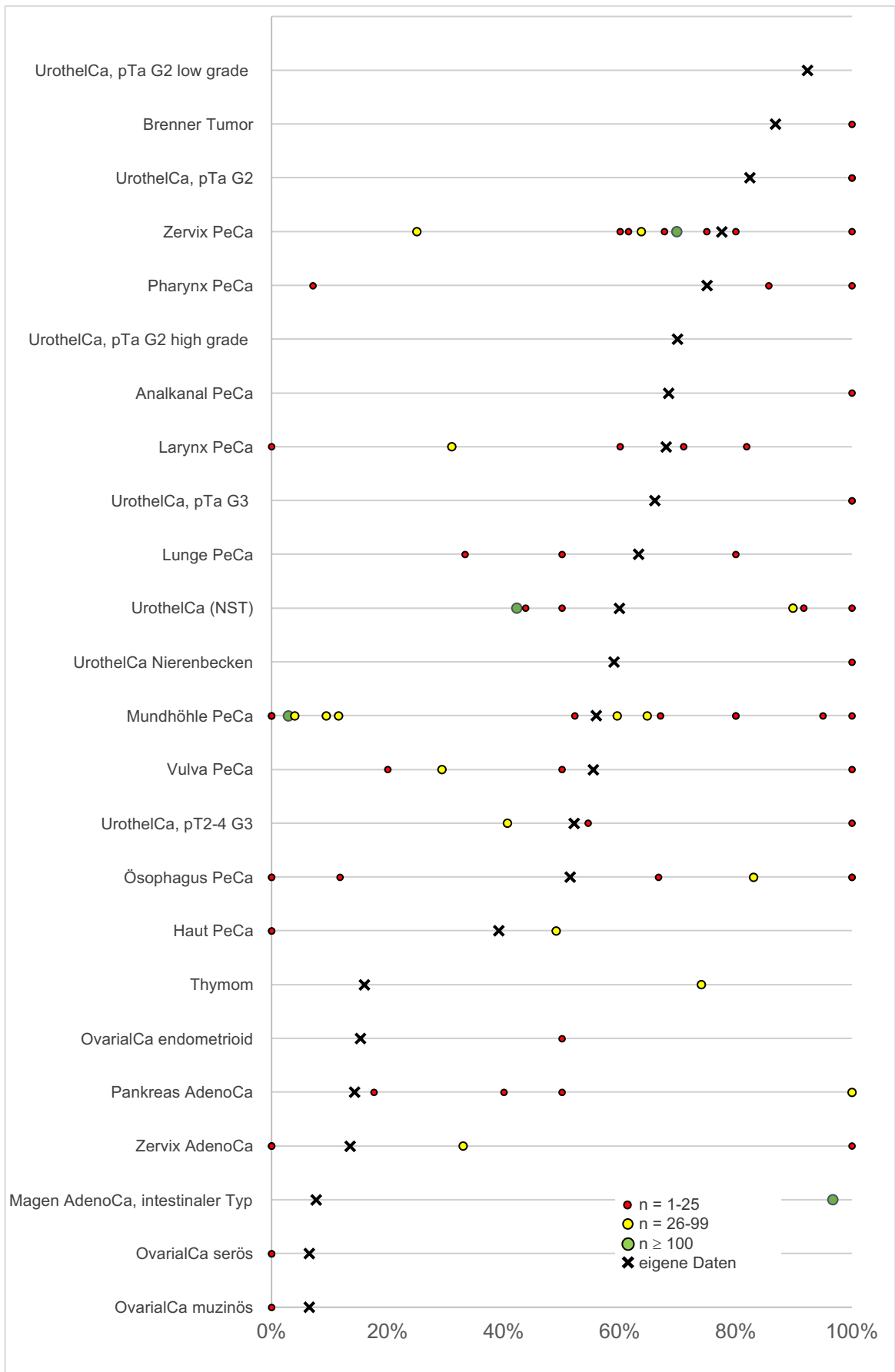


Abb. 43: **Studienergebnisse.** Ergebnisse vorhandener Studien im Vergleich zu eigenen Daten. Vergleichbare Daten mit der Unterscheidung UrothelCa, pTa G2 low vs. high grade waren nicht vorhanden, weshalb die Kategorie UrothelCa, pTa G2 verglichen wurde.

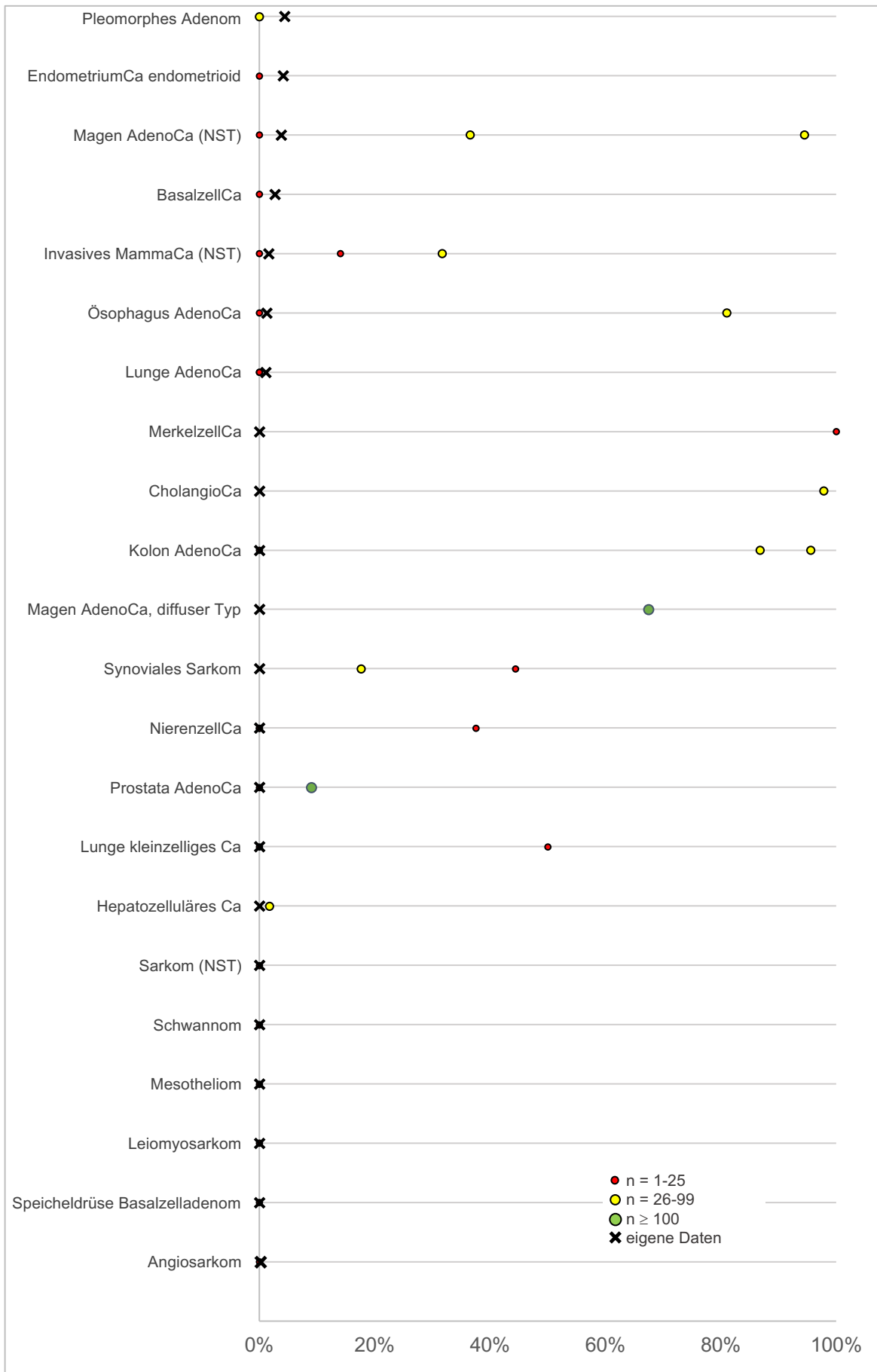


Abb. 43 Fortsetzung: **Studienergebnisse.** Ergebnisse vorhandener Studien im Vergleich zu eigenen Daten.

Literaturverweise zu den Daten aus Abb. 43:

- Analkanal Plattenepithelkarzinom: (Lee et al., 2003)
- Angiosarkom: (Agaimy et al., 2012)
- Basalzellkarzinom: (Schirren et al., 1997)
- Brenner Tumor: (Riedel et al., 2001)
- Cholangiokarzinom: (Lee et al., 2003)
- Endometriumkarzinom endometrioid: (Malecha & Miettinen, 1991)
- Haut Plattenepithelkarzinom: (Hudson et al., 2010; Suo et al., 1993; van Dorst et al., 1998)
- Hepatozelluläres Karzinom: (Lee et al., 2003)
- Invasives Mammakarzinom (NST): (Malecha & Miettinen, 1991; van Dorst et al., 1998; Yin et al., 2022)
- Kolon Adenokarzinom: (Lee et al., 2003; Madoz-Gúrpide et al., 2007; van Dorst et al., 1998)
- Larynx Plattenepithelkarzinom: (Malecha & Miettinen, 1991; Suo et al., 1993; Ueno et al., 2003; van der Velden et al., 1997; van Dorst et al., 1998)
- Leimyosarkom: (Miettinen, 1991)
- Lunge Adenokarzinom: (Malecha & Miettinen, 1991; van Dorst et al., 1998)
- Lunge kleinzelliges Karzinom: (Malecha & Miettinen, 1991; Sarbia et al., 1997)
- Lunge Plattenepithelkarzinom: (Fukai et al., 1995; Suo et al., 1993; van Dorst et al., 1998)
- Magen Adenokarzinom, diffuser Typ: (Kim et al., 2004)
- Magen Adenokarzinom, intestinaler Typ: (Kim et al., 2004)
- Magen Adenokarzinom (NST): (Lee et al., 2003; Tanière et al., 2001; van Dorst et al., 1998)
- Merkelzellkarzinom: (Inoue et al., 1997)
- Mesotheliom: (Malecha & Miettinen, 1991)
- Mundhöhle PeCa: (Adami et al., 2017; Al-Eryani et al., 2016; Bloor et al., 2001; Farrukh et al., 2015; Garcia et al., 2016; Hasegawa et al., 2017; Ibrahim, Bertelsen, et al., 1998; Kobayashi et al., 2010; Malecha & Miettinen, 1991; Mikami et al., 2011; Romañach et al., 2010; Suo et al., 1993; Ueno et al., 2003; van Dorst et al., 1998)
- Nierenzellkarzinom: (Leuschner et al., 1991; Malecha & Miettinen, 1991; van Dorst et al., 1998)
- Ösophagus Adenokarzinom: (Tanière et al., 2001; van Dorst et al., 1998)
- Ösophagus Plattenepithelkarzinom: (Glickman et al., 2001; Lam et al., 1995; Lu et al., 2010; Malecha & Miettinen, 1991; Sarbia et al., 1997; Suo et al., 1993; van Dorst et al., 1998)
- Ovariakarzinom endometrioid: (Riedel et al., 2001)
- Ovariakarzinom muzinös: (Riedel et al., 2001)
- Ovariakarzinom serös: (Malecha & Miettinen, 1991; Riedel et al., 2001)
- Pankreas Adenokarzinom: (Lee et al., 2003; Malecha & Miettinen, 1991; Schüssler et al., 1992; van Dorst et al., 1998)
- Pharynx Plattenepithelkarzinom: (Klijanienko et al., 1989; Murakami & Saito, 1990; Ueno et al., 2003)
- Pleomorphes Adenom: (de Araújo et al., 2000)
- Prostata Adenokarzinom: (Liu et al., 2016; Malecha & Miettinen, 1991)

Literaturverweise zu den Daten aus Abb. 43:

Sarkom (NOS): (Miettinen, 1991)

Schwannom: (Miettinen, 1991)

Speicheldrüse Basalzelladenom: (de Araújo et al., 2000)

Synoviales Sarkom: (Lopes et al., 1994; Miettinen, 1991; Miettinen et al., 2000)

Thymom: (Fukai et al., 1993)

Urothelkarzinom (NST): (Malecha & Miettinen, 1991; Reedy et al., 1990; Riedel et al., 2001; Schaafsma et al., 1990; Schaafsma et al., 1991; Worst et al., 2014)

Urothelkarzinom Nierenbecken: (Schaafsma et al., 1990)

Urothelkarzinom, pTa G2 & pTa G3: (Reedy et al., 1990; Schaafsma et al., 1990)

Urothelkarzinom, pT2-4 G3: (Reedy et al., 1990; Schaafsma et al., 1990; Worst et al., 2014)

Vulva Plattenepithelkarzinom: (Ansink et al., 1995; Malecha & Miettinen, 1991; Suo et al., 1993; van Dorst et al., 1998)

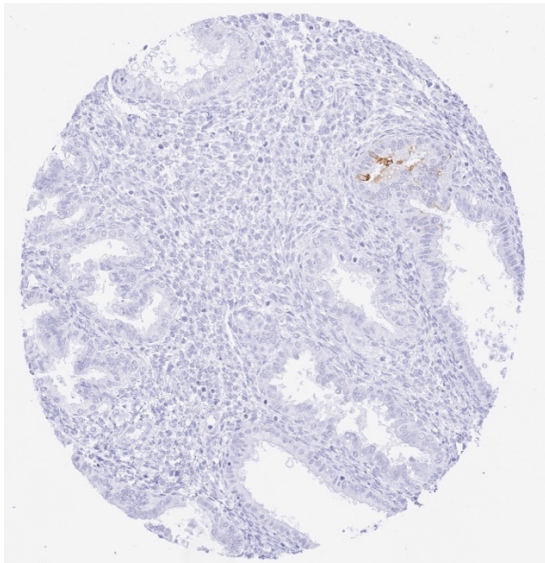
Zervix Adenokarzinom: (Ivanyi et al., 1990; Lang & Dallenbach-Hellweg, 1990; Nair et al., 1997; Smedts et al., 1994; van Dorst et al., 1998)

Zervix Plattenepithelkarzinom: (Carrilho et al., 2004; Fay et al., 2009; Ivanyi et al., 1990; Malecha & Miettinen, 1991; Nair et al., 1997; Smedts et al., 1994; Suo et al., 1993; van Bommel et al., 1994; van Dorst et al., 1998)

Die teilweise deutlich diskrepanten Befunde früherer Untersucher unterstreichen die Bedeutung von umfassenden Studien von Tumormarkern an einer breiten Palette von verschiedenen Tumoren. Hervorzuheben ist, dass unsere Untersuchung nicht nur die relative Häufigkeit der CK13 Expression in Tumoren wiedergibt (Rangliste) sondern dass sich auch eine signifikante Zahl von Tumoren fand, welche früher in Publikationen als häufig CK13 positiv beschrieben wurden, in unserer Analyse aber immer CK13 negativ waren. Dieser Teilaspekt unserer Daten ist von großer Bedeutung, um das diagnostische Potenzial der CK13 Immunhistochemie optimal einordnen zu können. Die hohe Zahl der untersuchten Tumoren wurde möglich durch die Anwendung der Tissue-Microarray Technik und die über viele Jahre am UKE aufgebaute Geweberessource. Die TMA Methode ist optimal dafür geeignet Tumorkollektive wie beispielsweise Tumoren unterschiedlicher Herkunft, unterschiedlichen Stadiums oder unterschiedlicher Prognose miteinander zu vergleichen (Shergill et al., 2004). Für derartige, vergleichende Untersuchungen ist die TMA Methode wahrscheinlich besser geeignet als die früher klassischerweise verwendeten Großschnitte von Paraffinblöcken. Die zwei wesentlichsten Nachteile von Großschnittuntersuchungen sind die praktische Unmöglichkeit die Schnittlagerungszeit (Zeitspanne von der Anfertigung eines Schnittes bis zu seiner immunhistochemischen Anfärbung) für ein großes Projekt an 20.000 Tumoren zu standardisieren und die ungleiche Größe der an Großschnitten verwendeten Gewebe. Einzelne Großschnitte enthalten typischerweise nur kleine Tumorareale, während andere eine Tumorfläche von bis zu 3x1,5cm aufweisen. Naturgemäß treten Artefakte oder biologisch irrelevante fokale Befunde in den größeren Tumorarealen eher zu Tage als in Präparaten mit nur kleinen Tumoranteilen (Taqi et al., 2018; Voduc et al., 2008). Die einzige Studie welche bisher die prognostische Bedeutung von molekularen Parametern an Großschnitten und TMAs von identischen Blöcken an einem Kollektiv von mehr als 500 Tumoren untersucht hat fand beim Mammakarzinom eine Überlegenheit der TMA Methode (Torhorst et al., 2001). Obwohl an Großschnitten 40% der Fälle p53 positiv waren und an vier verschiedenen TMAs nur jeweils ca. 20%, erwiesen sich die p53 Befunde aller vier TMAs als hochgradig statistisch signifikant ($p < 0,0001$), während die größere Zahl von p53 positiven Befunden an Großschnitten nicht mit der Prognose assoziiert war. Angesichts der Größe unserer Studie war es ein zentrales Anliegen, die verwendeten Reagenzien und Antikörper optimal zu validieren. Zu diesem Zweck

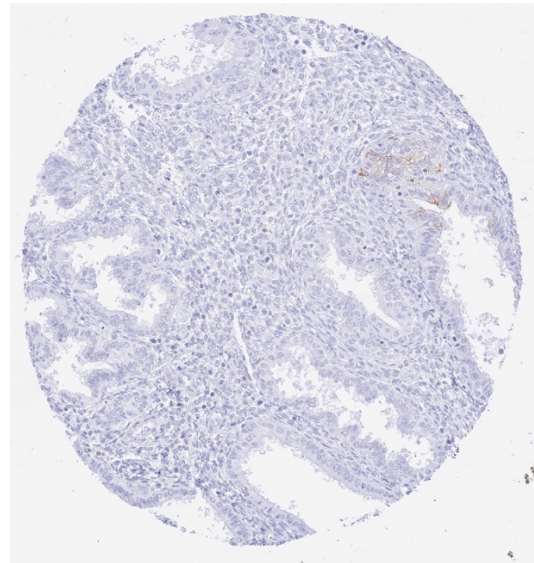
wurden die mit dem Antikörper MSVA-613M erzielten Färbeergebnisse mit Färbedaten eines zweiten unabhängigen anti-CK13 Antikörpers (EP69, BioSB) verglichen und auch mit RNA-Daten von drei verschiedenen öffentlich zugänglichen Datenbanken (Human Protein Atlas (HPA), Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project, FANTOM5 Project). Um sicherzustellen, dass hierbei eine möglichst breite Palette von unterschiedlichen Proteinen auf mögliche Kreuzreaktivitäten getestet wurde, wurden 76 verschiedene Normalgewebe mit beiden Antikörpern inkubiert. Die Untersuchung von praktisch allen adulten Geweben eines Menschen dürfte am ehesten sicherstellen, dass den Antikörpern alle in relevanter Menge exprimierten Proteine für eine Bindung „angeboten“ wurden, sodass aus dem Fehlen einer Färbung ein weitgehendes Fehlen von Kreuzreaktionen eines Antikörpers gefolgert werden kann. Für die Validität unseres Assays spricht der Nachweis einer signifikanten CK13 Immunfärbung in allen Organen mit dokumentierter CK13 RNA Expression von Ösophagus, Speicheldrüse, Harnblase, Vagina, Zervix und Tonsille, wovon die meisten von Plattenepithel oder Urothel bedeckt sind. Immunhistochemisch mittels MSVA-613M zusätzlich nachweisbare einzelne CK13 positive Zellen oder Gruppen von Zellen im Endometrium, Basalzellen der Prostata, Samenblase oder im respiratorischen Epithel, wo eine CK13 RNA Expression nicht beschrieben worden war, wurden durch identische Färbungen mit dem zweiten unabhängigen Antikörper EP69 (BioSB) bestätigt (Abb. 44). In diesen Organen machen die CK13 positiven Zellen nur einen kleinen Anteil der Gesamtzellzahl aus, sodass die von diesen Zellen gebildeten CK13 RNAs in der Gesamt-RNA eines gesamten Organs untergehen und nicht detektiert werden.

MSVA-613M

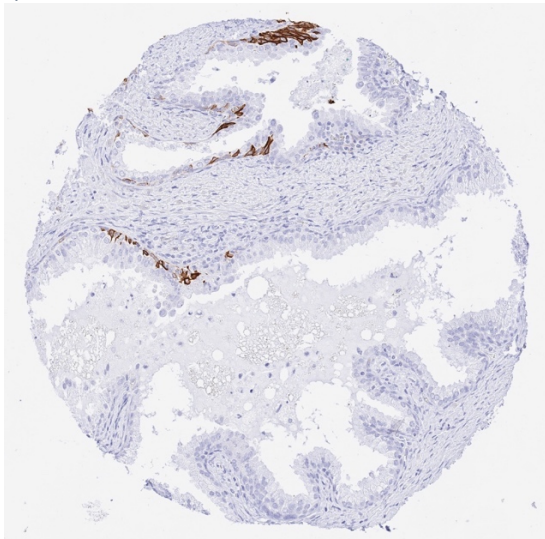


a)

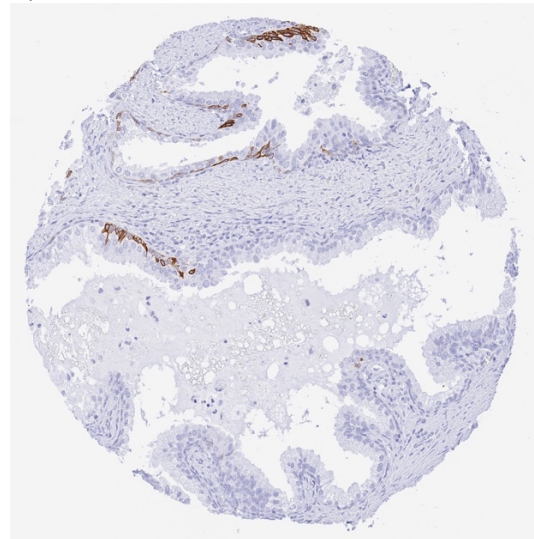
BioSB-EP69



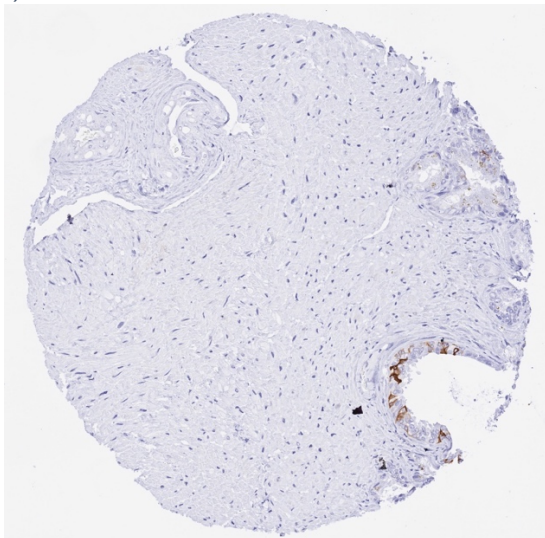
b)



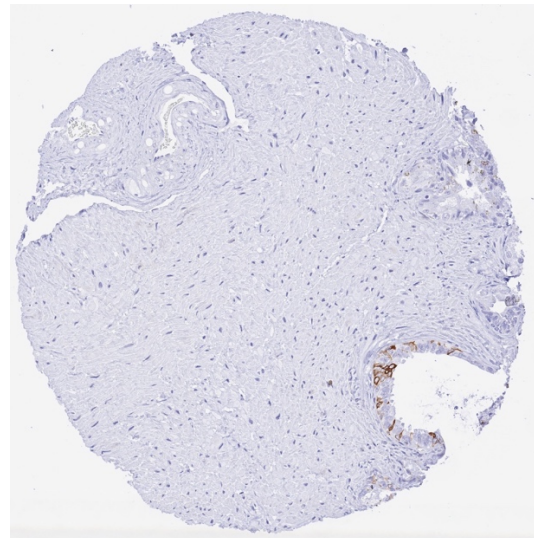
c)



d)



e)



f)

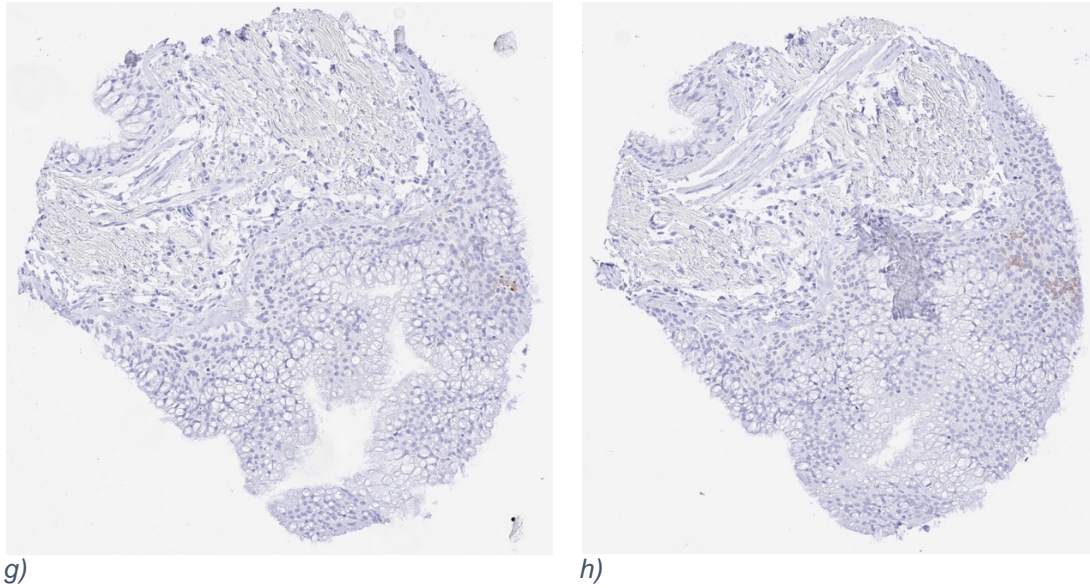


Abb. 44: **Färbeergebnisse.** Antikörper MSVA-613M vs. BioSB-EP 69
a&b) Endometrium, Sekretionsphase c&d) Prostata e&f) Samenblase g&h) Bronchus

Zusammengefasst erlauben die Daten unserer Studie einen umfassenden Überblick über die CK13 Expression in normalen und neoplastischen humanen Geweben. Die CK13 Expression dominiert in urothelialen Neoplasien und in Plattenepithelkarzinomen verschiedener Organe. In diesen beiden Tumorgruppen korreliert ein progredienter CK13 Expressionsverlust mit aggressiver Erkrankung und ungünstiger Prognose. Die Klärung der praktischen klinischen Bedeutung der CK13 Immunhistochemie als Marker für Dysplasie und Prognose in urothelialen und plattenepithelialen Neoplasien erfordert die Durchführung weiterer Studien.

5. Zusammenfassung

Cytokeratin 13 (CK13) ist ein saures Typ I Cytokeratin mit hohem Molekulargewicht, welches überwiegend in Urothel und Plattenepithel unterschiedlicher Ursprungsgewebe exprimiert wird. Ein Verlust von CK13 wurde bereits mit der Entstehung und Progression von Plattenepithelneoplasien in Zusammenhang gebracht. Für eine umfassende Bestimmung der CK13 Expression in normalen und neoplastischen Geweben wurde ein Tissue-Microarray mit 10.439 Proben von 131 verschiedenen Tumorentitäten und Subentitäten sowie 608 Proben von 76 verschiedenen Normalgewebstypen immunhistochemisch untersucht. Eine CK13 Färbung zeigte sich in 42 (32,1%) der 131 Tumorkategorien, und 24 (18,3%) der Tumorkategorien beinhalteten zumindestens einen Fall mit einer starken CK13 Positivität. Die höchsten Positivitätsraten fanden sich für CK13 in verschiedenen Kategorien von urothelialen Neoplasien (52,1-92,3%) einschließlich von Brenner Tumoren des Ovars (86,8%) und in Plattenepithelkarzinomen von verschiedenen Ursprungsorten (39,1-77,6%), Warthin-Tumoren der Speicheldrüsen (66,7%), adenosquamösen Karzinomen der Zervix uteri (33,3%), Thymomen (16%) und in endometrioiden Karzinomen des Ovars (15,3%). 20 andere epitheliale oder Keimzellneoplasien zeigten eine – meistens schwache – CK13 Positivität in weniger als 15% der Fälle. In Harnblasenkarzinomen wurde eine verminderte CK13 Expression mit höherem Malignitätsgrad und fortgeschrittenem pT Stadium in Verbindung gebracht (jeweils $p < 0,0001$). Für Plattenepithelkarzinome der Zervix uteri fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen verminderter CK13 Färbung und einem hohen Malignitätsgrad ($p = 0,0295$) sowie einem verkürzten rezidivfreien ($p = 0,0094$) und Gesamtüberleben ($p = 0,0274$). In einer kombinierten Analyse von 1.151 Plattenepithelkarzinomen von 11 verschiedenen Ursprungsorten fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer verminderten CK13 Expression und einem hohen Malignitätsgrad ($p = 0,0050$). Zusammenfassend bieten unsere Daten einen umfassenden Überblick über die CK13 Expression in normalen und neoplastischen menschlichen Geweben. Die CK13 Expression überwiegt in urothelialen Neoplasien und in Plattenepithelkarzinomen verschiedener Organe, und ein Verlust der CK13 Expression geht in diesen Tumoren mit einer aggressiven Erkrankung einher.

6. English Summary

Cytokeratin 13 (CK13) is a type I acidic high molecular weight cytokeratin which is mainly expressed in urothelium and in squamous epithelium of various sites of origin. Loss of CK13 has been implicated in development and progression of squamous epithelial neoplasms. To comprehensively determine CK13 expression in normal and neoplastic tissues, a tissue microarray containing 10.439 samples from 131 different tumor types and subtypes as well as 608 samples of 76 different normal tissue types was analyzed by immunohistochemistry. CK13 immunostaining was detectable in 42 (32,1%) of 131 tumor categories including 24 (18,3%) tumor types with at least one strongly positive case. The highest rate of positive staining was found in various urothelial neoplasms (52,1-92,3%) including Brenner tumor of the ovary (86,8%) and in squamous cell carcinomas from various sites of origin (39,1-77,6%), Warthin tumors of parotid glands (66,7%), adenosquamous carcinomas of the cervix (33,3%), thymomas (16,0%), and endometrioid carcinomas of the ovary (15,3%). 20 other epithelial or germ cell neoplasms showed a – usually weak - CK13 positivity in less than 15%. In bladder cancer, reduced CK13 expression was linked to high grade and advanced stage ($p < 0,0001$ each). In squamous cell carcinoma of the cervix, reduced CK13 immunostaining was related to high grade ($p = 0,0295$) and shortened recurrence-free ($p = 0,0094$) and overall survival ($p = 0,0274$). In a combined analysis of 1.151 squamous cell carcinomas from 11 different sites of origin, reduced CK13 staining was linked to high grade ($p = 0,0050$). In summary, our data provide a comprehensive overview on CK13 expression in normal and neoplastic human tissues. CK13 expression predominates in urothelial neoplasms and in squamous cell carcinomas of different organs and a CK13 expression loss goes along with aggressive disease in these tumors.

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
A. Dest	Destilliertes Laborwasser
bzw.	beziehungsweise
Ca	Karzinom
ca.	circa
CIS	Karzinoma in situ
CK	Cytokeratin
DAB	3'3-Diaminobenzidin
DSP	Desmoplakin
EMT	Epithelial-mesenchymale Differenzierung
epithel.	epithelial
EPOS	Enhanced Polymer one-step
G	Histopathologisches Grading
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
Gl.	Glandula
GTEx	Genotype-Tissue Expression Project
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIER	Heat induced epitope retrieval
HIM	Helix-Initiations-Motiv
HPA	Human Protein Atlas
HPV	Humanes Papillomvirus
HTM	Helix-Terminations-Motiv
IF	Intermediärfilament
IHC	Immunhistochemie
IWGAV	International Working Group for Antibody Validation
kalzif.	kalzifizierend
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LSAB	Labeled Streptavidin-Biotin
LSCD	Limbale Stammzellinsuffizienz
min	Minute

mm	Millimeter
mRNA	Messenger RNA
MTA	Medizinisch-technische*r Assistent*in
MTA	Multi Tumor Array
N	Anzahl
NET	Neuroendokriner Tumor
nm	Nanometer
NOS	Not otherwise specified (nicht anderweitig spezifiziert)
Nr.	Nummer
NST	No special type (ohne speziellen Typ)
NTA	Normaltissue-Array (Normalgewebe-Array)
odont.	odontogen
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PeCa	Plattenepithelkarzinom
PG	Plakoglobin
pH	Pondus Hydrogenii
pM	Fernmetastasen (p=pathologisch, M=Metastasen)
pN	Regionäre Lymphknotenmetastasen (p=pathologisch, N=Nodus)
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
pT	Ausbreitung des Primärtumors (p=pathologisch, T=Tumor)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RTU	Ready-to-use
SABC	Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex
SERM	Selektiver Estrogen-Rezeptor-Modulator
TBST	Tris-buffered-saline-with-Tween
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TEC	Tris-EDTA-Citrat
TIC	Tubulus-initiierende Zellen
TMA	Tissue-Microarray
TNBC	Triple-negatives Mammakarzinom
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

8. Literaturverzeichnis

- Abé, T., Maruyama, S., Yamazaki, M., Xu, B., Babkair, H., Sumita, Y., Cheng, J., Yamamoto, T., & Saku, T. (2017). Proteomic and histopathological characterization of the interface between oral squamous cell carcinoma invasion fronts and non-cancerous epithelia. *Exp Mol Pathol*, *102*(2), 327-336.
- Acehan, D., Petzold, C., Gumper, I., Sabatini, D. D., Müller, E. J., Cowin, P., & Stokes, D. L. (2008). Plakoglobin is required for effective intermediate filament anchorage to desmosomes. *J Invest Dermatol*, *128*(11), 2665-2675.
- Achtstätter, T., Moll, R., Moore, B., & Franke, W. W. (1985). Cytokeratin polypeptide patterns of different epithelia of the human male urogenital tract: immunofluorescence and gel electrophoretic studies. *J Histochem Cytochem*, *33*(5), 415-426.
- Adami, G. R., O'Callaghan, T. N., Kolokythas, A., Cabay, R. J., Zhou, Y., & Schwartz, J. L. (2017). A loss of profilin-1 in late-stage oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, *46*(7), 489-495.
- Agaimy, A., Kirsche, H., Semrau, S., Iro, H., & Hartmann, A. (2012). Cytokeratin-positive epithelioid angiosarcoma presenting in the tonsil: a diagnostic challenge. *Hum Pathol*, *43*(7), 1142-1147.
- Ahn, S., Bae, G. E., & Kim, K. M. (2015). Exuberant squamous metaplasia of the gastric mucosa in a patient with gastric adenocarcinoma. *Diagn Pathol*, *10*, 46.
- Al Kuraya, K., Simon, R., & Sauter, G. (2004). Tissue microarrays for high-throughput molecular pathology. *Ann Saudi Med*, *24*(3), 169-174.
- Al-Eryani, K., Karasneh, J., Sedghizadeh, P. P., Ram, S., & Sawair, F. (2016). Lack of Utility of Cytokeratins in Differentiating Pseudocarcinomatous Hyperplasia of Granular Cell Tumors from Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*, *17*(4), 1785-1787.
- Ansink, A., Mooi, W. J., van Doornwaard, G., van Tinteren, H., Heintz, A. P., & Ivanyi, D. (1995). Cytokeratin subtypes and involucrin in squamous cell carcinoma of the vulva. An immunohistochemical study of 41 cases. *Cancer*, *76*(4), 638-643.
- Antunes, A. A., Nesrallah, L. J., Dall'Oglio, M. F., Maluf, C. E., Camara, C., Leite, K. R., & Srougi, M. (2007). The role of squamous differentiation in patients with transitional cell carcinoma of the bladder treated with radical cystectomy. *Int Braz J Urol*, *33*(3), 339-345; discussion 346.
- Azevedo, R. S., de Almeida, O. P., Kowalski, L. P., & Pires, F. R. (2008). Comparative cytokeratin expression in the different cell types of salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *Head Neck Pathol*, *2*(4), 257-264.
- Baker, H., Patel, V., Molinolo, A. A., Shillitoe, E. J., Ensley, J. F., Yoo, G. H., Meneses-García, A., Myers, J. N., El-Naggar, A. K., Gutkind, J. S., & Hancock, W. S. (2005). Proteome-wide analysis of head and neck squamous cell carcinomas using laser-capture microdissection and tandem mass spectrometry. *Oral Oncol*, *41*(2), 183-199.
- Baylor, S. M., & Berg, J. W. (1973). Cross-classification and survival characteristics of 5,000 cases of cancer of the pancreas. *J Surg Oncol*, *5*(4), 335-358.

- Begley, C. G., & Ellis, L. M. (2012). Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. *Nature*, 483(7391), 531-533.
- Bernal, A., & Arranz, L. (2018). Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci*, 75(12), 2177-2195.
- Billis, A., Schenka, A. A., Ramos, C. C., Carneiro, L. T., & Araujo, V. (2001). Squamous and/or glandular differentiation in urothelial carcinoma: prevalence and significance in transurethral resections of the bladder. *Int Urol Nephrol*, 33(4), 631-633.
- Bloor, B. K., Seddon, S. V., & Morgan, P. R. (2001). Gene expression of differentiation-specific keratins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 37(3), 251-261.
- Borazanci, E., Millis, S. Z., Korn, R., Han, H., Whatcott, C. J., Gatalica, Z., Barrett, M. T., Cridebring, D., & Von Hoff, D. D. (2015). Adenosquamous carcinoma of the pancreas: Molecular characterization of 23 patients along with a literature review. *World J Gastrointest Oncol*, 7(9), 132-140.
- Bornslaeger, E. A., Corcoran, C. M., Stappenbeck, T. S., & Green, K. J. (1996). Breaking the connection: displacement of the desmosomal plaque protein desmoplakin from cell-cell interfaces disrupts anchorage of intermediate filament bundles and alters intercellular junction assembly. *J Cell Biol*, 134(4), 985-1001.
- Boyd, C. A., Benarroch-Gampel, J., Sheffield, K. M., Cooksley, C. D., & Riall, T. S. (2012). 415 patients with adenosquamous carcinoma of the pancreas: a population-based analysis of prognosis and survival. *J Surg Res*, 174(1), 12-19.
- Bubendorf, L., Nocito, A., Moch, H., & Sauter, G. (2001). Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol*, 195(1), 72-79.
- Bucur, O., Pennarun, B., Stancu, A. L., Nadler, M., Muraru, M. S., Bertomeu, T., & Khosravi-Far, R. (2013). Poor antibody validation is a challenge in biomedical research: a case study for detection of c-FLIP. *Apoptosis*, 18(10), 1154-1162.
- Callery, C. D., Sanders, M. M., Pratt, S., & Turnbull, A. D. (1985). Squamous cell carcinoma of the stomach: a study of four patients with comments on histogenesis. *J Surg Oncol*, 29(3), 166-172.
- Carrilho, C., Alberto, M., Buane, L., & David, L. (2004). Keratins 8, 10, 13, and 17 are useful markers in the diagnosis of human cervix carcinomas. *Hum Pathol*, 35(5), 546-551.
- Caulin, C., Ware, C. F., Magin, T. M., & Oshima, R. G. (2000). Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Cell Biol*, 149(1), 17-22.
- Celis, J. E., Ostergaard, M., Basse, B., Celis, A., Lauridsen, J. B., Ratz, G. P., Andersen, I., Hein, B., Wolf, H., Orntoft, T. F., & Rasmussen, H. H. (1996). Loss of adipocyte-type fatty acid binding protein and other protein biomarkers is associated with progression of human bladder transitional cell carcinomas. *Cancer Res*, 56(20), 4782-4790.
- Chang, L., & Goldman, R. D. (2004). Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(8), 601-613.
- Chen, Y. Y., Li, A. F., Huang, K. H., Lan, Y. T., Chen, M. H., Chao, Y., Lo, S. S., Wu, C. W., Shyr, Y. M., & Fang, W. L. (2015). Adenosquamous carcinoma of the stomach and review of the literature. *Pathol Oncol Res*, 21(3), 547-551.

- Cheung, W. C., Beausoleil, S. A., Zhang, X., Sato, S., Schieferl, S. M., Wieler, J. S., Beaudet, J. G., Ramenani, R. K., Popova, L., Comb, M. J., Rush, J., & Polakiewicz, R. D. (2012). A proteomics approach for the identification and cloning of monoclonal antibodies from serum. *Nat Biotechnol*, *30*(5), 447-452.
- Choi, W., Porten, S., Kim, S., Willis, D., Plimack, E. R., Hoffman-Censits, J., Roth, B., Cheng, T., Tran, M., Lee, I. L., Melquist, J., Bondaruk, J., Majewski, T., Zhang, S., Pretzsch, S., Baggerly, K., Siefker-Radtke, A., Czerniak, B., Dinney, C. P., & McConkey, D. J. (2014). Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell*, *25*(2), 152-165.
- Chu, P. G., & Weiss, L. M. (2002). Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*, *40*(5), 403-439.
- Cimino-Mathews, A., Verma, S., Figueroa-Magalhaes, M. C., Jeter, S. C., Zhang, Z., Argani, P., Stearns, V., & Connolly, R. M. (2016). A Clinicopathologic Analysis of 45 Patients With Metaplastic Breast Carcinoma. *Am J Clin Pathol*, *145*(3), 365-372.
- Cohen, R., Guber, A., Siegal, A., Bruderman, I., Huszar, M., Yellin, A., Marom, Z., & Geiger, B. (1997). The prognostic application of cytokeratin typing of nonsmall cell lung carcinoma. A retrospective study. *Cancer*, *79*(3), 468-473.
- Consortium, I. T. P.-C. A. o. W. G. (2020). Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature*, *578*(7793), 82-93.
- Cooper, D., Schermer, A., & Sun, T. T. (1985). Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Lab Invest*, *52*(3), 243-256.
- Coulombe, P. A., Ma, L., Yamada, S., & Wawersik, M. (2001). Intermediate filaments at a glance. *J Cell Sci*, *114*(Pt 24), 4345-4347.
- Crivelini, M. M., de Araújo, V. C., de Sousa, S. O., & de Araújo, N. S. (2003). Cytokeratins in epithelia of odontogenic neoplasms. *Oral Dis*, *9*(1), 1-6.
- Dabbs, D. J. (2006). Immunohistology of metastatic carcinoma of unknown primary. In *Diagnostic immunohistochemistry*. Elsevier. 180-226.
- Dalton, F. P., Grando, L. J., Meurer, M. I., Rivero, E. R., & Modolo, F. (2015). A Rare Case of Mucoepidermoid Carcinoma ex Pleomorphic Adenoma arising in Minor Salivary Gland: Histopathological and Immunohistochemical Analysis. *J Contemp Dent Pract*, *16*(7), 603-606.
- Damjanov, I., Sneff, E. M., & Delorme, A. N. (1983). Squamous cell carcinoma arising in Warthin's tumor of the parotid gland. A light, electron microscopic, and immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, *55*(3), 286-290.
- Dasgupta, S., Ewing-Graham, P. C., van Kemenade, F. J., van Doorn, H. C., Noordhoek Hegt, V., & Koljenovic, S. (2018). Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia (dVIN): the most helpful histological features and the utility of cytokeratins 13 and 17. *Virchows Arch*, *473*(6), 739-747.
- Dave, B., Mittal, V., Tan, N. M., & Chang, J. C. (2012). Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. *Breast Cancer Res*, *14*(1), 202.
- de Araújo, V. C., de Sousa, S. O., Carvalho, Y. R., & de Araújo, N. S. (2000). Application of immunohistochemistry to the diagnosis of salivary gland tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, *8*(3), 195-202.

- de Craene, B., & Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*, 13(2), 97-110.
- de Moura Castro Jacques, C., Cardozo Pereira, A. L., Cabral, M. G., Cardoso, A. S., & Ramos-e-Silva, M. (2003). Oral lichen planus part I: epidemiology, clinics, etiology, immunopathogeny, and diagnosis. *Skinmed*, 2(6), 342-347; quiz 348-349.
- Depondt, J., Shabana, A. H., Sawaf, H., Gehanno, P., & Forest, N. (1999). Cytokeratin alterations as diagnostic and prognostic markers of oral and pharyngeal carcinomas. A prospective study. *Eur J Oral Sci*, 107(6), 442-454.
- do Prado, R. F., Lima, C. F., Pontes, H. A., Almeida, J. D., Cabral, L. A., & Carvalho, Y. R. (2007). Calcifications in a clear cell mucoepidermoid carcinoma: a case report with histological and immunohistochemical findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 104(5), e40-44.
- Domingues, M. G., Jaeger, M. M., Araujo, V. C., & Araujo, N. S. (2000). Expression of cytokeratins in human enamel organ. *Eur J Oral Sci*, 108(1), 43-47.
- dos Santos, J. N., de Sousa, S. O., Nunes, F. D., Sotto, M. N., & de Araujo, V. C. (2003). Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. *J Cutan Pathol*, 30(4), 237-241.
- Ehdaie, B., Maschino, A., Shariat, S. F., Rioja, J., Hamilton, R. J., Lowrance, W. T., Poon, S. A., Al-Ahmadie, H. A., & Herr, H. W. (2012). Comparative outcomes of pure squamous cell carcinoma and urothelial carcinoma with squamous differentiation in patients treated with radical cystectomy. *J Urol*, 187(1), 74-79.
- Epstein, J. I. (1993). PSA and PAP as immunohistochemical markers in prostate cancer. *Urol Clin North Am*, 20(4), 757-770.
- Erdemir, F., Tunc, M., Ozcan, F., Parlaktas, B. S., Uluocak, N., Kilicaslan, I., & Gokce, O. (2007). The effect of squamous and/or glandular differentiation on recurrence, progression and survival in urothelial carcinoma of bladder. *Int Urol Nephrol*, 39(3), 803-807.
- Erdemir, F., Uluocak, N., Tunç, M., Ozcan, F., Esen, T., Kilicaslan, I. (2008). The clinical significance of focal and widespread squamous and glandular differentiation in urothelial cancers of the bladder. *Turk Uroloji Dergisi*, 34, 161-167.
- Eyer, K., Castrillon, C., Chenon, G., Bibette, J., Bruhns, P., Griffiths, A. D., & Baudry, J. (2020). The Quantitative Assessment of the Secreted IgG Repertoire after Recall to Evaluate the Quality of Immunizations. *J Immunol*, 205(4), 1176-1184.
- Farrukh, S., Syed, S., & Pervez, S. (2015). Differential Expression of Cytokeratin 13 in Non-Neoplastic, Dysplastic and Neoplastic Oral Mucosa in a High Risk Pakistani Population. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(13), 5489-5492.
- Fay, J., Kelehan, P., Lambkin, H., & Schwartz, S. (2009). Increased expression of cellular RNA-binding proteins in HPV-induced neoplasia and cervical cancer. *J Med Virol*, 81(5), 897-907.
- Fisher, E. R., Gregorio, R. M., Fisher, B., Redmond, C., Vellios, F., & Sommers, S. C. (1975). The pathology of invasive breast cancer. A syllabus derived from findings of the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no. 4). *Cancer*, 36(1), 1-85.

- Fisher, E. R., Palekar, A. S., Gregorio, R. M., & Paulson, J. D. (1983). Mucoepidermoid and squamous cell carcinomas of breast with reference to squamous metaplasia and giant cell tumors. *Am J Surg Pathol*, 7(1), 15-27.
- Fletcher, D. A., & Mullins, R. D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280), 485-492.
- Frazier, H. A., Robertson, J. E., Dodge, R. K., & Paulson, D. F. (1993). The value of pathologic factors in predicting cancer-specific survival among patients treated with radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder and prostate. *Cancer*, 71(12), 3993-4001.
- Fuchs, E., & Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*, 63, 345-382.
- Fudge, D., Russell, D., Beriault, D., Moore, W., Lane, E. B., & Vogl, A. W. (2008). The intermediate filament network in cultured human keratinocytes is remarkably extensible and resilient. *PLoS One*, 3(6), e2327.
- Fukai, I., Masaoka, A., Hashimoto, T., Yamakawa, Y., Mizuno, T., & Tanamura, O. (1993). Cytokeratins in normal thymus and thymic epithelial tumors. *Cancer*, 71(1), 99-105.
- Fukai, I., Masaoka, A., Hashimoto, T., Yamakawa, Y., Niwa, H., Kiriya, M., & Eimoto, T. (1995). Differential diagnosis of thymic carcinoma and lung carcinoma with the use of antibodies to cytokeratins. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 110(6), 1670-1675.
- Fung, C. Y., Shipley, W. U., Young, R. H., Griffin, P. P., Convery, K. M., Kaufman, D. S., Althausen, A. F., Heney, N. M., & Prout, G. R., Jr. (1991). Prognostic factors in invasive bladder carcinoma in a prospective trial of preoperative adjuvant chemotherapy and radiotherapy. *J Clin Oncol*, 9(9), 1533-1542.
- Garcia, N. G., Oliveira, D. T., Lauris, J. R., Domingues, M. A., Minicucci, E. M., & Soares, C. T. (2016). Loss of cytokeratin 10 indicates malignant transformation in actinic cheilitis. *Clin Oral Investig*, 20(4), 745-752.
- Gerard, A., Woolfe, A., Mottet, G., Reichen, M., Castrillon, C., Menrath, V., Ellouze, S., Poitou, A., Doineau, R., Briseno-Roa, L., Canales-Herrerias, P., Mary, P., Rose, G., Ortega, C., Delince, M., Essono, S., Jia, B., Iannascoli, B., Richard-Le Goff, O., . . . Brenan, C. (2020). High-throughput single-cell activity-based screening and sequencing of antibodies using droplet microfluidics. *Nat Biotechnol*, 38(6), 715-721.
- Gill, A., Klimstra, D., Lam, A., Washington, M. (2019). Tumours of the Pancreas. In: Arends, M., Fukayama, M., Klimstra, D. (eds) Digestive System Tumours, vol. 1. WHO classification of tumours series, 5th edition, Lyon (France), 296–372.
- Glickman, J. N., Yang, A., Shahsafaie, A., McKeon, F., & Odze, R. D. (2001). Expression of p53-related protein p63 in the gastrointestinal tract and in esophageal metaplastic and neoplastic disorders. *Hum Pathol*, 32(11), 1157-1165.
- Gluck, G., Hortopan, M., Stanculeanu, D., Chirita, M., Stoica, R., & Sinescu, I. (2014). Comparative study of conventional urothelial carcinoma, squamous differentiation carcinoma and pure squamous carcinoma in patients with invasive bladder tumors. *J Med Life*, 7(2), 211-214.
- Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G. L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., Edkins, S., O'Meara, S., Vastrik, I., Schmidt, E. E., Avis, T., Barthorpe, S., Bhamra, G., Buck, G., Choudhury, B., . . . Stratton, M. R. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, 446(7132), 153-158.

- Grieshammer, T., Zimmer, C., & Vogeley, K. T. (1991). Immunohistochemistry of primitive neuroectodermal tumors in infants with special emphasis on cytokeratin expression. *Acta Neuropathol*, 82(6), 494-501.
- Haines, R. L., & Lane, E. B. (2012). Keratins and disease at a glance. *J Cell Sci*, 125(Pt 17), 3923-3928.
- Hanakawa, Y., Amagai, M., Shirakata, Y., Yahata, Y., Tokumaru, S., Yamasaki, K., Tohyama, M., Sayama, K., & Hashimoto, K. (2002). Differential effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation. *J Invest Dermatol*, 119(6), 1231-1236.
- Hartanto, F. K., Karen-Ng, L. P., Vincent-Chong, V. K., Ismail, S. M., Mustafa, W. M., Abraham, M. T., Tay, K. K., & Zain, R. B. (2015). KRT13, FAIM2 and CYP2W1 mRNA expression in oral squamous cell carcinoma patients with risk habits. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(3), 953-958.
- Hasegawa, H., Kusumi, Y., Asakawa, T., Maeda, M., Oinuma, T., Furusaka, T., Oshima, T., & Esumi, M. (2017). Expression of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (pVHL) characteristic of tongue cancer and proliferative lesions in tongue epithelium. *BMC Cancer*, 17(1), 381.
- He, H., Li, S., Hong, Y., Zou, H., Chen, H., Ding, F., Wan, Y., & Liu, Z. (2015). Krüppel-like Factor 4 Promotes Esophageal Squamous Cell Carcinoma Differentiation by Up-regulating Keratin 13 Expression. *J Biol Chem*, 290(21), 13567-13577.
- Helander, K. G. (1994). Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. *Biotech Histochem*, 69(3), 177-179.
- Herrmann, H., & Aebi, U. (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds. *Annu Rev Biochem*, 73(1), 749-789.
- Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S. V., & Aebi, U. (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(7), 562-573.
- Herrmann, H., Haner, M., Brettel, M., Ku, N. O., & Aebi, U. (1999). Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins. *J Mol Biol*, 286(5), 1403-1420.
- Herrmann, H., Hesse, M., Reichenzeller, M., Aebi, U., & Magin, T. M. (2003). Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. *Int Rev Cytol*, 223, 83-175.
- Hesse, M., Zimek, A., Weber, K., & Magin, T. M. (2004). Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. *Eur J Cell Biol*, 83(1), 19-26.
- Hohmann, T., & Dehghani, F. (2019). The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells*, 8(4).
- Hruban, R., Pitman, M., Klimstra, D. (2007). Tumors of the pancreas. In: Silverberg, S., Sobin, L., eds. AFIP Atlas of Tumor Pathology, Series 4, Fascicle 6. Washington, DC: American Registry of Pathology. 177-81.
- Hsieh, M. C., Sung, M. T., Chiang, P. H., Huang, C. H., Tang, Y., & Su, Y. L. (2015). The Prognostic Impact of Histopathological Variants in Patients with Advanced Urothelial Carcinoma. *PLoS One*, 10(6), e0129268.
- Hudson, L. G., Gale, J. M., Padilla, R. S., Pickett, G., Alexander, B. E., Wang, J., & Kusewitt, D. F. (2010). Microarray analysis of cutaneous squamous cell carcinomas reveals enhanced expression of epidermal differentiation complex genes. *Mol Carcinog*, 49(7), 619-629.

- Ibrahim, S. O., Bertelsen, B., Kalvenes, M. B., Idris, A. M., Vasstrand, E. N., Nilsen, R., & Johannessen, A. C. (1998). Expression of keratin 13, 14 and 19 in oral squamous cell carcinomas from Sudanese snuff dippers: lack of association with human papillomavirus infection. *Apmis*, *106*(10), 959-969.
- Ibrahim, S. O., Warnakulasuriya, K. A., Idris, A. M., Hirsch, J. M., Johnson, N. W., & Johannessen, A. C. (1998). Expression of keratin 13, 14 and 19 in oral hyperplastic and dysplastic lesions from Sudanese and Swedish snuff-dippers: association with human papillomavirus infection. *Anticancer Res*, *18*(1B), 635-645.
- Ida-Yonemochi, H., Maruyama, S., Kobayashi, T., Yamazaki, M., Cheng, J., & Saku, T. (2012). Loss of keratin 13 in oral carcinoma in situ: a comparative study of protein and gene expression levels using paraffin sections. *Mod Pathol*, *25*(6), 784-794.
- Ikeda, M., Shima, K., Kondo, T., & Semba, I. (2020). Atypical immunohistochemical patterns can complement the histopathological diagnosis of oral premalignant lesions. *J Oral Biosci*, *62*(1), 93-98.
- Inoue, T., Shimono, M., Takano, N., Saito, C., & Tanaka, Y. (1997). Merkel cell carcinoma of palatal mucosa in a young adult: immunohistochemical and ultrastructural features. *Oral Oncol*, *33*(3), 226-229.
- International Cancer Genome, C., Hudson, T. J., Anderson, W., Artez, A., Barker, A. D., Bell, C., Bernabe, R. R., Bhan, M. K., Calvo, F., Eerola, I., Gerhard, D. S., Guttmacher, A., Guyer, M., Hemsley, F. M., Jennings, J. L., Kerr, D., Klatt, P., Kolar, P., Kusada, J., . . . Yang, H. (2010). International network of cancer genome projects. *Nature*, *464*(7291), 993-998.
- Ishida-Yamamoto, A., Takahashi, H., & Iizuka, H. (2002). Lessons from disorders of epidermal differentiation-associated keratins. *Histol Histopathol*, *17*(1), 331-338.
- Itakura, Y., Sasano, H., Abe, K., Furukawa, Y., Mori, S., & Nagura, H. (1996). Cytokeratin immunolocalization and lectin binding studies in oesophageal squamous dysplasia. *Histopathology*, *29*(1), 3-10.
- Ivanyi, D., Groeneveld, E., Van Doornewaard, G., Mooi, W. J., & Hageman, P. C. (1990). Keratin subtypes in carcinomas of the uterine cervix: implications for histogenesis and differential diagnosis. *Cancer Res*, *50*(16), 5143-5152.
- Izard, J. P., Siemens, D. R., Mackillop, W. J., Wei, X., Leveridge, M. J., Berman, D. M., Peng, Y., & Booth, C. M. (2015). Outcomes of squamous histology in bladder cancer: a population-based study. *Urol Oncol*, *33*(10), 425 e427-413.
- Jang, N. Y., Kim, I. A., Byun, S. S., Lee, S. E., & Kim, J. S. (2013). Patterns of failure and prognostic factors for locoregional recurrence after radical surgery in upper urinary tract transitional cell carcinoma: implications for adjuvant radiotherapy. *Urol Int*, *90*(2), 202-206.
- Jankovic Velickovic, L., Dolicanin, Z., Hattori, T., Pesic, I., Djordjevic, B., Stojanovic, M., Stankovic, J., Visnic, M., & Stefanovic, V. (2011). Divergent squamous differentiation in upper urothelial carcinoma-comparative clinicopathological and molecular study. *Pathol Oncol Res*, *17*(3), 535-539.
- Jenkins, B. J., Martin, J. E., Baithun, S. I., Zuk, R. J., Oliver, R. T., & Blandy, J. P. (1990). Prediction of response to radiotherapy in invasive bladder cancer. *Br J Urol*, *65*(4), 345-348.
- Jones, J. C., & Green, K. J. (1991). Intermediate filament-plasma membrane interactions. *Curr Opin Cell Biol*, *3*(1), 127-132.

- Jones, J. C., Kam, C. Y., Harmon, R. M., Woychek, A. V., Hopkinson, S. B., & Green, K. J. (2017). Intermediate Filaments and the Plasma Membrane. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(1).
- Jorgenson, R. J., & Levin, S. (1981). White sponge nevus. *Arch Dermatol*, 117(2), 73-76.
- Jozwicki, W., Domaniewski, J., Skok, Z., Wolski, Z., Domanowska, E., & Jozwicka, G. (2005). Usefulness of histologic homogeneity estimation of muscle-invasive urinary bladder cancer in an individual prognosis: a mapping study. *Urology*, 66(5), 1122-1126.
- Jung, S. Y., Kim, H. Y., Nam, B. H., Min, S. Y., Lee, S. J., Park, C., Kwon, Y., Kim, E. A., Ko, K. L., Shin, K. H., Lee, K. S., Park, I. H., Lee, S., Kim, S. W., Kang, H. S., & Ro, J. (2010). Worse prognosis of metaplastic breast cancer patients than other patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 120(3), 627-637.
- Kallioinen, M., Koivukangas, V., Jarvinen, M., & Oikarinen, A. (1995). Expression of cytokeratins in regenerating human epidermis. *Br J Dermatol*, 133(6), 830-835.
- Kardon, D. E., Thompson, L. D., Przygodzki, R. M., & Heffess, C. S. (2001). Adenosquamous carcinoma of the pancreas: a clinicopathologic series of 25 cases. *Mod Pathol*, 14(5), 443-451.
- Kastritis, E., Dimopoulos, M. A., Antoniou, N., Deliveliotis, C., Chrisofos, M., Skolarikos, A., Gika, D., & Bamias, A. (2006). The outcome of patients with advanced pure squamous or mixed squamous and transitional urothelial carcinomas following platinum-based chemotherapy. *Anticancer Res*, 26(5B), 3865-3869.
- Kim, D. S., Lee, Y. H., Cho, K. S., Cho, N. H., Chung, B. H., & Hong, S. J. (2010). Lymphovascular invasion and pT stage are prognostic factors in patients treated with radical nephroureterectomy for localized upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology*, 75(2), 328-332.
- Kim, J. E., & Kim, T. G. (2019). Squamous cell carcinoma arising from Warthin's tumor in the parotid gland. *BJR Case Rep*, 5(4), 20190032.
- Kim, M. A., Lee, H. S., Yang, H. K., & Kim, W. H. (2004). Cytokeratin expression profile in gastric carcinomas. *Hum Pathol*, 35(5), 576-581.
- Kim, S., & Coulombe, P. A. (2007). Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev*, 21(13), 1581-1597.
- Kim, S., Wong, P., & Coulombe, P. A. (2006). A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature*, 441(7091), 362-365.
- Kim, S. P., Frank, I., Cheville, J. C., Thompson, R. H., Weight, C. J., Thapa, P., & Boorjian, S. A. (2012). The impact of squamous and glandular differentiation on survival after radical cystectomy for urothelial carcinoma. *J Urol*, 188(2), 405-409.
- Kishino, M., Murakami, S., Yuki, M., Iida, S., Ogawa, Y., Kogo, M., & Toyosawa, S. (2007). A immunohistochemical study of the peripheral ameloblastoma. *Oral Dis*, 13(6), 575-580.
- Kitamura, R., Toyoshima, T., Tanaka, H., Kawano, S., Kiyosue, T., Matsubara, R., Goto, Y., Hirano, M., Oobu, K., & Nakamura, S. (2012). Association of cytokeratin 17 expression with differentiation in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 138(8), 1299-1310.

- Klijanienko, J., Micheau, C., Carlu, C., & Caillaud, J. M. (1989). Significance of keratin 13 and 6 expression in normal, dysplastic and malignant squamous epithelium of pyriform fossa. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 416(2), 121-124.
- Kobayashi, T., Maruyama, S., Cheng, J., Ida-Yonemochi, H., Yagi, M., Takagi, R., & Saku, T. (2010). Histopathological varieties of oral carcinoma in situ: Diagnosis aided by immunohistochemistry dealing with the second basal cell layer as the proliferating center of oral mucosal epithelia. *Pathol Int*, 60(3), 156-166.
- Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Bärklund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M. J., Sauter, G., & Kallioniemi, O. P. (1998). Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4(7), 844-847.
- Kouklis, P. D., Hutton, E., & Fuchs, E. (1994). Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins. *J Cell Biol*, 127(4), 1049-1060.
- Krasnow, R. E., Drumm, M., Roberts, H. J., Niemierko, A., Wu, C. L., Wu, S., Zhang, J., Heney, N. M., Wszolek, M. F., Blute, M. L., Feldman, A. S., Lee, R. J., Zietman, A. L., Shipley, W. U., & Efsthathiou, J. A. (2017). Clinical Outcomes of Patients with Histologic Variants of Urothelial Cancer Treated with Trimodality Bladder-sparing Therapy. *Eur Urol*, 72(1), 54-60.
- Kruse, A. J., Skaland, I., Janssen, E. A., Buhr-Wildhagen, S., Klos, J., Arends, M. J., & Baak, J. P. (2004). Quantitative molecular parameters to identify low-risk and high-risk early CIN lesions: role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability. *Int J Gynecol Pathol*, 23(2), 100-109.
- Ku, N. O., Soetikno, R. M., & Omary, M. B. (2003). Keratin mutation in transgenic mice predisposes to Fas but not TNF-induced apoptosis and massive liver injury. *Hepatology*, 37(5), 1006-1014.
- Kuruc, N., Leube, R. E., Moll, I., Bader, B. L., & Franke, W. W. (1989). Synthesis of cytokeratin 13, a component characteristic of internal stratified epithelia, is not induced in human epidermal tumors. *Differentiation*, 42(2), 111-123.
- Lakhani, S., Ellis, I., Schnitt, S., Tan, P., Van De Vijer, M. (2012). WHO classification of tumours of the breast. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer.
- Lallemant, B., Evrard, A., Combescure, C., Chapuis, H., Chambon, G., Raynal, C., Reynaud, C., Sabra, O., Joubert, D., Hollande, F., Lallemant, J. G., Lumbroso, S., & Brouillet, J. P. (2009). Clinical relevance of nine transcriptional molecular markers for the diagnosis of head and neck squamous cell carcinoma in tissue and saliva rinse. *BMC Cancer*, 9, 370.
- Lam, K. Y., Loke, S. L., Shen, X. C., & Ma, L. T. (1995). Cytokeratin expression in non-neoplastic oesophageal epithelium and squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Virchows Arch*, 426(4), 345-349.
- Lane, E. B., & Alexander, C. M. (1990). Use of keratin antibodies in tumor diagnosis. *Semin Cancer Biol*, 1(3), 165-179.
- Lane, E. B., & McLean, W. H. (2004). Keratins and skin disorders. *J Pathol*, 204(4), 355-366.
- Lang, G., & Dallenbach-Hellweg, G. (1990). The histogenetic origin of cervical mesonephric hyperplasia and mesonephric adenocarcinoma of the uterine cervix studied with immunohistochemical methods. *Int J Gynecol Pathol*, 9(2), 145-157.

- Langlands, F., Cornford, E., Rakha, E., Dall, B., Gutteridge, E., Dodwell, D., Shaaban, A. M., & Sharma, N. (2016). Imaging overview of metaplastic carcinomas of the breast: a large study of 71 cases. *Br J Radiol*, *89*(1064), 20140644.
- Langner, C., Hutterer, G., Chromecki, T., Rehak, P., & Zigeuner, R. (2006). Patterns of invasion and histological growth as prognostic indicators in urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *Virchows Arch*, *448*(5), 604-611.
- Lee, M. J., Lee, H. S., Kim, W. H., Choi, Y., & Yang, M. (2003). Expression of mucins and cytokeratins in primary carcinomas of the digestive system. *Mod Pathol*, *16*(5), 403-410.
- Lee, Y. J., Moon, K. C., Jeong, C. W., Kwak, C., Kim, H. H., & Ku, J. H. (2014). Impact of squamous and glandular differentiation on oncologic outcomes in upper and lower tract urothelial carcinoma. *PLoS One*, *9*(9), e107027.
- Leon, J. E., Mata, G. M., Fregnani, E. R., Carlos-Bregni, R., de Almeida, O. P., Mosqueda-Taylor, A., & Vargas, P. A. (2005). Clinicopathological and immunohistochemical study of 39 cases of Adenomatoid Odontogenic Tumour: a multicentric study. *Oral Oncol*, *41*(8), 835-842.
- Leuschner, I., Harms, D., & Schmidt, D. (1991). Renal cell carcinoma in children: histology, immunohistochemistry, and follow-up of 10 cases. *Med Pediatr Oncol*, *19*(1), 33-41.
- Leyrer, C. M., Berriochoa, C. A., Agrawal, S., Donaldson, A., Calhoun, B. C., Shah, C., Stewart, R., Moore, H. C. F., & Tendulkar, R. D. (2017). Predictive factors on outcomes in metaplastic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, *165*(3), 499-504.
- Li, C. E., Chien, C. S., Chuang, Y. C., Chang, Y. I., Tang, H. P., & Kang, C. H. (2016). Chronic kidney disease as an important risk factor for tumor recurrences, progression and overall survival in primary non-muscle-invasive bladder cancer. *Int Urol Nephrol*, *48*(6), 993-999.
- Li, G., Hu, J., & Niu, Y. (2018). Squamous differentiation in pT1 bladder urothelial carcinoma predicts poor response for intravesical chemotherapy. *Oncotarget*, *9*(1), 217-223.
- Li, G., Yu, J., Song, H., Zhu, S., Sun, L., Shang, Z., & Niu, Y. (2017). Squamous differentiation in patients with superficial bladder urothelial carcinoma is associated with high risk of recurrence and poor survival. *BMC Cancer*, *17*(1), 530.
- Li, Q., Yin, L., Jones, L. W., Chu, G. C., Wu, J. B., Huang, J. M., Li, Q., You, S., Kim, J., Lu, Y. T., Mrdenovic, S., Wang, R., Freeman, M. R., Garraway, I., Lewis, M. S., Chung, L. W., & Zhau, H. E. (2016). Keratin 13 expression reprograms bone and brain metastases of human prostate cancer cells. *Oncotarget*, *7*(51), 84645-84657.
- Linder, B. J., Boorjian, S. A., Cheville, J. C., Sukov, W. R., Thapa, P., Tarrell, R. F., & Frank, I. (2013). The impact of histological reclassification during pathology re-review--evidence of a Will Rogers effect in bladder cancer? *J Urol*, *190*(5), 1692-1696.
- Litvinov, S. V., van Driel, W., van Rhijn, C. M., Bakker, H. A., van Krieken, H., Fleuren, G. J., & Warnaar, S. O. (1996). Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *Am J Pathol*, *148*(3), 865-875.

- Liu, S., Cadaneanu, R. M., Zhang, B., Huo, L., Lai, K., Li, X., Galet, C., Grogan, T. R., Elashoff, D., Freedland, S. J., Rettig, M., Aronson, W. J., Knudsen, B. S., Lewis, M. S., & Garraway, I. P. (2016). Keratin 13 Is Enriched in Prostate Tubule-Initiating Cells and May Identify Primary Prostate Tumors that Metastasize to the Bone. *PLoS One*, *11*(10), e0163232.
- Liu, Y., Bui, M. M., & Xu, B. (2017). Urothelial Carcinoma With Squamous Differentiation Is Associated With High Tumor Stage and Pelvic Lymph-Node Metastasis. *Cancer Control*, *24*(1), 78-82.
- Lopes, J. M., Bjerkehagen, B., Holm, R., Bruland, O., Sobrinho-Simões, M., & Nesland, J. M. (1994). Immunohistochemical profile of synovial sarcoma with emphasis on the epithelial-type differentiation. A study of 49 primary tumours, recurrences and metastases. *Pathol Res Pract*, *190*(2), 168-177.
- Lopez-Beltran, A., Martin, J., Garcia, J., & Toro, M. (1988). Squamous and glandular differentiation in urothelial bladder carcinomas. Histopathology, histochemistry and immunohistochemical expression of carcinoembryonic antigen. *Histol Histopathol*, *3*(1), 63-68.
- Lopez-Beltran, A., Requena, M. J., Alvarez-Kindelan, J., Quintero, A., Blanca, A., & Montironi, R. (2007). Squamous differentiation in primary urothelial carcinoma of the urinary tract as seen by MAC387 immunohistochemistry. *J Clin Pathol*, *60*(3), 332-335.
- Lu, J., Xue, L. Y., Lu, N., Zou, S. M., Liu, X. Y., & Wen, P. (2010). Superficial primary small cell carcinoma of the esophagus: clinicopathological and immunohistochemical analysis of 15 cases. *Dis Esophagus*, *23*(2), 153-159.
- Lu, X., & Lane, E. B. (1990). Retrovirus-mediated transgenic keratin expression in cultured fibroblasts: specific domain functions in keratin stabilization and filament formation. *Cell*, *62*(4), 681-696.
- Madoz-Gúrpide, J., Cañamero, M., Sanchez, L., Solano, J., Alfonso, P., & Casal, J. I. (2007). A proteomics analysis of cell signaling alterations in colorectal cancer. *Mol Cell Proteomics*, *6*(12), 2150-2164.
- Madura, J. A., Jarman, B. T., Doherty, M. G., Yum, M. N., & Howard, T. J. (1999). Adenosquamous carcinoma of the pancreas. *Arch Surg*, *134*(6), 599-603.
- Maeda, T., Kajiyama, K., Adachi, E., Takenaka, K., Sugimachi, K., & Tsuneyoshi, M. (1996). The expression of cytokeratins 7, 19, and 20 in primary and metastatic carcinomas of the liver. *Mod Pathol*, *9*(9), 901-909.
- Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*, *1897*, 289-298.
- Magin, T. M., Vijayaraj, P., & Leube, R. E. (2007). Structural and regulatory functions of keratins. *Exp Cell Res*, *313*(10), 2021-2032.
- Mahe, E., & Sur, M. (2011). Squamous lesions of the ovary. *Arch Pathol Lab Med*, *135*(12), 1611-1614.
- Makise, N., Morikawa, T., Kawai, T., Nakagawa, T., Kume, H., Homma, Y., & Fukayama, M. (2015). Squamous differentiation and prognosis in upper urinary tract urothelial carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, *8*(6), 7203-7209.
- Malecha, M. J., & Miettinen, M. (1991). Expression of keratin 13 in human epithelial neoplasms. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, *418*(3), 249-254.
- Malecha, M. J., & Miettinen, M. (1992). Patterns of keratin subsets in normal and abnormal uterine cervical tissues. An immunohistochemical study. *Int J Gynecol Pathol*, *11*(1), 24-29.

- Martin, J. E., Jenkins, B. J., Zuk, R. J., Blandy, J. P., & Baithun, S. I. (1989). Clinical importance of squamous metaplasia in invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol*, 42(3), 250-253.
- Mazzucchelli, L., Bacchi, M., Studer, U. E., Markwalder, R., Sonntag, R. W., & Kraft, R. (1994). Invasion depth is the most important prognostic factor for transitional-cell carcinoma in a prospective trial of radical cystectomy and adjuvant chemotherapy. *Int J Cancer*, 57(1), 15-20.
- Medi-Learn Skript: Biochemie 1 – Abbildung 13, 7. Auflage, URL: https://www.medi-learn.de/examen/bildarchiv/detail.php?auflage=_8&bilder=&skr=Biologie%201&akt=755. (Stand 03.05.2022).
- Meng, J. J., Bornslaeger, E., Green, K. J., & Ip, W. (1998). Protein-protein interactions in intermediate filament structure and anchorage to the cell surface. *Biol Bull*, 194(3), 378-379; discussion 379-380.
- Mengel, M., Kreipe, H., & von Wasielewski, R. (2003). Rapid and large-scale transition of new tumor biomarkers to clinical biopsy material by innovative tissue microarray systems. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 11(3), 261-268.
- Miettinen, M. (1991). Keratin subsets in spindle cell sarcomas. Keratins are widespread but synovial sarcoma contains a distinctive keratin polypeptide pattern and desmoplakins. *Am J Pathol*, 138(2), 505-513.
- Miettinen, M., & Franssila, K. O. (2000). Variable expression of keratins and nearly uniform lack of thyroid transcription factor 1 in thyroid anaplastic carcinoma. *Hum Pathol*, 31(9), 1139-1145.
- Miettinen, M., Limon, J., Niezabitowski, A., & Lasota, J. (2000). Patterns of keratin polypeptides in 110 biphasic, monophasic, and poorly differentiated synovial sarcomas. *Virchows Arch*, 437(3), 275-283.
- Mikami, T., Cheng, J., Maruyama, S., Kobayashi, T., Funayama, A., Yamazaki, M., Adeola, H. A., Wu, L., Shingaki, S., Saito, C., & Saku, T. (2011). Emergence of keratin 17 vs. loss of keratin 13: their reciprocal immunohistochemical profiles in oral carcinoma in situ. *Oral Oncol*, 47(6), 497-503.
- Minato, A., Fujimoto, N., & Kubo, T. (2017). Squamous Differentiation Predicts Poor Response to Cisplatin-Based Chemotherapy and Unfavorable Prognosis in Urothelial Carcinoma of the Urinary Bladder. *Clin Genitourin Cancer*, 15(6), e1063-e1067.
- Minato, A., Noguchi, H., Kimuro, R., Mirii, H., Yujiro, N., Hasegawa, Y., Tomisaki, I., Harada, K., & Fujimoto, N. (2022). Prognostic Value of Squamous Differentiation in Upper Tract Urothelial Carcinoma Treated With Radical Nephroureterectomy. *Anticancer Res*, 42(1), 263-269.
- Minato, A., Noguchi, H., Tomisaki, I., Fukuda, A., Kubo, T., Nakayama, T., & Fujimoto, N. (2018). Clinical Significance of Squamous Differentiation in Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Cancer Control*, 25(1), 1073274818800269.
- Mitra, A. P., Bartsch, C. C., Bartsch, G., Jr., Miranda, G., Skinner, E. C., & Daneshmand, S. (2014). Does presence of squamous and glandular differentiation in urothelial carcinoma of the bladder at cystectomy portend poor prognosis? An intensive case-control analysis. *Urol Oncol*, 32(2), 117-127.

- Mitsunaga, S. I., Zhang, S. Y., Ruggeri, B. A., Gimenez-Conti, I., Robles, A. I., Conti, C. J., & Klein-Szanto, A. J. (1995). Positive immunohistochemical staining of p53 and cyclin D in advanced mouse skin tumors, but not in precancerous lesions produced by benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis*, *16*(7), 1629-1635.
- Moll, R. (1998). Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. *Subcell Biochem*, *31*, 205-262.
- Moll, R., Achtstätter, T., Becht, E., Balcarova-Ständer, J., Ittensohn, M., & Franke, W. W. (1988). Cytokeratins in normal and malignant transitional epithelium. Maintenance of expression of urothelial differentiation features in transitional cell carcinomas and bladder carcinoma cell culture lines. *Am J Pathol*, *132*(1), 123-144.
- Moll, R., Divo, M., & Langbein, L. (2008). The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*, *129*(6), 705-733.
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., & Krepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, *31*(1), 11-24.
- Moll, R., Moll, I., & Wiest, W. (1982). Changes in the pattern of cytokeratin polypeptides in epidermis and hair follicles during skin development in human fetuses. *Differentiation*, *23*(2), 170-178.
- Monn, M. F., Kaimakliotis, H. Z., Cary, K. C., Bihrlé, R., Pedrosa, J. A., Masterson, T. A., Foster, R. S., Gardner, T. A., Cheng, L., & Koch, M. O. (2015). The changing reality of urothelial bladder cancer: should non-squamous variant histology be managed as a distinct clinical entity? *BJU Int*, *116*(2), 236-240.
- Monn, M. F., Kaimakliotis, H. Z., Pedrosa, J. A., Cary, K. C., Bihrlé, R., Cheng, L., & Koch, M. O. (2015). Contemporary bladder cancer: variant histology may be a significant driver of disease. *Urol Oncol*, *33*(1), 18 e15-18 e20.
- Mori, H., & Cardiff, R. D. (2016). Methods of Immunohistochemistry and Immunofluorescence: Converting Invisible to Visible. *Methods Mol Biol*, *1458*, 1-12.
- Moschini, M., Dell'Oglio, P., Luciano, R., Gandaglia, G., Soria, F., Mattei, A., Klatter, T., Damiano, R., Shariat, S. F., Salonia, A., Montorsi, F., Briganti, A., Colombo, R., & Gallina, A. (2017). Incidence and effect of variant histology on oncological outcomes in patients with bladder cancer treated with radical cystectomy. *Urol Oncol*, *35*(6), 335-341.
- Müller-Esterl, W. (2018). Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler - Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger, 3rd ed. Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Murakami, Y., & Saito, Y. (1990). Immunohistochemical interpretation of early epithelial disorders of pyriform sinus. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, *99*(10 Pt 1), 782-788.
- Murakami, Y., Yokoyama, T., Yokoyama, Y., Kanehiro, T., Uemura, K., Sasaki, M., Morifuji, M., & Sueda, T. (2003). Adenosquamous carcinoma of the pancreas: preoperative diagnosis and molecular alterations. *J Gastroenterol*, *38*(12), 1171-1175.
- Muramatsu, T., Hashimoto, S., Lee, M. W., Chung, C. K., Matsuzaki, K., Inoue, T., Noma, H., & Shimono, M. (2003). Oncocytic carcinoma arising in submandibular gland with immunohistochemical observations and review of the literature. *Oral Oncol*, *39*(2), 199-203.

- Nagle, R. B. (1994). A review of intermediate filament biology and their use in pathologic diagnosis. *Mol Biol Rep*, 19(1), 3-21.
- Nair, S. A., Nair, M. B., Jayaprakash, P. G., Rajalekshmy, T. N., Nair, M. K., & Pillai, M. R. (1997). Increased expression of cytokeratins 14, 18 and 19 correlates with tumor progression in the uterine cervix. *Pathobiology*, 65(2), 100-107.
- Nischt, R., Roop, D. R., Mehrel, T., Yuspa, S. H., Rentrop, M., Winter, H., & Schweizer, J. (1988). Aberrant expression during two-stage mouse skin carcinogenesis of a type I 47-kDa keratin, K13, normally associated with terminal differentiation of internal stratified epithelia. *Mol Carcinog*, 1(2), 96-108.
- Nishimata, S., Kato, K., Tanaka, M., Ijiri, R., Toyoda, Y., Kigasawa, H., Ohama, Y., Nakatani, Y., Notohara, K., Kobayashi, Y., Horie, H., Hoshika, A., & Tanaka, Y. (2005). Expression pattern of keratin subclasses in pancreatoblastoma with special emphasis on squamoid corpuscles. *Pathol Int*, 55(6), 297-302.
- Nobusawa, A., Sano, T., Negishi, A., Yokoo, S., & Oyama, T. (2014). Immunohistochemical staining patterns of cytokeratins 13, 14, and 17 in oral epithelial dysplasia including orthokeratotic dysplasia. *Pathol Int*, 64(1), 20-27.
- Noguchi, S., Sato, K., Yamamoto, G., Tonogi, M., Tanaka, Y., Tachikawa, T., Yamane, G. (2011). Expression of cytokeratin 13 and 17 in tongue squamous cell carcinoma and epithelial dysplasia. *Asian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 23(2), 53-58.
- Noguchi, M., Tsuno, H., Ishizaka, R., Fujiwara, K., Imaue, S., Tomihara, K., & Minamisaka, T. (2017). Primary peri-implant oral intra-epithelial neoplasia/carcinoma in situ: a case report considering risk factors for carcinogenesis. *Int J Implant Dent*, 3(1), 47.
- Ohkura, S., Kondoh, N., Hada, A., Arai, M., Yamazaki, Y., Sindoh, M., Takahashi, M., Matsumoto, I., & Yamamoto, M. (2005). Differential expression of the keratin-4, -13, -14, -17 and transglutaminase 3 genes during the development of oral squamous cell carcinoma from leukoplakia. *Oral Oncol*, 41(6), 607-613.
- Onishi, R., Sano, T., Nakamura, Y., Namiuchi, S., Sawada, S., Ihara, C., & Shimatsu, A. (1996). Ectopic adrenocorticotropin syndrome associated with undifferentiated carcinoma of the colon showing multidirectional neuroendocrine, exocrine, and squamous differentiation. *Virchows Arch*, 427(5), 537-541.
- Oono, Y., Fu, K., Nagahisa, E., Kuwata, T., Ikematsu, H., Yano, T., Kojima, T., Minashi, K., Fujii, S., Ochiai, A., & Kaneko, K. (2010). Primary gastric squamous cell carcinoma in situ originating from gastric squamous metaplasia. *Endoscopy*, 42 Suppl 2, E290-291.
- Oriolo, A. S., Wald, F. A., Ramsauer, V. P., & Salas, P. J. (2007). Intermediate filaments: a role in epithelial polarity. *Exp Cell Res*, 313(10), 2255-2264.
- Oshima, R. G. (2002). Apoptosis and keratin intermediate filaments. *Cell Death Differ*, 9(5), 486-492.
- Pai, T., Shet, T., Desai, S., Patil, A., Nair, N., Parmar, V., Gupta, S., Budrukkar, A., Sarin, R., & Badwe, R. (2016). Impact of Squamous Differentiation in Breast Carcinoma. *Int J Surg Pathol*, 24(6), 483-489.

- Pal, S. K., Sakamoto, K., Aragaki, T., Akashi, T., & Yamaguchi, A. (2013). The expression profiles of acidic epithelial keratins in ameloblastoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 115(4), 523-531.
- Pandey, S., Sølrand, T. M., Bjerkli, I. H., Sand, L. P., Petersen, F. C., Costea, D. E., Senguven, B., & Sapkota, D. (2021). Combined loss of expression of involucrin and cytokeratin 13 is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of mobile tongue. *Head Neck*, 43(11), 3374-3385.
- Parry, D. A., Strelkov, S. V., Burkhard, P., Aebi, U., & Herrmann, H. (2007). Towards a molecular description of intermediate filament structure and assembly. *Exp Cell Res*, 313(10), 2204-2216.
- Perez-Montiel, D., Wakely, P. E., Hes, O., Michal, M., & Suster, S. (2006). High-grade urothelial carcinoma of the renal pelvis: clinicopathologic study of 108 cases with emphasis on unusual morphologic variants. *Mod Pathol*, 19(4), 494-503.
- Pezzi, C. M., Patel-Parekh, L., Cole, K., Franko, J., Klimberg, V. S., & Bland, K. (2007) Characteristics and treatment of metaplastic breast cancer: analysis of 892 cases from the National Cancer Data Base. *Ann Surg Oncol*, 14(1), 166-73.
- Pires, F. R., Chen, S. Y., da Cruz Perez, D. E., de Almeida, O. P., & Kowalski, L. P. (2004). Cytokeratin expression in central mucoepidermoid carcinoma and glandular odontogenic cyst. *Oral Oncol*, 40(5), 545-551.
- Qin, Z., Buehler, M. J., & Kreplak, L. (2010). A multi-scale approach to understand the mechanobiology of intermediate filaments. *Journal of Biomechanics*, 43(1), 15-22.
- Rakha, E. A., Tan, P. H., Varga, Z., Tse, G. M., Shaaban, A. M., Climent, F., van Deurzen, C. H., Purnell, D., Dodwell, D., Chan, T., & Ellis, I. O. (2015). Prognostic factors in metaplastic carcinoma of the breast: a multi-institutional study. *Br J Cancer*, 112(2), 283-289.
- Ramirez-Miranda, A., Nakatsu, M. N., Zarei-Ghanavati, S., Nguyen, C. V., & Deng, S. X. (2011). Keratin 13 is a more specific marker of conjunctival epithelium than keratin 19. *Mol Vis*, 17, 1652-1661.
- Raspollini, M. R., Fambrini, M., Marchionni, M., Baroni, G., & Taddei, G. L. (2007). In situ adenocarcinoma and squamous carcinoma of uterine cervix. Pathological and immunohistochemical analysis with cytokeratin 13. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 134(2), 249-253.
- Reedy, E. A., Colombo-Burke, K. L., & Resau, J. H. (1990). Discrimination of cell types in primary transitional cell carcinoma by monoclonal anti-cytokeratin antibodies. *Pathobiology*, 58(6), 304-311.
- Rezniczek, G. A., de Pereda, J. M., Reipert, S., & Wiche, G. (1998). Linking integrin alpha6beta4-based cell adhesion to the intermediate filament cytoskeleton: direct interaction between the beta4 subunit and plectin at multiple molecular sites. *J Cell Biol*, 141(1), 209-225.
- Richard, G., De Laurenzi, V., Didona, B., Bale, S. J., & Compton, J. G. (1995). Keratin 13 point mutation underlies the hereditary mucosal epithelial disorder white sponge nevus. *Nat Genet*, 11(4), 453-455.
- Riedel, I., Czernobilsky, B., Lifschitz-Mercer, B., Roth, L. M., Wu, X. R., Sun, T. T., & Moll, R. (2001). Brenner tumors but not transitional cell carcinomas of the ovary show urothelial differentiation: immunohistochemical staining of urothelial markers, including cytokeratins and uroplakins. *Virchows Arch*, 438(2), 181-191.

- Rink, M., Robinson, B. D., Green, D. A., Cha, E. K., Hansen, J., Comploj, E., Margulis, V., Raman, J. D., Ng, C. K., Remzi, M., Bensalah, K., Kabbani, W., Haitel, A., Rioux-Leclercq, N., Guo, C. C., Chun, F. K., Kikuchi, E., Kassouf, W., Sircar, K., . . . Shariat, S. F. (2012). Impact of histological variants on clinical outcomes of patients with upper urinary tract urothelial carcinoma. *J Urol*, *188*(2), 398-404.
- Robert, A., Hookway, C., & Gelfand, V. I. (2016). Intermediate filament dynamics: What we can see now and why it matters. *Bioessays*, *38*(3), 232-243.
- Romañach, M. J., Azevedo, R. S., Carlos, R., de Almeida, O. P., & Pires, F. R. (2010). Clinicopathological and immunohistochemical features of oral spindle cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, *39*(4), 335-341.
- Romano, V., Raimondi, E., Bosco, P., Feo, S., Di Pietro, C., Leube, R. E., Troyanovsky, S. M., & Ceratto, N. (1992). Chromosomal mapping of human cytokeratin 13 gene (KRT13). *Genomics*, *14*(2), 495-497.
- Rubenwolf, P., Eder, F., Götz, S., Promm, M., & Rösch, W. H. (2021). Persistent urothelial differentiation changes in the reconstructed exstrophic bladder: Congenital or acquired dysfunction of the epithelial barrier? *J Pediatr Urol*, *17*(5), 632.e631-632.e637.
- Rugg, E., Magee, G., Wilson, N., Brandrup, F., Hamburger, J., & Lane, E. (1999). Identification of two novel mutations in keratin 13 as the cause of white sponge naevus. *Oral Dis*, *5*(4), 321-324.
- Rundhaug, J. E., Gimenez-Conti, I., Stern, M. C., Budunova, I. V., Kiguchi, K., Bol, D. K., Coghlan, L. G., Conti, C. J., DiGiovanni, J., Fischer, S. M., Winberg, L. D., & Slaga, T. J. (1997). Changes in protein expression during multistage mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog*, *20*(1), 125-136.
- Safadi, R. A., Abdullah, N. I., Alaaraj, R. F., Bader, D. H., Divakar, D. D., Hamasha, A. A., & Sughayer, M. A. (2019). Clinical and histopathologic prognostic implications of the expression of cytokeratins 8, 10, 13, 14, 16, 18 and 19 in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol*, *99*, 1-8.
- Sakamoto, K., Aragaki, T., Morita, K., Kawachi, H., Kayamori, K., Nakanishi, S., Omura, K., Miki, Y., Okada, N., Katsube, K., Takizawa, T., & Yamaguchi, A. (2011). Down-regulation of keratin 4 and keratin 13 expression in oral squamous cell carcinoma and epithelial dysplasia: a clue for histopathogenesis. *Histopathology*, *58*(4), 531-542.
- Santos, G. C., Zucoloto, S., Coelho, K. I., & Schmitt, F. C. (1992). [Colon adenocarcinoma with neuroendocrine and squamous cell differentiation. A case report]. (Adenocarcinoma de colon com diferenciacao neuro-endocrina e escamosa. Relato de caso). *Arq Gastroenterol*, *29*(2), 62-65.
- Sarbia, M., Verreet, P., Bittinger, F., Dutkowski, P., Heep, H., Willers, R., & Gabbert, H. E. (1997). Basaloid squamous cell carcinoma of the esophagus: diagnosis and prognosis. *Cancer*, *79*(10), 1871-1878.
- Schaafsma, H. E., & Ramaekers, F. C. (1994). Cytokeratin subtyping in normal and neoplastic epithelium: basic principles and diagnostic applications. *Pathol Annu*, *29 Pt 1*, 21-62.
- Schaafsma, H. E., Ramaekers, F. C., van Muijen, G. N., Lane, E. B., Leigh, I. M., Robben, H., Huijsmans, A., Ooms, E. C., & Ruiters, D. J. (1990). Distribution of cytokeratin polypeptides in human transitional cell carcinomas, with special emphasis on changing expression patterns during tumor progression. *Am J Pathol*, *136*(2), 329-343.

- Schaafsma, H. E., Ramaekers, F. C., van Muijen, G. N., Robben, H., Lane, E. B., Leigh, I. M., Ooms, E. C., Schalken, J. A., van Moorselaar, R. J., & Ruiter, D. J. (1991). Cytokeratin expression patterns in metastatic transitional cell carcinoma of the urinary tract. An immunohistochemical study comparing local tumor and autologous metastases. *Am J Pathol*, *139*(6), 1389-1400.
- Schaaij-Visser, T. B., Bremmer, J. F., Braakhuis, B. J., Heck, A. J., Slijper, M., van der Waal, I., & Brakenhoff, R. H. (2010). Evaluation of cornulin, keratin 4, keratin 13 expression and grade of dysplasia for predicting malignant progression of oral leukoplakia. *Oral Oncol*, *46*(2), 123-127.
- Schirren, C. G., Rütten, A., Kaudewitz, P., Diaz, C., McClain, S., & Burgdorf, W. H. (1997). Trichoblastoma and basal cell carcinoma are neoplasms with follicular differentiation sharing the same profile of cytokeratin intermediate filaments. *Am J Dermatopathol*, *19*(4), 341-350.
- Schüssler, M. H., Skoudy, A., Ramaekers, F., & Real, F. X. (1992). Intermediate filaments as differentiation markers of normal pancreas and pancreas cancer. *Am J Pathol*, *140*(3), 559-568.
- Schweizer, J., Bowden, P. E., Coulombe, P. A., Langbein, L., Lane, E. B., Magin, T. M., Maltais, L., Omary, M. B., Parry, D. A., Rogers, M. A., & Wright, M. W. (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol*, *174*(2), 169-174.
- Scosyrev, E., Ely, B. W., Messing, E. M., Speights, V. O., Grossman, H. B., Wood, D. P., de Vere White, R. W., Vogelzang, N. J., Trump, D. L., Natale, R. B., Tangen, C. M., Crawford, E. D., & Thompson, I. M. (2011). Do mixed histological features affect survival benefit from neoadjuvant platinum-based combination chemotherapy in patients with locally advanced bladder cancer? A secondary analysis of Southwest Oncology Group-Directed Intergroup Study (S8710). *BJU Int*, *108*(5), 693-699.
- Sefik, E., Celik, S., Basmaci, I., Yarimoglu, S., Bozkurt, I. H., Yonguc, T., & Gunlusoy, B. (2018). Effect of variant histology presence and squamous differentiation on oncological results and patient's survival after radical cystectomy. *Arch Ital Urol Androl*, *90*(3), 172-175.
- Shah, R. B., Montgomery, J. S., Montie, J. E., & Kunju, L. P. (2013). Variant (divergent) histologic differentiation in urothelial carcinoma is under-recognized in community practice: impact of mandatory central pathology review at a large referral hospital. *Urol Oncol*, *31*(8), 1650-1655.
- Shapur, N. K., Katz, R., Pode, D., Shapiro, A., Yutkin, V., Pizov, G., Appelbaum, L., Zorn, K. C., Duvdevani, M., Landau, E. H., & Gofrit, O. N. (2011). Is radical cystectomy mandatory in every patient with variant histology of bladder cancer. *Rare Tumors*, *3*(2), e22.
- Shergill, I. S., Shergill, N. K., Arya, M., & Patel, H. R. (2004). Tissue microarrays: a current medical research tool. *Curr Med Res Opin*, *20*(5), 707-712.
- Shibuya, Y., Zhang, J., Yokoo, S., Umeda, M., & Komori, T. (2003). Constitutional mutation of keratin 13 gene in familial white sponge nevus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, *96*(5), 561-565.
- Simon, R., Mirlacher, M., & Sauter, G. (2004). Tissue microarrays. *Biotechniques*, *36*(1), 98-105.
- Skacel, M., Skilton, B., Pettay, J. D., & Tubbs, R. R. (2002). Tissue microarrays: a powerful tool for high-throughput analysis of clinical specimens: a review of the method with validation data. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, *10*(1), 1-6.

- Smedts, F., Ramaekers, F., Link, M., Lauerova, L., Troyanovsky, S., Schijf, C., & Vooijs, G. P. (1994). Detection of keratin subtypes in routinely processed cervical tissue: implications for tumour classification and the study of cervix cancer aetiology. *Virchows Arch*, 425(2), 145-155.
- Smith, T. A., Strelkov, S. V., Burkhard, P., Aebi, U., & Parry, D. A. (2002). Sequence comparisons of intermediate filament chains: evidence of a unique functional/structural role for coiled-coil segment 1A and linker L1. *J Struct Biol*, 137(1-2), 128-145.
- Soave, A., Schmidt, S., Dahlem, R., Minner, S., Engel, O., Kluth, L. A., John, L. M., Hansen, J., Schmid, M., Sauter, G., Shariat, S. F., Fisch, M., & Rink, M. (2015). Does the extent of variant histology affect oncological outcomes in patients with urothelial carcinoma of the bladder treated with radical cystectomy? *Urol Oncol*, 33(1), 21 e21-21 e29.
- Sokolova, A. V., Kreplak, L., Wedig, T., Mucke, N., Svergun, D. I., Herrmann, H., Aebi, U., & Strelkov, S. V. (2006). Monitoring intermediate filament assembly by small-angle x-ray scattering reveals the molecular architecture of assembly intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(44), 16206-16211.
- Southern, S. A., McDicken, I. W., & Herrington, C. S. (2001). Loss of cytokeratin 14 expression is related to human papillomavirus type and lesion grade in squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Hum Pathol*, 32(12), 1351-1355.
- Southgate, J., Harnden, P., & Trejdosiewicz, L. K. (1999). Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications. *Histol Histopathol*, 14(2), 657-664.
- Southgate, J., Varley, C. L., Garthwaite, M. A., Hinley, J., Marsh, F., Stahlschmidt, J., Trejdosiewicz, L. K., & Eardley, I. (2007). Differentiation potential of urothelium from patients with benign bladder dysfunction. *BJU Int*, 99(6), 1506-1516.
- Steinert, P. M., Parry, D. A., Racoosin, E. L., Idler, W. W., Steven, A. C., Trus, B. L., & Roop, D. R. (1984). The complete cDNA and deduced amino acid sequence of a type II mouse epidermal keratin of 60,000 Da: analysis of sequence differences between type I and type II keratins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(18), 5709-5713.
- Stratton, M. R. (2011). Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science*, 331(6024), 1553-1558.
- Strelkov, S. V., Herrmann, H., & Aebi, U. (2003). Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays*, 25(3), 243-251.
- Sun, T. T., Tseng, S. C., Huang, A. J., Cooper, D., Schermer, A., Lynch, M. H., Weiss, R., & Eichner, R. (1985). Monoclonal antibody studies of mammalian epithelial keratins: a review. *Ann N Y Acad Sci*, 455, 307-329.
- Suo, Z., Holm, R., & Nesland, J. M. (1993). Squamous cell carcinomas. An immunohistochemical study of cytokeratins and involucrin in primary and metastatic tumours. *Histopathology*, 23(1), 45-54.
- Takashima, M., Kawachi, H., Yamaguchi, T., Nakajima, Y., Kitagaki, K., Sekine, M., Iida, T., Takemura, K., Kawano, T., & Eishi, Y. (2012). Reduced expression of cytokeratin 4 and 13 is a valuable marker for histologic grading of esophageal squamous intraepithelial neoplasia. *J Med Dent Sci*, 59(1), 17-28.

- Takita, J., Kato, H., Miyazaki, T., Nakajima, M., Fukai, Y., Masuda, N., Manda, R., Fukuchi, M., & Kuwano, H. (2005). Primary squamous cell carcinoma of the stomach: a case report with immunohistochemical and molecular biologic studies. *Hepatogastroenterology*, *52*(63), 969-974.
- Tang, Q., Xiong, G., Li, X., Fang, D., Xi, C., Zhang, L., Yang, K., Yao, L., Zhang, C., Yu, W., He, Q., Gong, K., He, Z., & Zhou, L. (2016). The prognostic impact of squamous and glandular differentiation for upper tract urothelial carcinoma patients after radical nephroureterectomy. *World J Urol*, *34*(6), 871-877.
- Tanière, P., Martel-Planche, G., Maurici, D., Lombard-Bohas, C., Scoazec, J. Y., Montesano, R., Berger, F., & Hainaut, P. (2001). Molecular and clinical differences between adenocarcinomas of the esophagus and of the gastric cardia. *Am J Pathol*, *158*(1), 33-40.
- Taqi, S. A., Sami, S. A., Sami, L. B., & Zaki, S. A. (2018). A review of artifacts in histopathology. *J Oral Maxillofac Pathol*, *22*(2), 279.
- Terrinoni, A., Rugg, E. L., Lane, E. B., Melino, G., Felix, D. H., Munro, C. S., & McLean, W. H. (2001). A novel mutation in the keratin 13 gene causing oral white sponge nevus. *J Dent Res*, *80*(3), 919-923.
- Tong, Y., Tucker, S. B., & Smith, M. A. (1998). Expression of Hras-p21 and keratin K13 in UVR-induced skin tumors in Sencar mice. *J Toxicol Environ Health A*, *53*(6), 439-453.
- Torhorst, J., Bucher, C., Kononen, J., Haas, P., Zuber, M., Köchli, O. R., Mross, F., Dieterich, H., Moch, H., Mihatsch, M., Kallioniemi, O. P., & Sauter, G. (2001). Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*, *159*(6), 2249-2256.
- Tray, N., Taff, J., & Adams, S. (2019). Therapeutic landscape of metaplastic breast cancer. *Cancer Treat Rev*, *79*, 101888.
- Turker, P., Bostrom, P. J., Wroclawski, M. L., van Rhijn, B., Kortekangas, H., Kuk, C., Mirtti, T., Fleshner, N. E., Jewett, M. A., Finelli, A., Kwast, T. V., Evans, A., Sweet, J., Laato, M., & Zlotta, A. R. (2012). Upstaging of urothelial cancer at the time of radical cystectomy: factors associated with upstaging and its effect on outcome. *BJU Int*, *110*(6), 804-811.
- Ueno, T., Hoshii, Y., Cui, D., Kawano, H., Gondo, T., Takahashi, M., & Ishihara, T. (2003). Immunohistochemical study of cytokeratins in amyloid deposits associated with squamous cell carcinoma and dysplasia in the oral cavity, pharynx and larynx. *Pathol Int*, *53*(5), 265-269.
- Uhlen, M., Bandrowski, A., Carr, S., Edwards, A., Ellenberg, J., Lundberg, E., Rimm, D. L., Rodriguez, H., Hiltke, T., Snyder, M., & Yamamoto, T. (2016). A proposal for validation of antibodies. *Nat Methods*, *13*(10), 823-827.
- Vaidya, M. M., Borges, A. M., Pradhan, S. A., Rajpal, R. M., & Bhisey, A. N. (1989). Altered keratin expression in buccal mucosal squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, *18*(5), 282-286.
- van Bodegraven, E. J., & Etienne-Manneville, S. (2021). Intermediate Filaments from Tissue Integrity to Single Molecule Mechanics. *Cells*, *10*(8).
- van Bommel, P. F., Kenemans, P., Helmerhorst, T. J., Gallee, M. P., & Ivanyi, D. (1994). Expression of cytokeratin 10, 13, and involucrin as prognostic factors in low stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer*, *74*(8), 2314-2320.
- van der Horst, G., Bos, L., & van der Pluijm, G. (2012). Epithelial plasticity, cancer stem cells, and the tumor-supportive stroma in bladder carcinoma. *Mol Cancer Res*, *10*(8), 995-1009.

- van der Velden, L. A., Schaafsma, H. E., Manni, J. J., Ruiter, D. J., Ramaekers, F. C., & Kuijpers, W. (1997). Cytokeratin and vimentin expression in normal epithelium and squamous cell carcinomas of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, *254*(8), 376-383.
- van Dorst, E. B., van Muijen, G. N., Litvinov, S. V., & Fleuren, G. J. (1998). The limited difference between keratin patterns of squamous cell carcinomas and adenocarcinomas is explicable by both cell lineage and state of differentiation of tumour cells. *J Clin Pathol*, *51*(9), 679-684.
- van Muijen, G. N., Ruiter, D. J., Franke, W. W., Achtstätter, T., Haasnoot, W. H., Ponec, M., & Warnaar, S. O. (1986). Cell type heterogeneity of cytokeratin expression in complex epithelia and carcinomas as demonstrated by monoclonal antibodies specific for cytokeratins nos. 4 and 13. *Exp Cell Res*, *162*(1), 97-113.
- van Muijen, G. N., Warnaar, S. O., & Ponec, M. (1987). Differentiation-related changes of cytokeratin expression in cultured keratinocytes and in fetal, newborn, and adult epidermis. *Exp Cell Res*, *171*(2), 331-345.
- Vaughan, W. P., Straus, F. H., 2nd, & Paloyan, D. (1977). Squamous carcinoma of the stomach after luetic linitis plastica. *Gastroenterology*, *72*(5 Pt 1), 945-948.
- Vecchioli Scaldazza, C., & Morosetti, C. (1992). [Squamous metaplasia as a prognostic factor in urothelial carcinoma of the bladder]. (La metaplasia squamosa come fattore prognostico nel carcinoma uroteliale della vescica.) *Minerva Urol Nefrol*, *44*(2), 97-100.
- Verma, N., & Tikku, A. B. (2017). Significance and nature of bystander responses induced by various agents. *Mutat Res Rev Mutat Res*, *773*, 104-121.
- Voduc, D., Kenney, C., & Nielsen, T. O. (2008) Tissue microarrays in clinical oncology. *Semin Radiat Oncol*, *18*(2), 89-97.
- Voong, K. R., Davison, J., Pawlik, T. M., Uy, M. O., Hsu, C. C., Winter, J., Hruban, R. H., Laheru, D., Rudra, S., Swartz, M. J., Nathan, H., Edil, B. H., Schulick, R., Cameron, J. L., Wolfgang, C. L., & Herman, J. M. (2010). Resected pancreatic adenosquamous carcinoma: clinicopathologic review and evaluation of adjuvant chemotherapy and radiation in 38 patients. *Hum Pathol*, *41*(1), 113-122.
- Voskuil, J. (2014). Commercial antibodies and their validation. *F1000Res*, *3*, 232.
- Wagner, O. I., Rammensee, S., Korde, N., Wen, Q., Leterrier, J. F., & Janmey, P. A. (2007). Softness, strength and self-repair in intermediate filament networks. *Exp Cell Res*, *313*(10), 2228-2235.
- Wang, N., Butler, J. P., & Ingber, D. E. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, *260*(5111), 1124-1127.
- Waschke, J. (2008). The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol*, *130*(1), 21-54.
- Wasco, M. J., Daignault, S., Zhang, Y., Kunju, L. P., Kinnaman, M., Braun, T., Lee, C. T., & Shah, R. B. (2007). Urothelial carcinoma with divergent histologic differentiation (mixed histologic features) predicts the presence of locally advanced bladder cancer when detected at transurethral resection. *Urology*, *70*(1), 69-74.
- Waseem, A., Alam, Y., Dogan, B., White, K. N., Leigh, I. M., & Waseem, N. H. (1998). Isolation, sequence and expression of the gene encoding human keratin 13. *Gene*, *215*(2), 269-279.

- Werner, M., Chott, A., Fabiano, A., & Battifora, H. (2000). Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*, 24(7), 1016-1019.
- Whipple, M. E., Mendez, E., Farwell, D. G., Agoff, S. N., & Chen, C. (2004). A genomic predictor of oral squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*, 114(8), 1346-1354.
- Whitley, R. J., & Ain, K. B. (2004). Thyroglobulin: a specific serum marker for the management of thyroid carcinoma. *Clin Lab Med*, 24(1), 29-47.
- Wiche, G. (1998). Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci*, 111 (Pt 17), 2477-2486.
- Wils, L. J., Poell, J. B., Evren, I., Koopman, M. S., Brouns, E., de Visscher, J., Brakenhoff, R. H., & Bloemena, E. (2020). Incorporation of differentiated dysplasia improves prediction of oral leukoplakia at increased risk of malignant progression. *Mod Pathol*, 33(6), 1033-1040.
- Wine, Y., Boutz, D. R., Lavinder, J. J., Miklos, A. E., Hughes, R. A., Hoi, K. H., Jung, S. T., Horton, A. P., Murrin, E. M., Ellington, A. D., Marcotte, E. M., & Georgiou, G. (2013). Molecular deconvolution of the monoclonal antibodies that comprise the polyclonal serum response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(8), 2993-2998.
- Wine, Y., Horton, A. P., Ippolito, G. C., & Georgiou, G. (2015). Serology in the 21st century: the molecular-level analysis of the serum antibody repertoire. *Curr Opin Immunol*, 35, 89-97.
- Wood, L. D., Parsons, D. W., Jones, S., Lin, J., Sjöblom, T., Leary, R. J., Shen, D., Boca, S. M., Barber, T., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Dezso, Z., Ustyanksky, V., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Karchin, R., Wilson, P. A., Kaminker, J. S., . . . Vogelstein, B. (2007). The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*, 318(5853), 1108-1113.
- Worst, T. S., Reiner, V., Gabriel, U., Weiß, C., Erben, P., Martini, T., & Bolenz, C. (2014). IL1RN and KRT13 Expression in Bladder Cancer: Association with Pathologic Characteristics and Smoking Status. *Adv Urol*, 2014, 184602.
- Wu, J., Liang, C., Chen, M., & Su, W. (2016). Association between tumor-stroma ratio and prognosis in solid tumor patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 7(42), 68954-68965.
- Xu, E. S., Yang, M. H., Liu, C. Y., Liu, K. W., Yang, T. T., Chou, T. Y., Hwang, T. Z., & Hsu, C. T. (2018). Decreasing cytokeratin 17 expression in head and neck cancer predicts nodal metastasis and poor prognosis: The first evidence. *Clin Otolaryngol*, 43(4), 1010-1018.
- Xu, H., Xie, L., Liu, X., Zhang, Y., Shen, Z., Chen, T., Qiu, X., Sha, N., Xing, C., Wu, Z., Hu, H., & Wu, C. (2017). Impact of squamous and/or glandular differentiation on recurrence and progression following transurethral resection for non-muscle invasive urothelial carcinoma of bladder. *Oncol Lett*, 14(3), 3522-3528.
- Xylinas, E., Rink, M., Robinson, B. D., Lotan, Y., Babjuk, M., Brisuda, A., Green, D. A., Kluth, L. A., Pycha, A., Fradet, Y., Faison, T., Lee, R. K., Karakiewicz, P. I., Zerbib, M., Scherr, D. S., & Shariat, S. F. (2013). Impact of histological variants on oncological outcomes of patients with urothelial carcinoma of the bladder treated with radical cystectomy. *Eur J Cancer*, 49(8), 1889-1897.

- Yagyuu, T., Obayashi, C., Ueyama, Y., Takano, M., Tanaka, Y., Kawaguchi, M., Takeda, M., Kasai, T., & Kiritani, T. (2015). Multivariate analyses of Ki-67, cytokeratin 13 and cytokeratin 17 in diagnosis and prognosis of oral precancerous lesions. *J Oral Pathol Med*, 44(7), 523-531.
- Yamamoto, O., & Yasuda, H. (1999). An immunohistochemical study of the apocrine type of cutaneous mixed tumors with special reference to their follicular and sebaceous differentiation. *J Cutan Pathol*, 26(5), 232-241.
- Yamashita, S. (2007). Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry. *Prog Histochem Cytochem*, 41(3), 141-200.
- Yanagawa, T., Yoshida, H., Yamagata, K., Onizawa, K., Tabuchi, K., Koyama, Y., Iwasa, S., Shimoyamada, H., Harada, H., & Omura, K. (2007). Loss of cytokeratin 13 expression in squamous cell carcinoma of the tongue is a possible sign for local recurrence. *J Exp Clin Cancer Res*, 26(2), 215-220.
- Yang, M. H., Yen, C. C., Chen, P. M., Wang, W. S., Chang, Y. H., Huang, W. J., Fan, F. S., Chiou, T. J., Liu, J. H., & Chen, K. K. (2002). Prognostic-factors-based risk-stratification model for invasive urothelial carcinoma of the urinary bladder in Taiwan. *Urology*, 59(2), 232-238; discussion 238-239.
- Yin, L., Li, Q., Mrdenovic, S., Chu, G. C., Wu, B. J., Bu, H., Duan, P., Kim, J., You, S., Lewis, M. S., Liang, G., Wang, R., Zhou, H. E., & Chung, L. W. K. (2022). KRT13 promotes stemness and drives metastasis in breast cancer through a plakoglobin/c-Myc signaling pathway. *Breast Cancer Res*, 24(1), 7.
- Yoon, S., & Leube, R. E. (2019). Keratin intermediate filaments: intermediaries of epithelial cell migration. *Essays Biochem*, 63(5), 521-533.
- Yu, J., Li, G., Wang, A., Luo, Q., Liu, Z., Niu, Y., & Mei, Y. (2019). Impact of squamous differentiation on intravesical recurrence and prognosis of patients with upper tract urothelial carcinoma. *Ann Transl Med*, 7(16), 377.
- Zargar-Shoshtari, K., Sverrisson, E. F., Sharma, P., Gupta, S., Poch, M. A., Pow-Sang, J. M., Spiess, P. E., & Sexton, W. J. (2016). Clinical Outcomes After Neoadjuvant Chemotherapy and Radical Cystectomy in the Presence of Urothelial Carcinoma of the Bladder With Squamous or Glandular Differentiation. *Clin Genitourin Cancer*, 14(1), 82-88.

9. Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Guido Sauter für die wertvollen Einblicke in das Fach der Pathologie und den stets konstruktiven und motivierenden Austausch.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Ronald Simon und Frau Dr. Martina Kluth für die wissenschaftliche Betreuung, sowie Laura Behm, Maren Eisenberg und Inge Brandt für ihre Unterstützung im Labor.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Lore und Gerald Ullmann, ohne deren Unterstützung diese Promotionsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zu guter Letzt danke ich auch meinen Freunden in alter und neuer Heimat, die mir stets beiseite gestanden und mich moralisch unterstützt haben.

10. Lebenslauf

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

11. Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Unterschrift: