

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Prof. Dr. med. Guido Sauter

Expression von Desmoglein 3 (Dsg3) in menschlichen Tumoren und Normalgeweben: Eine Tissue-Microarray-Studie an 15.869 Tumoren

Dissertation

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

vorgelegt von:

Ahmad Azem

aus Kfar-Saba (Israel)

Hamburg 2024

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 15.01.2025**

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

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

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

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	<i>Cadherin Superfamilie</i>	4
1.1.1	Desmosomale Cadherine	5
1.1.2	Desmogleine	7
1.2	<i>Desmoglein 3</i>	7
1.2.1	Proteinstruktur und Aufbau	
1.2.2	Funktion und Bedeutung in Normalgeweben	11
1.2.3	Klinische Bezüge.....	15
1.2.4	Bedeutung im Tumorgewebe	15
1.2.5	Klinische Bedeutung in der pathologischen Diagnostik	21
1.3	<i>Zielsetzung der Vorliegenden Arbeit</i>	22
2	Material und Methoden	23
2.1	<i>Tissue-Microarray Methode</i>	23
2.2	<i>TMA's für die Desmoglein 3 Studie</i>	32
2.3	<i>Immunhistochemie</i>	38
2.4	<i>Desmoglein 3 Immunhistochemie</i>	42
2.5	<i>Statistik</i>	44
3	Ergebnisse	45
3.1	<i>Technische Aspekte</i>	45
3.2	<i>Desmoglein 3 in Normalgeweben</i>	45
3.3	<i>Desmoglein 3 in Tumoren</i>	53
4	Diskussion	69
5	Zusammenfassung	75
6	Abstract	76
7	Abkürzungsverzeichnis	77
8	Literaturverzeichnis	78
9	Danksagung	92
10	Lebenslauf	93
11	Eidesstattliche Erklärung	94

1 Einleitung

1.1 Cadherin Superfamilie

Desmoglein 3 ist ein Transmembran-Glykoprotein, welches zu der Superfamilie der Cadherine gehört. Es kommt vorzugsweise in Desmosomen von Keratinozyten in Plattenepithelien vor (Amagai et al., 1991; Hanakawa et al., 2002).

Cadherin ist der Oberbegriff einer Familie von transmembranen Zelladhäsionsproteinen, welche kalziumabhängig Zell-Zell-Kontakte durch homophile Dimerisierung ausbilden. Die Cadherin-Superfamilie umfasst über hundert Mitglieder, von denen allein im Menschen über 80 vorkommen (Hulpiau und van Roy, 2009).

Die Cadherine lassen sich im Allgemeinen hinsichtlich besonderer Strukturmerkmale in vier verschiedene Gruppen unterteilen (Angst et al., 2001; Nollet et al., 2000). Die erste Gruppe bilden die klassischen Cadherine wie zum Beispiel E-Cadherin, N-Cadherin sowie P- und VE-Cadherine. Die Benennung der unterschiedlichen klassischen Cadherine erfolgt nach dem Gewebe, in welchem sie zuerst entdeckt wurden. Die zweite Gruppe sind die „nicht-klassischen“ Cadherine oder die sogenannten desmosomalen Cadherine, welche in Desmosomen vorkommen (Amagai et al., 1991). Als dritte große und wenig erforschte Unterfamilie der Cadherine ist die Protocadherin-Familie, die nur in Wirbeltieren vorkommt und hauptsächlich im Nervensystem vor allem im Gehirn exprimiert wird (Gumbiner, 2005; Nollet et al., 2000; Yagi und Takeichi, 2000). Die vierte Gruppe von Cadherinen umfasst alle anderen identifizierten Cadherine, welche sich nicht den drei großen Gruppen zuordnen lassen (Mancini et al., 2020; Nollet et al., 2000).

Neben der Zelladhäsion umfasst das Funktionsspektrum auch die Beteiligung an Signalkaskaden, das Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Zelltod, Zellproliferation sowie Zellpolarisierung (Gumbiner, 2005; Saito et al., 2012; Vleminckx und Kemler, 1999; Wheelock und Johnson, 2003). Gemeinsam sind allen Cadherinen eine extrazelluläre Cadherindomäne, welche die charakteristischen Cadherin-Motive auch als Ektodomänen (EC-Motive) genannt beinhaltet, eine Transmembrandomäne und eine N-terminale zytoplasmatische Domäne. Sowohl die Anzahl der extrazellulären Cadherin-Domänen ("Cadherin-Motive") als auch der Aufbau des zytoplasmatischen Bereichs variieren von einer Unterfamilie zur anderen (Ivanov et al., 2001; Mancini et al., 2020) (Abbildung 1).

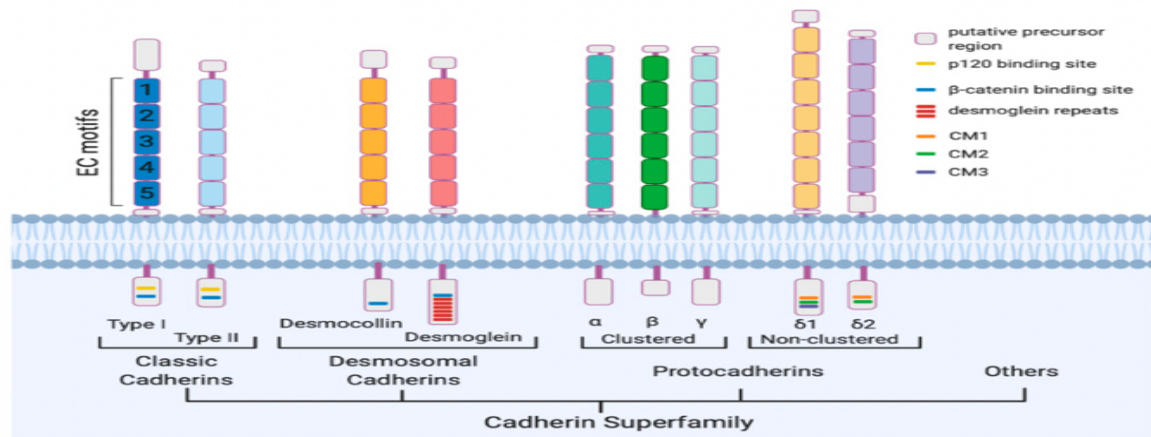


Abbildung 1: **Schematische Darstellung der Cadherin-Superfamilie.** Alle Cadherine haben "Cadherin-Motive" oder extrazelluläre Cadherin (EC)-Motive in ihrer extrazellulären Domäne. Die Anzahl der EC-Motive variiert von einer Unterfamilie zur anderen. Verwendet und modifiziert (nach Mancini et al., 2020).

1.1 Cadherin Superfamilie

1.1.1 Desmosomale Cadherine

Desmosomale Cadherine sind Transmembranproteine, genauer gesagt Typ 1 integrale Membranglykoproteine der Desmosomen, deren Adhäsionsfähigkeit von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig ist (Dusek et al., 2007; Garrod und Chidgey, 2008; Getsios et al., 2004b; Tselepis et al., 1998). Die Existenz von sieben desmosomalen Cadherinen aus zwei Unterfamilien benannt als Desmogleine und Desmocolline ist bislang bekannt (Tsang et al. 2010, Buxton et al., 1993).

Während die Familie der Desmocollinen aus drei Mitgliedern (DSC 1, 2 und 3) besteht, die jeweils durch alternatives Spleißen des 16 Exons zwei Isoformen „a“ und „b“ aufweisen, (Buxton et al., 1993; Collins et al., 1991; Greenwood et al., 1997) beinhaltet die Familie der Desmogleine vier Vertreter (Dsg 1-4) (O. J. Harrison et al., 2016; Waschke, 2008). Alle desmosomalen Cadherin-Gene sind direkt nebeneinander auf dem Chromosom 18q12.1 lokalisiert (Frank et al., 2001; Hunt et al., 1999), wobei die Transkriptionsrichtung der DSC- und DSG-Gene entgegengesetzt ist (Cowley et al., 1997) (Abbildung. 2). Die menschlichen Desmoglein-Gene umfassen entweder 15 oder 16 Exons (Frank et al., 2001; Hunt et al., 2001; Silos et al., 1996). Die menschlichen Desmocollin-Gene umfassen 17 Exons (Cserhalmi-Friedman et al., 2001; Whittock et al., 2000).

Wichtige Erkenntnisse über die Regulierung der desmosomalen Adhäsion kamen auch aus der Dermatologie, da nachgewiesen wurde, dass Autoantikörper bei Patienten, die an den autoimmunen, blasenbildenden Hautkrankheiten Pemphigus vulgaris (PV) und Pemphigus foliaceus (PF) leiden gegen Ca^{2+} -empfindliche Zelloberflächenproteine in Desmosomen gerichtet sind (Eyre und Stanley, 1988, 1987; Jones et al., 1986; Kárpáti et al., 1993), die als die desmosomalen Cadherine Desmoglein 1 (Dsg1) und Dsg3 identifiziert wurden (Amagai et al. 1991). Der endgültige Durchbruch war die Erkenntnis, dass Autoantikörper gegen die extrazellulären Domänen von Dsg3 und Dsg1 in PV und in PF pathogen sind (Amagai et al., 1995, 1994, 1992). Daher wurden Autoantikörper von Pemphigus-Patienten verwendet, um die Mechanismen zu charakterisieren, die an der Regulierung der desmosomalen Adhäsion beteiligt sind.

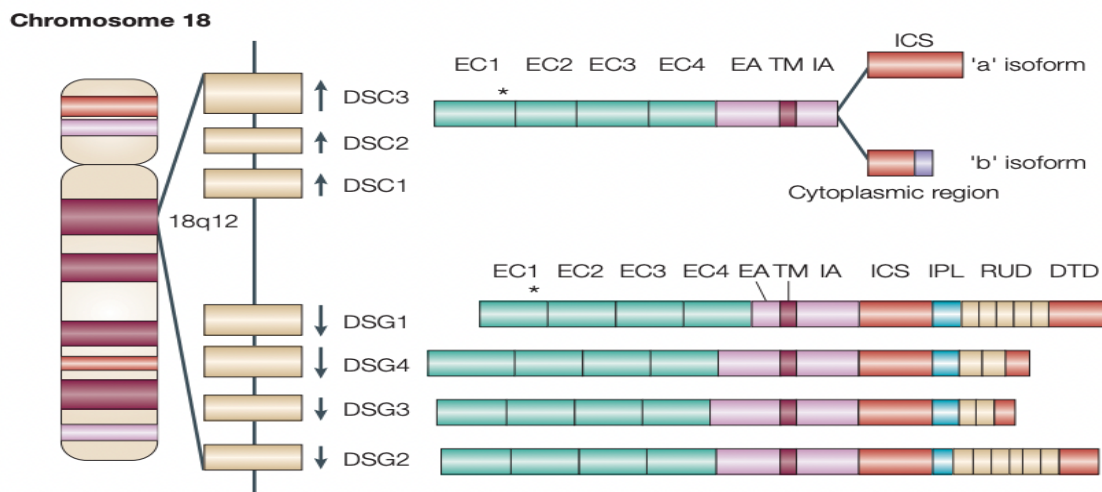


Abbildung 2: **Die genomische und molekulare Organisation der menschlichen desmosomalen Cadherine.** Die vier Desmoglein- (DSG1-4) und drei Desmocollin-Gene (DSC1-3) befinden sich auf dem Chromosom 18q12.1. Diese integralen Membran-Glykoproteine bestehen aus vier hoch konservierten extrazellulären Domänen (EC1-4), einem variablen extrazellulären Anker (EA), einer einzelnen Transmembrandomäne (TM), einem intrazellulären Anker (IA) und zusätzlichen zytoplasmatischen Domänen. EC1 enthält eine Aminosäuresequenz zur Erkennung der Zelladhäsion (CAR), die zur adhäsiven Funktion der desmosomalen Cadherine beiträgt. Die Desmocollin-'a'- und 'b'-Isoformen enthalten jeweils eine intrazelluläre Cadherin-typische Sequenz (ICS), die auch in den Desmogleinen vorhanden ist, und eine kürzere zytoplasmatische Region, die einzigartige Sequenzen enthält (in lila dargestellt). Die Desmogleine besitzen eine ausgedehnte zytoplasmatische Region, die eine intrazelluläre prolinreiche Linker-Domäne (IPL), eine variable Anzahl von Domänen mit wiederholten Einheiten (RUD) und eine desmogleinspezifische terminale Domäne (DTD) umfasst. Verwendet und modifiziert nach (Getsios et al., 2004b).

1.1.2 Desmogleine

Die Geschichte der Desmogleine beginnt mit der Entdeckung der Desmosomen durch Elektronenmikroskopie und der Beobachtung, dass sie eine Rolle bei der Adhäsion von Keratinozyten spielen (Amagai und Stanley, 2012). Die biochemische Charakterisierung von Desmosomen aus Epithelien einer Rinderschnauze lieferte die ersten Erkenntnisse über die Desmogleine, die ursprünglich als ein Transmembran-Glykoprotein der Desmosomen identifiziert wurden (Gorbsky und Steinberg, 1981; Schmelz et al., 1986). Ferner haben einige DNA-Klonierungsstudien gezeigt, dass sie eine eigene Genfamilie bilden (Buxton und Magee, 1992; Koch et al., 1992, 1991, 1990). Die Desmogleine unterscheiden sich im Wesentlichen von anderen Cadherinen dadurch, dass sie eine zusätzliche carboxyterminale lokalisierte Domäne bestehend aus repetetiver Sequenz aus 29 Aminosäuren besitzen (Buxton, et al. 1993).

1.2 Desmoglein 3

Dsg3, pemphigus vulgaris antigen (PVA) oder Cadherin family member 6 (CDHF6) genannt ist ein der Cadherinfamilie angehörendes Zelladhäsionsmolekül, welches in den Desmosomen der Keratinozyten vorkommt und kalziumabhängig die Zellhaftung vermittelt (Kárpáti et al., 1993; Koga et al., 2013). Die gezielte Forschung des im Jahr 1991 erstmals beschriebenen Dsg3, welches zunächst nur als PV-Antigen bezeichnet wurde und eine Molekularmasse von ca. 130 kDa hat, begann mit dessen Identifikation als Autoantigen in der blasenbildenden Hauterkrankung Pemphigus vulgaris (Amagai et al., 1991; Arnold 2014). Das für Dsg3 codierende Gen ist auf Chromosom 18q12.1 lokalisiert (Frank et al., 2001). Die Expression von Dsg3 ist hauptsächlich auf mehrschichtige Epithelien beschränkt. In der menschlichen Epidermis wird Dsg3 physiologisch in den basalen Keratinozyten exprimiert genauer gesagt im Stratum basale und dem Stratum Spinosum (Amagai et al., 1996; Arnemann et al., 1993; Garrod et al., 2002a; Green und Gaudry, 2000; Tsang et al., 2010; Getsios et al., 2004b). In der oralen Mukosa hingegen wird Dsg3 in allen vitalen Schichten exprimiert, insbesondere in den oberen zwei Dritteln (Mahoney et al., 1999a; Kempf, 2020).

1.2.1 Proteinstruktur und Aufbau

Desmoglein 3 besteht aus einem extrazellulären, transmembranem und intrazellulärem Bereich (Getsios et al., 2004b, Waschke, 2008). Es wird als Vorläuferprotein mit einem Propeptid bestehend aus 26 Aminosäuren synthetisiert und durch die Abspaltung des Propeptids geht Dsg3 in das aktive Adhäsionsmolekül über (Amagai et al. 1995). Die aktive Form von Dsg3 (Position 50-999 Aminosäuren) enthält das unglykosylierte Peptid und beinhaltet 950 Aminosäuren (Wan, 2016).

Die ersten 23 Aminosäuren sind das Signalpeptid gefolgt von einer 566 Aminosäuren großen extrazellulären Domäne (ECD), die vier Cadherin-ähnliche Domänen enthält, einem 25 Aminosäuren großen Transmembransegment und einer 359 Aminosäuren großen zytoplasmatischen Domäne. Die für Dsg3 charakteristische extrazelluläre Domäne dem NH₂-Terminus zugewandt auch Ektodomäne (ectodomain, EC) genannt, enthält 566 Aminosäuren (Position 50-615 Aminosäuren) und wird aus vier gleich großen repetitiven Einheiten (extracellular cadherin repeats, EC1 (NH₂-Terminus) – EC4 (COOH-Terminus)) gebildet und einem extrazellulären Anker EA (exextracellular anchor, auch EC5 genannt). Die fünf Motive (EC1-EC4, EA) im extrazellulären Bereich werden jeweils von ungefähr 100 Aminosäuren Umfang gebildet. Die Transmembranregion von Dsg3 umfasst 25 Aminosäuren (Position 616-640 As) und die zytoplasmatische Domäne enthält 359 Aminosäuren (Position 641-999 As) (Wan, 2016).

Im extrazellulären Bereich spielen Ca²⁺- Bindungsstellen, welche zwischen den einzelnen Cadherin-Domänen liegen bei der Interaktion desmosomaler Cadherine eine große Rolle. Die vier Verbindungen zwischen den extrazellulären Domänen sind durch drei Kalziumbindungsstellen, die aus den konservierten Sequenzmotiven DXD, DRE und DXNDNAPXF gebildet werden, gekennzeichnet (Izaguirre und Casco, 2016; Yagi und Takeichi, 2000). Die Kalziumbindungsstellen befinden sich innerhalb einer Art Tasche (Pocket), in der die Kalzium-Ionen durch die sauren Seitengruppen von Glutamin- und Asparaginsäure stabilisiert werden (Nagar et al., 1996). Kalzium-Ionen sind zudem für die Funktion erforderlich, um beispielsweise die EC-Domäne zu versteifen, das Protein zu stabilisieren, um Proteolyse zu vermeiden und seine richtige Lokalisierung zu ermöglichen (Izaguirre und Casco, 2016).

Die Cadherin-Domäne (EC1-EC4, EA) im extrazellulären Bereich faltet sich autonom zu einer Tertiärstruktur, welche eine zylindrische Anordnung eines β -Faltblattes aufweist. Das β -Faltblattes besteht aus sieben antiparallelen Einzelsträngen (" β -barrel") und hat eine große strukturelle Ähnlichkeit mit der Immunglobulin-Domäne (Shapiro et al., 1995) (Abbildung 3) .

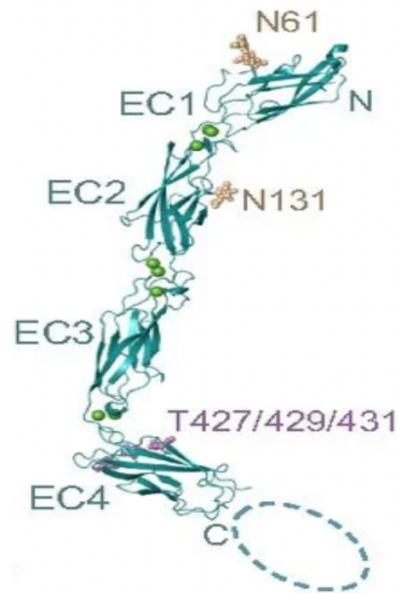


Abbildung 3: **Gesamtstruktur der extrazellulären Regionen von Desmoglein 3.** Ca²⁺-Ionen sind als grüne Kugeln dargestellt, N-gebundene und O-gebundene Glykane sind in weiß bzw. Violett dargestellt. Die Elektronendichte für EC5 von Dsg3 wurde nicht beobachtet, und seine wahrscheinliche Position ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Verwendet und modifiziert nach (Harrison et al., 2016).

Der zytoplasmatische Schwanz besteht aus mehreren Domänen, wie der intrazellulären Verankerungsdomäne (IA), der intrazellulären Cadherin-spezifischen Domäne (ICS), der Prolin-reichen Linker-Domäne (IPL), der Repeating-Unit-Domäne (RUD) und schließlich der Desmoglein-spezifischen terminalen Domäne (DTD) (Kowalczyk und Green, 2013; Koch et al. 1990) (Abbildung. 4).

Zu den Proteinen, welche direkt an die zytoplasmatische Domäne von Dsg3 binden, gehören p120, welches an IA bindet, Plakoglobin (Pg) und Caveolin-1 (Cav-1), die an ICS binden, sowie Aktin, dessen spezifische Domäne noch nicht definiert ist (Andl und Stanley, 2001; Brown et al., 2014; Kanno et al., 2008; Wan, 2016; Wan et al., 2016).

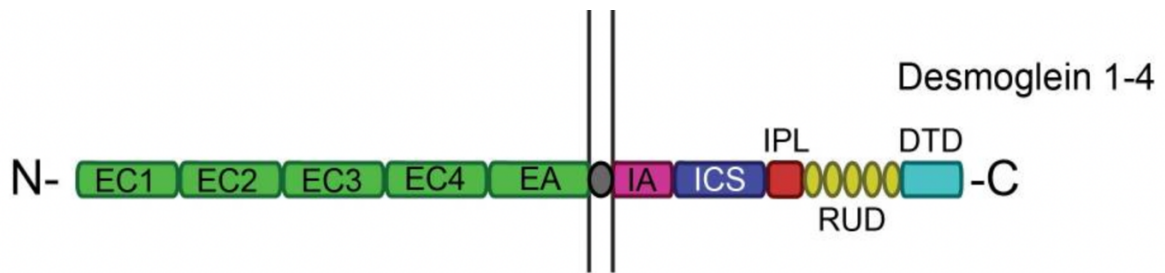


Abbildung 4: **Aufbau der desmosomalen Cadherine (Desmoglein 1-4)**. Desmosomale Cadherine bestehen aus fünf extrazellulären Ektodomänen (EC 1-4), einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne. (EA, extrazellulärer Anker; IA, intrazellulärer Anker; ICS, intrazelluläre Cadherin-ähnliche Sequenz; IPL, intrazellulärer prolinreicher Linker; RUD, Repeat-Unit-Domäne; DTD, terminale Desmoglein-Domäne). Verwendet und modifiziert nach (Kowalczyk und Green et al. 2013).

Besonders zu erwähnen ist hierbei die RAL-Stelle der EC1 als konservierte Zelladhäsionserkennungsstelle (engl. cell adhesion recognition site: CAR) repräsentiert durch Aminosäuresequenz Arginin-Alanin-Leucin (Position 128-130 Aminosäuren). Die EC1-Domäne nimmt somit eine wichtige Funktion ein, indem sie die Bindung zum desmosomalen Cadherin der gegenüberliegenden Zelle ermöglicht (Koch et al., 1990; Amagai et al., 1991). Sie wird als Zentrum der homophilen Bindung angesehen (Blaschuk et al., 1990; Takeichi, 1991). Strukturstudien haben gezeigt, dass sich ein konservierter an Aminosäureposition 2 Tryptophan-Rest (Trp2) bei der Interaktion zwischen den jeweiligen gepaarten desmosomalen Cadherinen entscheidend erwiesen hat. Desmosomale Cadherine interagieren mit Partnermolekülen aus benachbarten Zellen, indem sie die EC1 (amino-terminalen) Beta-Stränge austauschen. Derartige Interaktion führt zur Transdimer-Bildung auch Strangdimer genannt und wird durch eine konservierte Tryptophan-Seitenkette (Trp2) stabilisiert, die in die hydrophobe „Tasche“ der gegenüberliegenden EC1 des Bindungspartners eingeführt wird (Shapiro et al. 1995; Boggon et al., 2002; Posy et al., 2008; Shapiro und Weis, 2009; Nie et al., 2011; Harrison et al., 2016).

Im Gegensatz zu den klassischen Cadherinen, die hauptsächlich homophil binden, wurde in mehreren Studien belegt, dass Desmogleinen und Desmocollinen sowohl homophile als auch heterophile Verbindungen eingehen (Heupel et al., 2008; Nie et al., 2011). Heterophile Verbindungen können durch strangförmige (sonst als Cis bezeichnet) oder laterale (sonst als Trans bezeichnet) Wechselwirkungen gebildet werden. Laterale Interaktionen beschreiben Cadherin-Domänen-Assoziationen von derselben Zelloberfläche, während Strang-Interaktionen Cadherin-Domänen-Assoziationen zwischen gegenüberliegenden Zelloberflächen beschreiben (Hartlieb et al., 2013). Die DSG-DSC-Heterodimere stellen die grundlegende Klebeeinheit der Desmosomen dar. Alle DSGs bilden adhäsive Dimere mit allen DSC-Isoformen mit für jedes DSG-DSC-Paar charakteristischen Affinitäten. Im Gegensatz dazu werden homophile DSG-DSG- und DSC-DSC-Transinteraktionen durch geladene Aminosäuren unterdrückt (Harrison et al., 2016).

1.2.2 Funktion und Bedeutung in Normalgeweben

Dsg3 ist als Hauptbestandteil des Desmosoms maßgeblich für Adhäsion zwischen epidermalen Keratinozyten und nimmt somit eine wichtige Funktion als Haftprotein in der Epidermis ein (Koga et al. 2013; Di Zeno et al., 2012; Heupel et al., 2008). Die Epidermis ist ein sich ständig erneuerndes mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel und besteht vorwiegend aus Keratinozyten als vorherrschender Zelltyp sowie Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen (Baroni et al., 2012).

Die Epidermis wird in 4 Schichten oder Strata unterteilt, beginnend mit der Basalschicht (oder Stratum basale) direkt über der Dermis und weiter aufwärts über die stacheligen Stratum spinosum und körnigen Schichten Stratum granulosum bis zur obersten Schicht, dem Stratum corneum (Baroni et al. 2012) (Abbildung. 5). Während die sich in den drei unteren Schichten befindlichen vitalen Keratinozyten verschiedene Entwicklungsstufen durchlaufen, werden die Hornzellen in der oberen Schicht laufend ersetzt und es findet kontinuierlich Zellneubildung mit einer permanenten Zellwanderung von basal nach superfizial statt (Baroni et al., 2012).

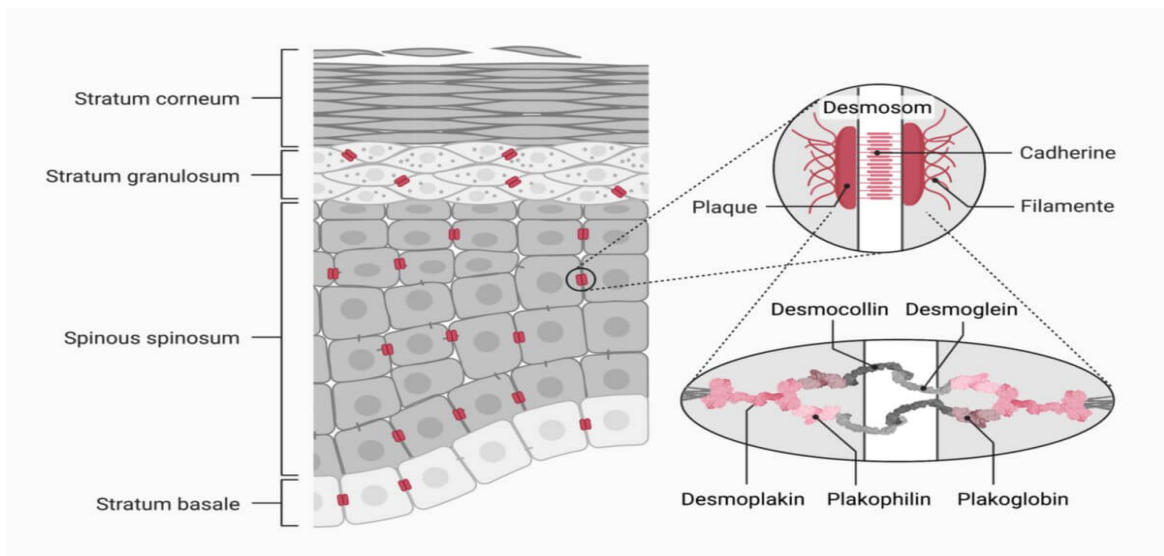


Abbildung 5: **Schematische Darstellung des Epidermis-Aufbaus.** Die Abbildung zeigt die vier Schichten der Epidermis (links) und den Aufbau eines Desmosoms (rechts). Abbildung entnommen aus Doccheck, Stand 7.11.2022 (<https://flexikon.doccheck.com/de/Desmosom>).

Die Adhäsion zwischen epidermalen Keratinozyten wird durch Desmosomen gewährleistet. Desmosomen sind komplexe, scheibenförmige, interzelluläre Verbindungen, die die Intermediärfilamente benachbarter Zellen verbinden und eine starke Zelladhäsion bewirken (Waschke, 2008). Desmosomen haben einen Durchmesser von etwa 0,2-0,5 µm, weisen eine recht charakteristische, hoch organisierte, symmetrische, elektronendichte Struktur auf und bestehen aus einer zentralen Kernregion, die den interzellulären Raum zwischen aneinandergrenzenden Zellen überspannt und zwei identische zytoplasmatische Plaques trennt, die mit dem Intermediärfilament Netzwerk verbunden sind (Garrod und Chidgey, 2008). Die zwei elektronendichten Plaques lassen sich in Plaqueregionen unterteilen, eine äußere elektronendichte Region sowie eine innere elektronendichte Region. Dazwischen befindet sich eine dichte Mittellinie, an der die Interaktion der desmosomalen Cadherine benachbarter Zellen stattfindet (Garrod und Chidgey, 2008; Holthöfer et al., 2007; Yin und Green, 2004).

Mitglieder von drei Proteinfamilien bilden die Kernkomponenten des Desmosoms, desmosomale Cadherinen, einschließlich Desmogleine und Desmocolline (Dsgs, Dscs), Vertreter der Armadillo-Proteine Plakoglobin und Plakophilin (Pg und Pkp), und ein Plakinprotein, Desmoplakin (Dp) (Delva et al., 2009; Garrod et al., 2002a) (Abbildung. 6). Die desmosomalen Cadherine verbinden Zellen durch ihre extrazellulären Domänen und assoziieren mit Pg und den Pkps durch ihre intrazellulären Domänen. Der Cadherin-Armadillo-Komplex bindet wiederum an Dp, dass das Netzwerk der Intermediärfilamente an der Plaque festbindet (Green und Simpson, 2007; Kowalczyk und Green, 2013).

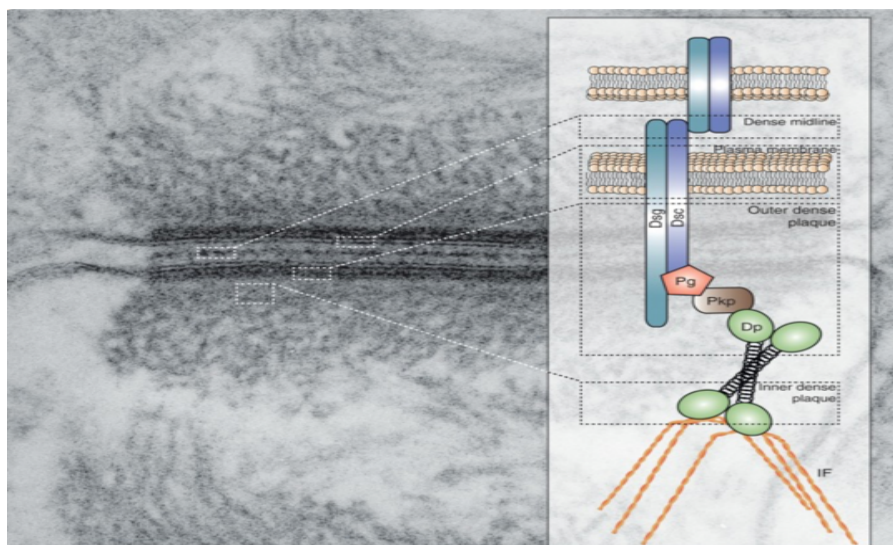


Abbildung 6: **Struktur und Organisation von Desmosomen.** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Desmosoms aus Rinderzungenepithel überlagert mit einer Darstellung der Membran- und Plaquekomponenten. Desmosomen bestehen aus Cadherinen (Dsg, Dsc), Armadillo-Proteine (Plakoglobin, Pg; Plakophilin, Pkp) und einem Plakin (Desmoplakin, Dp), welches als Cytolinker fungiert und das Desmosom an die Intermediärfilamente (IF) bindet. Verwendet und modifiziert nach (Johnson et al., 2014).

Des Weiteren ist Desmoglein 3 auch für die Verankerung des telogenen Haares an der äußeren Wurzelscheide des Haarfollikels von entscheidender Bedeutung und zeigt somit, dass Desmosomen für die Aufrechterhaltung der normalen Struktur und Funktion des Haares wichtig sind (Koch et al., 1998). Neben der Zelladhäsion umfasst das Funktionsspektrum von Dsg3 auch die Beteiligung an Signalkaskaden, welche die Proliferation, Differenzierung und Migration von Keratinozyten steuern (Brown und Wan, 2015). So steuert Dsg3 beispielsweise den Wechsel von einem adhäsiven zu einem migratorischen Keratinozyten-Phänotyp über die Hemmung von p38MAPK, so dass der Verlust der Dsg3-Adhäsion die Wundheilung ermöglicht, indem er die p38MAPK-abhängige Keratinozyten-Migration ermöglicht (Rötzer et al., 2016). Diese Erkenntnisse bestätigen die Feststellung, dass Dsg3 auch außerhalb der Desmosomen nämlich an der Zellmembran der Keratinozyten lokalisiert ist (Waschke und Spindler, 2014).

Zudem führt die Anreicherung von Dsg3 zu einer erhöhten Expression von p53, ein Effekt, der durch die Behandlung von Zellen mit ultravioletten B-Strahlen, mechanischem Stress und genotoxischen Medikamenten zusätzlich verstärkt wird. Dsg3 wird daher als Anti-Stress-Protein für Keratinozyten angesehen (Rehman et al., 2019). Die Expression von Dsg3 ist hauptsächlich auf mehrschichtige Epithelien beschränkt. In der menschlichen Epidermis wird Dsg3 physiologisch in den basalen Keratinozyten exprimiert genauer gesagt im Stratum basale und dem Stratum spinosum (Amagai et al. 1996, Green und Gaudry 2000). Hingegen wird Dsg3 in der oralen Mukosa in allen vitalen Schichten exprimiert, am stärksten in den oberen zwei Dritteln (Mahoney et al., 1999a; Kempf 2020).

Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Expression von Dsg3 sowohl gewebs- als auch differenzierungsspezifisch ist (Holthöfer et al., 2007; Nuber et al., 1995). Die unterschiedlich starke Expression widerspiegelt die Gewebetypspezifität sowie den Proliferations- und Differenzierungszustand der Epithelzellen (Abbildung 7).

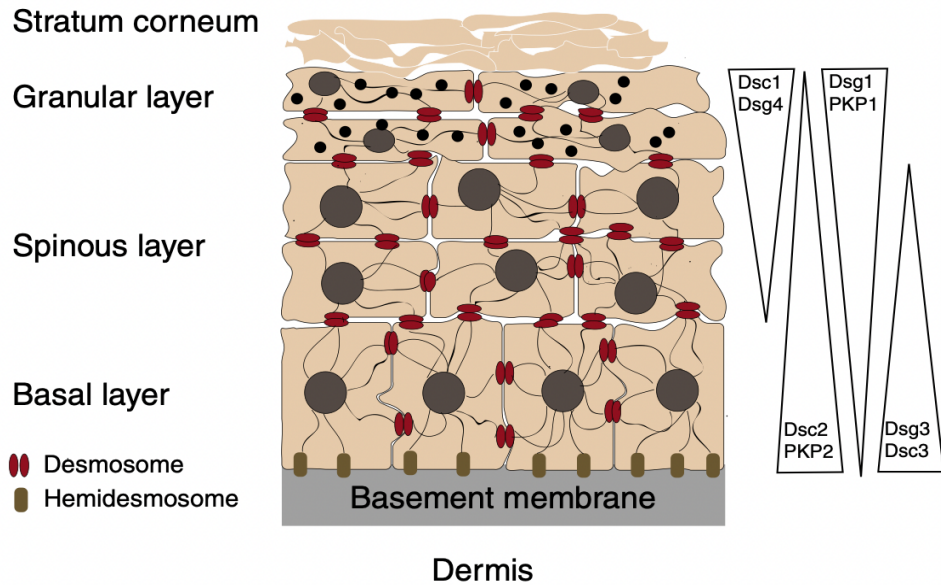


Abbildung 7: das **Expressionsmuster** ausgewählter desmosomaler Komponenten in der Epidermis. Verwendet und modifiziert nach (Kottke et al., 2006).

Eine Expression von Desmoglein 3 wurde ebenfalls in der Lunge beschrieben. Vor allem in den Bronchialepithelien, in denen gelegentlich Bereiche identifiziert wurden, die eine positive Färbung von Desmoglein 3 aufweisen (Fukuoka et al. 2007). Zusätzlich gibt der Human Protein Atlas (HPA) eine RNA-Expression in Ösophagus, Vagina, Tonsillen, Zervix, Speicheldrüsen, Haut, Thymus, Brust, Duodenum sowie Dünndarm an (Abbildung. 8).

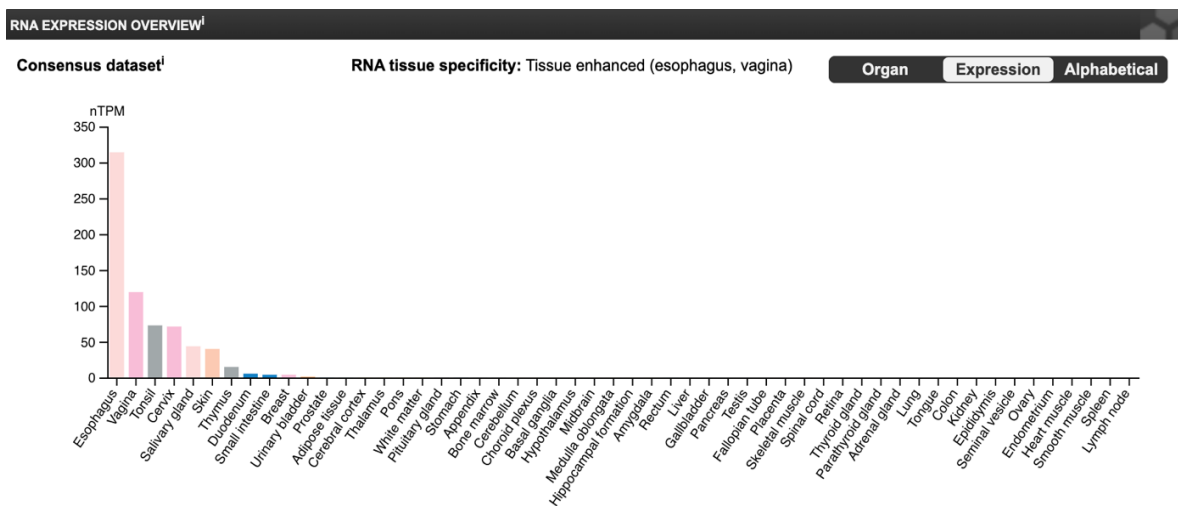


Abbildung 8: mRNA-Expression des Desmoglein 3 in humanem Gewebe. Verwendete Abkürzung: nTPM normalized protein-coding transcripts per million. Abbildung entnommen aus The Human Protein Atlas, Stand 07.11.2022 (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134757-DSG3/tissue>).

1.2.3 Klinische Bezüge

Als wesentlicher Bestandteil der Desmosomen und als wichtiges Haftprotein in der Epidermis nimmt Dsg3 eine relevante Rolle bei verschiedenen nicht neoplastischen Hauterkrankungen ein wie z. B. beim Pemphigus Vulgaris. Der Pemphigus vulgaris (PV) stellt den häufigsten Vertreter der Pemphigus-Erkrankungen dar und wird als bullöse Autoimmundermatose bezeichnet. Ca. 80 % der Pemphigus-Erkrankungen entfallen auf den Pemphigus vulgaris, der sich bevorzugt zwischen dem 4. und 6. Lebensjahrzehnt manifestiert (Huilgol und Black, 1995; Kneisel und Hertl, 2011a). Ursächlich für die Erkrankung sind Autoantikörper, die sich gegen die desmosomalen Cadherine nämlich Dsg1 und Dsg3 richten und in der Folge zu einem Adhäsionsverlust der epidermalen Keratinozyten (sog. Akantholyse) führen durch Störung der Transinteraktion von Desmoglein 1 und 3 (Amagai et al., 1991; Kitajima, 2013; Pollmann 2020). Als Akantholyse bezeichnet man eine spezielle Form von intraepidermaler Kontinuitätstrennung, die histologisch durch einen Verlust des desmosomalen Zellzusammenhaltes im Stratum Spinosum unter Abrundung der Keratinozyten entsteht (Kárpáti et al., 1994, 1993).

1.2.4 Bedeutung im Tumorgewebe

Eine positive Desmoglein-3-Immunhistochemische Färbung wurde in der Literatur bei Plattenepithelkarzinomen unabhängig von ihrem Entstehungsort beispielsweise in der Haut, Lunge, Larynx, Vulva und Blase sowie Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, Analkanal, Zervix und in Tumoren, die eine plattenepitheliale Differenzierung aufweisen wie z. B. Urothelkarzinome beschrieben (Agackiran et al., 2012; Bir et al., 2016; Brown et al., 2013; Chi et al., 2022; Fang et al., 2014; Fukuoka et al., 2007; Gómez-Morales et al., 2013; Gruver et al., 2012; Huang et al., 2013; Krunic et al., 1996; Patel et al., 2013; Saaber et al., 2015; Savci-Heijink et al., 2009; Szade et al., 2019; Tacha et al., 2012; Takamochi et al., 2016; Zhan et al., 2015). Einzelne Veröffentlichungen geben außerdem Dsg3 Expression in oralen Plattenepithelkarzinomen, kolorektalen Adenokarzinomen und beim Ösophagus-Adenokarzinom an (Chi et al., 2022; Kazakydasan et al., 2017; Nagvekar et al., 2016; Patel et al., 2013; Savci-Heijink et al., 2009; Troeltzsch et al., 2022; Wang et al., 2007).

Das Diagramm in Abbildung 9 verschafft eine Übersicht über die Ergebnisse von 26 publizierten Studien, welche insgesamt 34 verschiedenen Tumortypen untersucht haben. Die nachfolgende Darstellung zeigt jedoch, dass eine Diskrepanz der Literaturdaten in Bezug auf die Dsg3-Positivitätsrate der unterschiedlichen Tumorentitäten besteht. So reicht die Dsg3-Positivitätsrate beispielsweise beim Plattenepithelkarzinom der Lunge von 0-100%, dem Adenokarzinom der Lunge von 0-92% und beim oralen Plattenepithelkarzinom (Mundboden) von 13-100%.

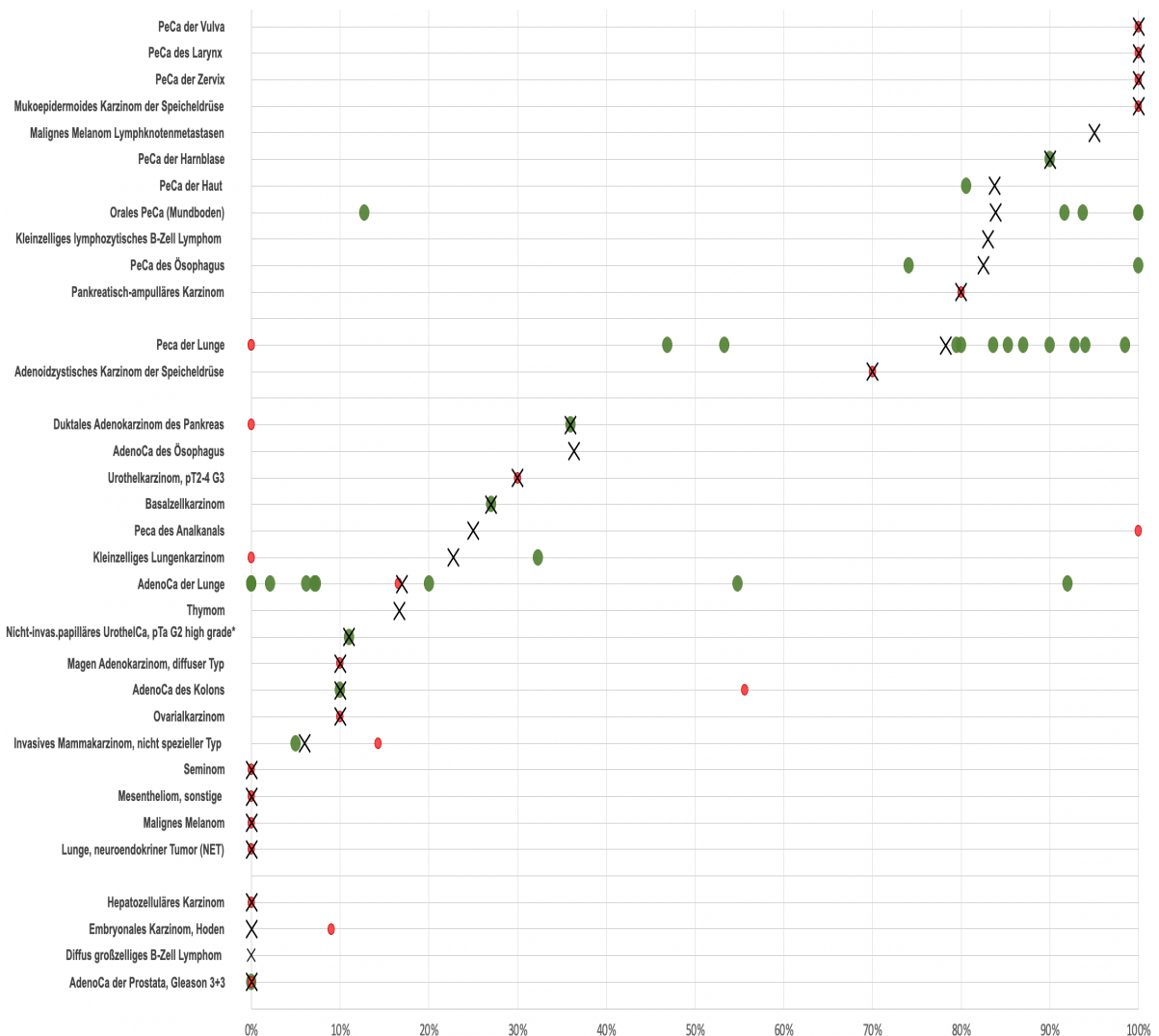


Abbildung 9: Übersicht der bisherigen Studienergebnisse zur Desmoglein 3-Immunhistochemie. Auf der Y-Achse sind die unterschiedlichen Tumorentitäten nach absteigender Positivität aufgelistet, die X-Achse gibt die prozentuale Positivität (0-100%) an. Die einzelnen Studien sind gemäß der Zahl der untersuchten Tumoren in einer Farbkennzeichnung dargestellt. Rote Punkte zeigen Veröffentlichungen mit 1-10 Fallzahlen und grüne Punkte Fallzahlen von über 25. Bei Entitäten, die in mehr als einer Veröffentlichung untersucht wurden zeigen die Kreuze die durchschnittliche Positivität aller Ergebnisse an. Verwendete Abkürzungen: AdenoCa; Adenokarzinom, Ca; Karzinom, PeCa; Plattenepithelkarzinom. Das Diagramm wurde basierend auf Daten mehrerer Publikationen selbstständig erstellt.

Literaturverweise zu den Daten aus Abbildung 9 nach Tumorentität sortiert:

Tumoren der Haut:

- [Basalzellkarzinom](#) (Pietkiewicz et al., 2014)
- [Plattenepithelkarzinom der Haut](#) (Krunic et al., 1996; Savci-Heijink et al., 2009)
- [Malignes Melanom](#) (Savci-Heijink et al., 2009)
- [Malignes Melanom mit Lymphknotenmetastasierung](#) (Savci-Heijink et al., 2009)

Tumoren des Kopfes und des Nackens:

- [Plattenepithelkarzinom des Larynx](#) (Savci-Heijink et al., 2009)
- [Orales Plattenepithelkarzinom \(Mundboden\)](#) (Kazakydasan et al., 2017; Nagvekar et al., 2016; Patel et al., 2013; Savci-Heijink et al., 2009; Troeltzsch et al., 2022; Wang et al., 2007)
- [Mukoepidermoides Karzinom der Speicheldrüse](#) (Savci-Heijink et al., 2009)
- [Adenoidzystisches Karzinom der Speicheldrüse](#) (Savci-Heijink et al., 2009)

Tumoren der Lunge, Pleura und des Thymus:

- [Adenokarzinom der Lunge](#) (Agackiran et al., 2012; Bir et al., 2016; Fukuoka et al., 2007; Funahashi et al., 2018; Gómez-Morales et al., 2013; Patel et al., 2013; Saaber et al., 2015; Sakai et al., 2013; Savci-Heijink et al., 2009; Szade et al., 2019; Tacha et al., 2012; Takamochi et al., 2016; Zhan et al., 2015)
- [Plattenepithelkarzinom der Lunge](#) (Agackiran et al., 2012; Bir et al., 2016; Brown et al., 2013; Fukuoka et al., 2007; Gómez-Morales et al., 2013; Gruver et al., 2012; Patel et al., 2013; Saaber et al., 2015; Savci-Heijink et al., 2009; Szade et al., 2019; Tacha et al., 2012; Takamochi et al., 2016; Zhan et al., 2015)
- [Thymom](#) (Savci-Heijink et al., 2009)
- [Kleinzelliges Karzinom der Lunge](#) (Chi et al., 2022; Fukuoka et al., 2007; Patel et al., 2013)
- [Mesenchymales Karzinom, sonstige](#) (Savci-Heijink et al., 2009)

Tumoren des weiblichen Genitaltraktes:

- [Plattenepithelkarzinom der Vulva](#) (Savci-Heijink et al., 2009)
- [Plattenepithelkarzinom der Zervix](#) (Savci-Heijink et al., 2009)
- [Ovarialkarzinom](#) (Savci-Heijink et al., 2009)

Tumoren der Mamma:

- [Invasives Mammakarzinom, nicht spezieller Typ](#) (Patel et al., 2013; Savci-Heijink et al., 2009)

Tumoren des Verdauungs-Systems:

- [Adenokarzinom des Kolons](#) (Patel et al., 2013; Savci-Heijink et al., 2009)
- [Adenokarzinom des Magens, diffuser Typ](#) (Savci-Heijink et al., 2009)
- [Adenokarzinom des Ösophagus](#) (Chi et al., 2022)
- [Plattenepithelkarzinom des Ösophagus](#) (Chi et al., 2022; Fang et al., 2014; Savci-Heijink et al., 2009)
- [Plattenepithelkarzinom des Analkanals](#) (Patel et al., 2013; Savci-Heijink et al., 2009)
- [Duktales Adenokarzinom des Pankreas](#) (Ormanns et al., 2015)
- [Pankreatisch-ampulläres Karzinom](#) (Savci-Heijink et al., 2009)
- [Hepatozelluläres Karzinom](#) (Savci-Heijink et al., 2009)

Tumoren des Harntrakts:

- [Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2 high grade](#) (Gruver et al., 2012)
- [Urothelkarzinom, pT2-4 G3](#) (Savci-Heijink et al., 2009)
- [Plattenepithelkarzinom der Harnblase](#) (Huang et al., 2013)

Tumoren des männlichen Genitaltraktes:

- [Adenokarzinom der Prostata, Gleason 3+3](#) (Patel et al., 2013; Savci-Heijink et al., 2009)
- [Embryonales Karzinom des Hodens](#) (Savci-Heijink et al., 2009)
- [Seminom](#) (Savci-Heijink et al., 2009)

Tumoren des endokrinen Systems:

- [Neuroendokriner Tumor der Lunge](#) (Savci-Heijink et al., 2009)

Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes:

- [Diffus großzelliges B-Zell Lymphom](#) (Chi et al., 2022)
- [Kleinzelliges lymphozytisches B-Zell Lymphom](#) (Wang und Chen et al., 2021)

Eine wichtige Fragestellung, die es näher zu untersuchen gilt, ist die Rolle von Dsg3 bei der Entstehung von Tumoren. Es ist nach wie vor umstritten bzw. ungeklärt, ob es im physiologischen Zustand ein potenzielles Proto-Onkogen oder ein Tumorsuppressor ist. Aufgrund seiner Rolle als Zelladhäsionsmolekül und der erhöhten Motilität von Keratinozyten mit herunterreguliertem Dsg3 würde man eine tumorsuppressive Rolle von Dsg3 erwarten (Brown und Wan et al., 2015).

Andere Autoren haben jedoch Hinweise auf eine kausale Rolle von Dsg3 als Onkogen bei der Tumorentstehung gefunden (Abula et al., 2021; Brown et al., 2014; Chen et al., 2013, 2007; Dong et al., 2020; Ormanns et al., 2015; Patel et al., 2013). So berichtet Chen et al., dass Dsg3 bei Kopf- und Halskrebs überexprimiert ist, als Onkogen fungiert und das Krebswachstum und die Invasion durch Proteinkinase C oder Dsg3-Plakoglobin-TCF/LEF-Wege fördert.

Die Überexpression von Dsg3 korreliert mit einem fortgeschrittenen klinischen Stadium. Die Korrelation von Dsg3 mit dem klinischen T-Stadium lässt sich auf zellulärer Ebene durch die Rolle von Dsg3 bei der Regulierung von Wachstum und Koloniebildung erklären. Die Korrelation von Dsg3 mit dem N-Stadium entspricht auf zellulärer Ebene der Beteiligung von Dsg3 an der Regulierung der Zellmigration und -invasion (Chen et al., 2013).

Zum einen haben Studien gezeigt, dass Dsg3 in Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses, der Lunge, der Haut und der Speiseröhre usw. hochreguliert ist (Chen et al. 2007, Huang et al. 2010, Fang, et al. 2014, Fukuoka, et al. 2007, Savci-Heijink, et al. 2009, Liu et al. 2007). Darüber hinaus wurde eine Korrelation zwischen den Expressionsniveaus von Dsg3 und der Tumorprogression und Metastasierung festgestellt (Chen et al. 2007, Patel et al. 2013). Dies deutet darauf hin, dass Dsg3 in einem bestimmten Kontext zur Krebsprogression beitragen kann. Zum anderen haben mehrere Publikationen paradoxerweise darauf hingewiesen, dass reduzierte Dsg3-Spiegel die Entwicklung und das Fortschreiten von Plattenepitheltumoren fördern können (Rehman et al., 2019; Fang et al., 2014; Chi et al., 2022; Saaber et al., 2015; Chao et al., 2016; Wang et al. 2007).

Troeltzsch et al. beschreibt im Fall der oralen Plattenepithelkarzinome, dass die Überexpression von Dsg3 in signifikantem Zusammenhang mit einer schlechten histologischen Differenzierung und dem Vorhandensein von Metastasen bei der Primärdiagnose steht. Die Überexpression von Dsg3 kann mit aggressiveren und ausgedehnteren Krankheitszuständen des oralen Plattenepithelkarzinoms in Verbindung gebracht werden und ist von prognostischer Bedeutung.

Die Bestimmung des Dsg3-Expressionsniveaus könnte ein nützliches Instrument zur Anpassung individueller Behandlungsprotokolle sein (Ausmaß der Neck Dissection, Empfehlung einer adjuvanten Therapie). Da eine Überexpression von Dsg3 zu einem frühen und häufigen Wiederauftreten von oralen Plattenepithelkarzinomen führen kann (Troeltzsch et al., 2022).

Abula et al. hat in einer Studie festgestellt, dass Dsg3 in Bauchspeicheldrüsenkrebs-Zelllinien hochreguliert ist und somit zum Wachstum und zur Metastasierung von Bauchspeicheldrüsenkrebszellen beiträgt. Wurde Dsg3 jedoch ausgeschaltet, verhinderte dies das Zellwachstum und die Metastasierung. Darüber hinaus unterdrückte die Unterdrückung von Dsg3 das In-vivo-Wachstum von Bauchspeicheldrüsenkrebs. Dies bestätigt die onkogene Rolle von Dsg3 beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas (Abula et al., 2021).

Zusammenfassend zeigte diese Studie, dass Dsg3 im duktalem Adenokarzinom der Pankreas-Zellen hochreguliert wurde, welches die Proliferation und Invasion vom duktalem Adenokarzinom des Pankreas durch die Aktivierung des Src/FAK/AKT-Signalwegs förderte. Die Unterdrückung von Dsg3 trug in vitro zur Unterdrückung des Zellüberlebens und in vivo zum Tumorwachstum durch Inaktivierung des Src/FAK/AKT-Signalwegs bei. Inhibitoren von Dsg3 könnten das Wachstum und die Metastasierung vom duktalem Adenokarzinom des Pankreas unterdrücken. Ferner berichtete Ormanns et al., dass eine hohe Expression von Dsg3 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas die Überlebenszeit der Patienten erheblich verkürzt (Ormanns et al., 2015). Bei Patienten mit Rektumkarzinom erwies sich Dsg3 als wichtiger prognostischer Faktor und Prädiktor für das Ansprechen auf eine kombinierte Chemo- und Strahlentherapie. Dort konnte eine hohe Dsg3 Expression in den Zusammenhang mit einem geringeren Tumorregressionsgrad und einem schlechteren Gesamtüberleben gestellt werden (Chao et al., 2016).

Darüber hinaus haben die Ergebnisse mehrerer TMA-Studien gezeigt, dass die Expression des Gens Dsg3 in Plattenepithelkarzinomen der Lunge hochreguliert ist. In einer Studie von Savci-Heijink wird Dsg3 als ein empfindlicher und spezifischer Marker mit einer Sensitivität von 99 % und einer Spezifität von 87 % für Plattenepithelkarzinome beschrieben, insbesondere für die Lunge (Savci-Heijink et al. 2009). Im Falle der atypischen Karzinoid-Tumoren der Lunge korrelierte eine negative Desmoglein-3-Färbung mit einer schlechteren 5-Jahres-Überlebensrate als Dsg3-positive Tumoren (Fukuoka et al., 2007).

Eine andere Tumorart, bei der eine Expression bestätigt werden konnte, ist das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. Hier konnte eine Korrelation zwischen negativer Dsg3-Expression mit einer schlechteren Prognose festgestellt werden sowie eine Korrelation zwischen mRNA-Expression von Dsg3 in hohem Maße mit dem histologischen Grad. Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass Dsg3 an der bösartigen Neubildung beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus beteiligt sein kann und als prognostischer Marker dienen kann (Fang et al., 2014).

In-vitro-Studien haben gezeigt, dass die Überexpression von Desmoglein 3 in Krebszelllinien mehrere Signalwege aktiviert, die sich auf die Zellmorphologie, Adhäsion und Fortbewegung auswirken. Diese zusätzlichen Signalfunktionen von Desmoglein 3 sind möglicherweise nicht mit seiner adhäsiven Funktion in den Desmosomen verbunden, sondern wirken außerhalb der Verbindungsstellen als Schlüsselregulator bei der Steuerung aktinbasierter zellulärer Prozesse (Brown und Wan et al., 2015).

So löst die Bindung von PV-IgG an Dsg3 auf der Keratinozytenoberfläche eine Kaskade von intrazellulären Ereignissen aus, wie z. B. die Dsg3-Phosphorylierung, die Aktivierung des Phospholipase C (PLC)-Signalwegs einschließlich der Produktion von Inositol 1, 4,5-Trisphosphat (IP3) und Induktion einer Ca^{2+} /PKC, Signalübertragung durch p38MAPK/Hitzeschockprotein 27 (HSP27), Src, epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), Apoptose, c-Myc, Adaptorprotein Plakoglobin/Plakophinlin-3, des Wnt/ β -Catenin-Signals sowie Rho-GTPasen und Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts insbesondere in Plattenepithelkarzinomen, wobei die erhöhte Expression mit dem klinischen Stadium und Metastasierung der Malignität korreliert, welches auf seine krebsfördernde Rolle und sein Potenzial als diagnostischer und prognostischer Marker hindeutet (Brown und Wan et al. 2015).

In der RNA-Expressionsdatenbank des Cancer Genome Atlas (TCGA) wurden hohe Dsg3-Expressionswerte bei einem signifikanten Anteil von Brust- und Magenkrebs festgestellt. Abbildung 10 zeigt eine Übersicht der mRNA-Expression in verschiedenen Tumorentitäten aus dem Human Protein Atlas.

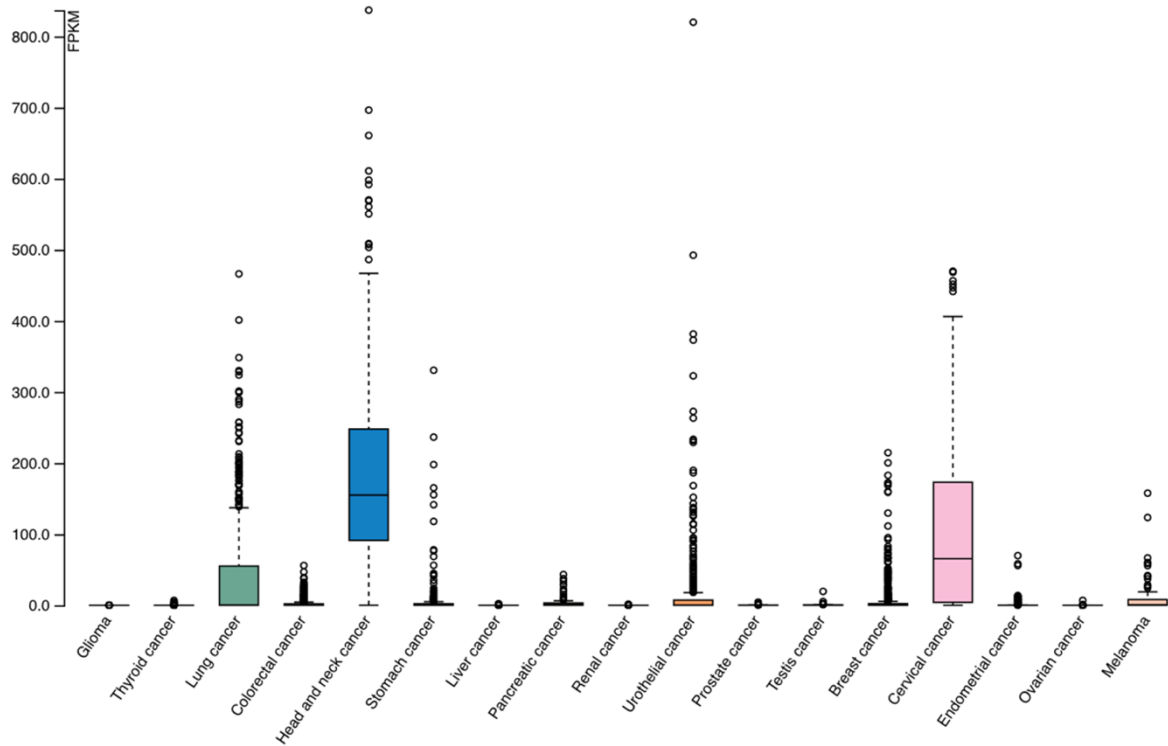


Abbildung 10: mRNA-Expression des Desmoglein 3 in verschiedenen Tumorentitäten. Verwendete Abkürzung: FPKM-Fragments per Kilobase of exon per million reads. Generiert aus dem Datensatz des The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network (<https://www.cancer.gov/tcga>). Abbildung entnommen aus The Human Protein Atlas, Stand 07.11.2022 (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134757-DSG3/pathology>).

1.2.5 Klinische Bedeutung in der pathologischen Diagnostik

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Desmoglein 3 bei malignen Neubildungen insbesondere bei Plattenepithelkarzinomen nachweisbar ist, wobei eine erhöhte Expression oft mit dem klinischen Stadium und einer Metastasierung korreliert (Savci-Heijink et al., 2009, Fang et al., 2014). Dies deutet darauf hin, dass Dsg3 als diagnostischer und prognostischer Marker dienen könnte (Brown und Wan et al. 2015).

Mehrere Autoren haben auf den diagnostischen Nutzen der Dsg3-Immunhistochemie (IHC) hingewiesen, insbesondere zur Sicherstellung der Plattenepithelzellendifferenzierung bei Karzinomen mit unklarer Morphologie, wie z. B. bei Lungen- und Blasenkrebs (Dong et al., 2020; Huang et al., 2013). Darüber hinaus wurde Dsg3 als empfindlicher und spezifischer Marker für Plattenepithelkarzinome in der Speiseröhre beschrieben (Chi et al., 2022).

1.3 Zielsetzung der Vorliegenden Arbeit

Die Beantwortung der Frage, ob die Dsg3-Immunhistochemie diagnostisch genutzt werden kann, wird durch widersprüchliche Literaturdaten zur Expression von Dsg3 in verschiedenen Tumorentitäten erschwert. Die Diskrepanz der Literaturdaten ist auf die Verwendung von verschiedenen Antikörpern, immunhistochemischen Protokollen und Kriterien für die Bewertung der histologischen Befunde zurückzuführen. Um die potenzielle Rolle der Dsg3-Expression und ihren möglichen diagnostischen Nutzen besser zu verstehen und einen systematischen Überblick über die Dsg3-Expression in normalem und neoplastischem menschlichen Gewebe zu verschaffen, wurden in der vorliegenden Studie insgesamt 15.869 Tumorgewebeprobe von 137 verschiedenen Tumortypen und Subtypen sowie Normalgewebe von 76 verschiedenen Normalgewebekategorien in einem Tissue-Microarray Format unter standardisierten Bedingungen mit einem validierten Antikörper auf die Expression von Desmoglein-3 untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Tissue-Microarray Methode

Die Tissue-Microarray (TMA) Technik ist ein 1998 erstmals publiziertes Verfahren, welches die gleichzeitige Untersuchung von hunderten von Gewebeproben auf einem einzigen Objektträger erlaubt (Kononen et al., 1998). Durch das Einbringen von topographisch genau zugeordneten zylindrischen Gewebeproben in einen leeren Paraffinblock, von dem nachher reguläre „histologische“ 2,5 Mikrometer Schnitte hergestellt werden können, wird es ermöglicht auf einem Objektträger- anstatt wie bisher üblich einen Tumor nun bis zu 600 Tumoren anzufärben. Dementsprechend sind Tissue-Microarrays für alle in Situ Methoden geeignet wie beispielsweise, die Immunhistochemie aber auch RNA-in-situ-Hybridisierung (RNA-ISH) oder Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FiSH) zur Visualisierung von DNA-Sequenzen (Simon und Sauter, 2002). Die Methode wurde 1997 von den Arbeitsgruppen von Prof. Olli Kallioniemi (damals National Human Genome Research Institute, NHGRI, Bethesda, Maryland, USA) und Prof. Guido Sauter (damals Institut für Pathologie des Universitätsspitals Basel) entwickelt.

Die „TMA“ Methode hat zahlreiche Vorteile. Die wichtigsten sind die hohe Geschwindigkeit, mit der auch große Studien durchgeführt werden können, die geringen hierfür anfallenden Reagenzien Kosten und das ungewöhnlich hohe Ausmaß der Standardisierung (Al Kuraya et al., 2004; Simon et al., 2004). Da die gleiche Menge an Manpower und an Reagenzien, welche früher benötigt wurde, um einen einzigen Gewebeschnitt zu färben im TMA-Format dafür ausreicht bis zu 600 Tumoren gleichzeitig zu färben, können die Kosten für Reagenzien und die Arbeitszeit für die Färbung im Verhältnis zu einer klassischen Großschnittuntersuchung um einen Faktor 600! gesenkt werden. Die Standardisierung der Untersuchung umfasst nicht nur direkte Färbeparameter wie Reagenzien-Zusammensetzung, Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen, welche theoretisch auch in einem Immunfärbeautomaten konstant gehalten werden können. Die in einer „TMA“ Studie standardisierten Parameter umfassen auch andere wichtige Einflussfaktoren auf immunhistochemische Färbeergebnisse wie beispielsweise die Schnittlagerungszeit und die pro Patient untersuchte Tumormenge (Mirlacher et al., 2004; Torhorst et al., 2001).

Die Schnittlagerungszeit, die Zeit zwischen Herstellung eines Gewebeschnittes und seiner immunhistochemischen Färbung, übt einen erheblichen Einfluss auf die immunhistochemische Färbeintensität aus (Fergenbaum et al., 2004). Mehrere Studien haben gezeigt, dass bereits eine Lagerung eines Schnittes von zwei Wochen bei vielen Antikörpern zu einer deutlichen Verringerung der Färbeintensität führt (Mirlacher et al., 2004).

Dies ist offensichtlich unabhängig davon, ob ein ungefärbter Gewebeschnitt bei Raumtemperatur, im Kühlschrank unter einer frisch angelegten Paraffinschicht oder in Stickstoff gelagert wird (DiVito et al., 2004). Dass die Positivitätsrate bei immunhistochemischen Studien wesentlich von den untersuchten Gewebebeziehungsweise Tumormenge abhängt weiß man insbesondere aus TMA-Studien. Mehrere Studien hatten unter Verwendung der „TMA“ Technik gezeigt, dass die Entnahme mehrerer Gewebezyylinder aus einem Paraffinblock bei Addition der Befunde dazu führt, dass die Positivitätsrate mit der Zahl der entnommenen Stenzen ansteigt und sich schließlich der Positivitätsrate annähert, welche doch in Untersuchungen eines Großschnittes des entsprechenden Gewebeblocks gefunden wurde (Camp et al., 2000; Fernebro et al., 2002; Gulmann et al., 2003; Hoos et al., 2001, 2001; Rosen et al., 2004; Rubin et al., 2002).

Die Daten dieser Studien sind nachfolgend für mehrere Antikörper dargestellt.

Studie	Untersuchte Entität	Fallzahl (n)	Untersuchte Antikörper	Positivitätsrate pro entnommene Stanze (%)	Positivitätsrate am Großschnitt (%)
				1) eine Stanze 2) zwei Stanzen 3) drei Stanzen 4) mehr als drei Stanzen	
1) Gulmann et al., 2003	Magenkarzinom	38	p53	1) 3% 2) 8% 3) 84%	84%
			CD44v6	1) 5% 2) 19% 3) 62%	62%
			VEGF	1) 3% 2) 24% 3) 70%	70%
2) Camp et al., 2000	Mammakarzinom	38	ER	1) 62,832% 2) 65,44% 3) 66,7216% 4) 67,99%	68%
			PR	1) 52,93 % 2) 54,46 % 3) 55,23 % 4) 55,994 %	56%
			HER2	1) 21,693% 2) 22,84% 3) 23,4% 4) 23,995%	24%
3) Rosen,et al., 2004	Ovarialkarzinom	45	Ki-67	1) 58,24 % 2) 62,08% 3) 62,72 % 4) 64%	64%
			ER	1) 55,2% 2) 58,2% 3) 58,8% 4) 60%	60%
			P53	1) 52,78% 2) 55,68% 3) 56,84% 4) 58%	58%
4) Fenebro et al., 2002	Rektalkarzinom	20	Ki-67	1) 76,059% 2) 78,57% 3) 85%	81%
5) Hoos et al., 2001	Fibroblastische Tumoren	59	p53	3 Stanzen sind erforderlich für eine repräsentative Übereinstimmung mit der Positivitätsrate am Großschnitt*	5%
			pRB	1) 40,756% 2) 43% 3) 43,065%	46%
			Ki-67	1) 30,76% 2) 32,46% 3) 32,703 %	33,96%

Tabelle 1: **Positivitätsrate unterschiedlicher Antikörper bei der TMA-Methode vs. am Großschnitt.** Dargestellt sind die Studienergebnisse zur Korrelation zwischen ansteigender Zahl der entnommenen Stanzen (bei Verwendung der TMA-Methode) in Bezug auf die Positivitätsrate unterschiedlicher Antikörper verglichen mit der Positivitätsrate am Großschnitt bei verschiedenen Tumorentitäten. Diese Tabelle wurde basierend auf Daten mehrerer Publikationen selbstständig erstellt.

Die Autoren dieser Studien schlossen mehrheitlich aus ihren Daten, dass mehrere Stenzen notwendig sind, um für einen Großschnitt repräsentative Information zu regenerieren. Unerwähnt blieb die Tatsache, dass sich „Großschnitte“ in der klinischen Praxis in ihrer „Größe“ erheblich unterscheiden. Die in Großschnitten angetroffenen Tumormenge reichen von kleinen Biopsien mit einem Quadratmillimeter (1 mm²) oder weniger Tumor bis zu Präparaten, welche praktisch vollständig (zum Beispiel 3 x 2 cm) aus Tumorgewebe bestehen. Basierend auf den publizierten TMA-Daten ist zu erwarten, dass auch hier bei größeren Gewebemengen mehr Positivität erzielt wird. Nur eine Studie hatte bisher die biologische Relevanz von immunhistochemischen Daten erzielt an Großschnitten versus erzielt an TMAs verglichen (Torhorst et al., 2001). In der Studie von Torhorst et al. konnte über 500 Mammakarzinome gezeigt werden, dass Großschnitte zwar zu fast doppelt so viel p53 positiven Fällen führten wie TMAs aus den entsprechenden Tumorblöcken, doch waren nur die TMA-Daten und nicht die Großschnittbefunde signifikant mit der Prognose assoziiert. Torhorst et al. schloss aus den Daten, dass die Untersuchungen einer großen Gewebemenge zur Überinterpretation von entweder Artefakten oder biologisch irrelevanten fokalen Befunden geführt hatten (Torhorst et al. 2001). Für die Nützlichkeit von TMAs für die Untersuchung potenziell biologisch relevanter Parameter spricht auch die Tatsache, dass alle etablierten klinisch genutzten Prognose-Marker wie Östrogenrezeptor (engl. estrogen receptor: ER), Progesteronrezeptor (engl. progesterone receptor: PR), Ki-67, HER2 bei Mammakarzinom (Moeder et al., 2007; Ruiz et al., 2006; Zhang et al., 2003), PTEN-Deletion beim Prostatakarzinomen (Kluth et al., 2014; Lotan et al., 2016, 2011) oder der histologische Grad bei Urothelkarzinom (Nocito et al., 2001) auch im TMA als prognoserelevant gefunden werden konnten.

Der wesentlichste Nachteil der TMA-Methode ist der hohe Arbeitsaufwand, welche mit der Herstellung von TMA-Blöcken verbunden ist (Bubendorf et al., 2001). Die komplexe Arbeit der TMA-Herstellung beginnt mit der Identifikation potenziell geeigneter Fälle durch eine Volltextsuche im Pathologie-Informationssystem. Die so identifizierten Fälle werden zunächst aufgrund des Diagnosetextes auf die mögliche Eignung evaluiert. Die wesentlichen Kriterien sind eine minimale Größe des Tumors von 1 cm² und eine eindeutige Diagnose. Tumoren, bei denen der Diagnosetext auf eine nicht ganz sichere Diagnose schließen lässt, werden während dieser Phase ausgeschlossen. Alle zu identifizierten Kandidaten werden danach von einem Pathologen beurteilt. Hierzu müssen alle Schnitte aus dem Archiv geholt und dem Pathologen vorgelegt werden. Findet sich einen Schnitt mit einer Tumorfläche von mindestens 1 cm² wird das Tumorareal mit einem Filzstift markiert und der korrespondierende Paraffinblock wird aus dem Archiv geholt.

Dieser Paraffinblock muss von einer erfahrenen MTA auf seine Eignung für die TMA-Herstellung beurteilt werden. Blöcke mit einer Dicke/Tiefe von <2,5 mm erlauben die Entnahme von lediglich kurzen Zylindern, sodass daraus hergestellte TMAs die Herstellung einer nur limitierten Menge von Schnitten ermöglichen.

Die letztlich identifizierten Fälle mit ausreichend sicherer Diagnose, ausreichend großen Tumormengen in mindestens einem Block und genügend große Blocktiefe werden dann für die TMA-Herstellung vorbereitet. Dabei werden die markierten Schnitten mit den Blöcken in der richtigen Reihenfolge zusammensortiert, die bereits die vorgesehene Organisation, Struktur des TMA-Blocks vorwegnehmen. Die Organisation von UKE TMA-Blöcken ist immer gleich. Sie bestehen aus maximal 6, zum Zwecke der besseren Orientierung aus asymmetrisch angeordneten und ungleich großen Sektoren, welche mit Großbuchstaben von (A-F) markiert sind. Die Zeilen der einzelnen Sektoren werden mit Zahlen von 1 - 9 gekennzeichnet und die Spalten mit kleinen Buchstaben von a bis maximal r. Eine grafische Darstellung des typischen UKE TMA-Aufbaus ist in Abbildung 11 dargestellt.

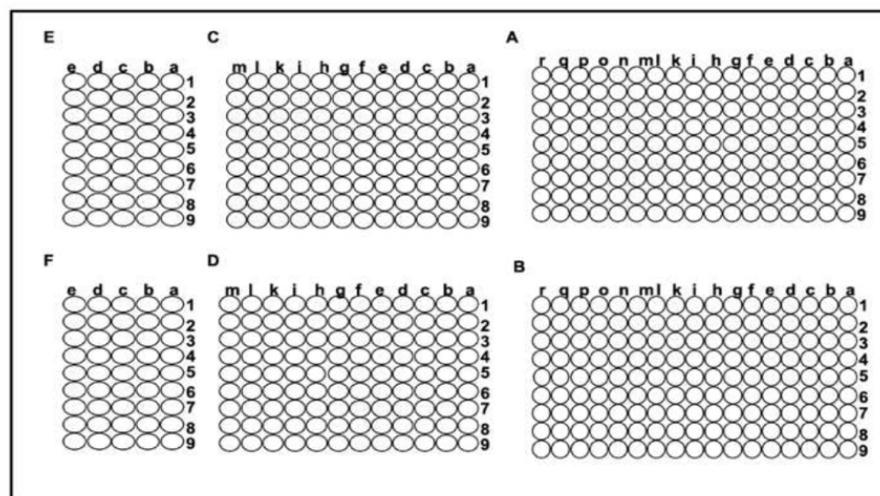


Abbildung 11: Grafische Darstellung des Koordinatensystems eines am UKE hergestellten Tissue Microarrays (Arrayname MTA 6.2 A). Der Tissue Microarray gliedert sich in 6 Sektoren (gekennzeichnet mit Großbuchstaben A-F.). In jedem Sektor werden die Zeilen mit Zahlen (1-9) und die Spalten mit Kleinbuchstaben (a-r, a-m bzw. a-e) definiert.

Da die Blockbezeichnungen nach der Herstellung eines TMAs nicht mehr benötigt werden, können diese aus Gründen des Datenschutzes nach Abschluss der Herstellung entweder ausgeblendet (Pseudonymisierung), oder aber definitiv gelöscht (Anonymisierung) werden. Die vorhandenen klinischen und pathologischen Daten bleiben mit den einzelnen Geweben über die TMA-Koordinate auf Dauer verbunden. Ein Beispiel eines TMA-Datenfiles mit pathologischen und klinischen Parametern ist in Tabelle 2 dargestellt.

Array Sektor	Koordinate	Entität	pT	pN	Grading	Untersuchte Lymphknoten
...
A	A 1m	Plattenepithelkarzinom Harnblase	pT3b	pN2	G3	3
A	A 1n	Plattenepithelkarzinom Harnblase	pT3b	pN1	G3	1
A	A 1o	Plattenepithelkarzinom Harnblase	pT3b	pN2	G2	2
A	A 1p	Plattenepithelkarzinom Harnblase	pT2	pN0	G2	17
A	A 1q	Plattenepithelkarzinom Harnblase	pT2b	pN0	G3	15
A	A 1r	Plattenepithelkarzinom Harnblase	pT3b	pN2	G3	4
A	A 2a	Plattenepithelkarzinom Harnblase	pT3b	pN0	G2	26
A	A 2b	Plattenepithelkarzinom Harnblase	pT3b	pN0	G2	22
A	A 2c	Plattenepithelkarzinom Harnblase	pT3b	pN1	G2	1
A	A 2d	Plattenepithelkarzinom Harnblase	pT4b	x	G3	x
...

Tabelle 2: **Ausschnitt eines beispielhaften TMA-Datenfiles: MTA 6.2M (Multitumor-Array)**. Sind Daten nicht vorhanden, wird ein x in der Tabelle eingetragen. Die patientenbezogenen Daten sind anonymisiert.

Für die TMA-Herstellung wird ein von Mitarbeitern des Instituts für Pathologie (Chris und Martina Mirlacher) hergestellter semi-automatischer Tissue-Microarrayer verwendet (Abbildung 12). Die zentralen Elemente dieses Arrayers sind eine Umschaltvorrichtung, welche es ermöglicht an identischer Position entweder einen Elektrobohrer oder aber eine Hohlneedle zum Einsatz zu bringen (Abbildung 13), ein Mehrfachblock Halter (Abbildung 14), der maximal sechs leere Paraffinblöcke (TMA Empfänger-Blöcke) so aufnimmt, dass diese wechselweise unter die zuvor beschriebene Umschaltvorrichtung positioniert werden können, ein Elektromotor mit Computer Ansteuerung, welche dafür sorgt, dass die Umschaltvorrichtung auf geordnete Weise von einer TMA Position zur nächsten bewegt werden kann und ein Blockpodest, welche es erlaubt, die TMA Empfänger-Blöcke zu überdecken, sodass oberhalb des Empfänger-Blockes ein tumorhaltiger (TMA Spenderblock) Block bearbeitet werden kann. Die einzelnen Prozessschritte der TMA-Herstellung sind in Abbildung 15 dargestellt

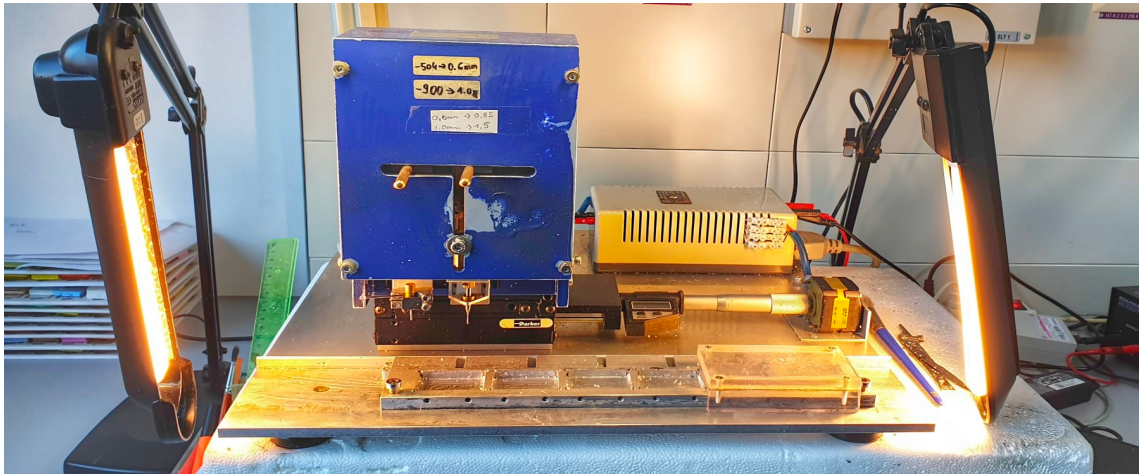


Abbildung 12: TMA-Arrayer. Dargestellt ist ein semiautomatischer Arrayer.

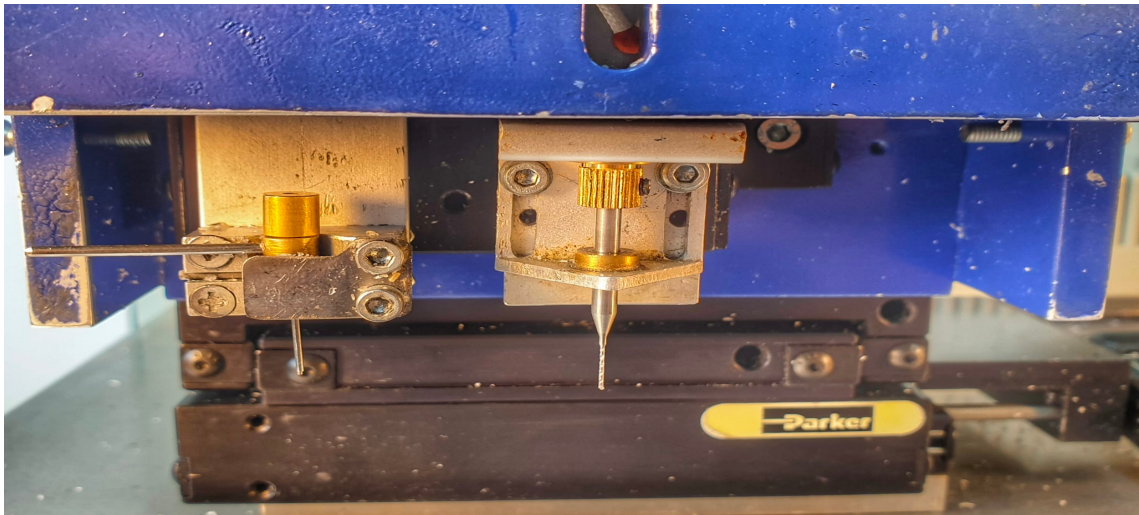


Abbildung 13: Aufbau eines TMA-Arrayers. Dargestellt sind Hohlnadel (links) und Elektrobohrer (rechts).

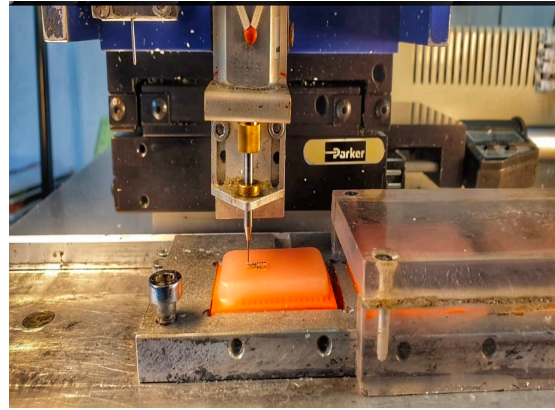


Abbildung 14: TMA-Blockhalter. Das Bild zeigt einen Blockhalter mit sechs leeren Paraffinblöcken (TMA-Empfängerblöcke).

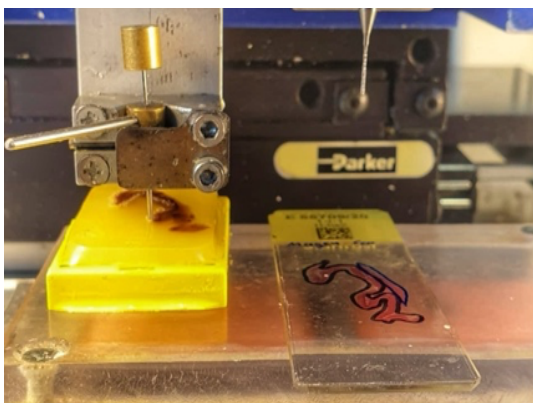
Der TMA-Herstellungsprozess beginnt mit der Bohrung eines Loches auf Position A1a des ersten Empfänger-Blockes. Hierzu wird meistens ein Bohrer verwendet, dessen äußerer Durchmesser 0,6 mm beträgt. Nach Herstellung des Loches wird die Umschaltvorrichtung betätigt und der Bohrer durch eine Hohlzylinder ersetzt, deren Innendurchmesser dem äußeren Durchmesser des Bohrers entspricht (0.6 mm). Der Empfänger-Block wird nun mit dem Blockpodest bedeckt, auf welchem der erste, der Koordinate A1a zugeordnete Tumorblock gelegt wird. Durch Abgleichen mit dem eingezeichneten Hämatoxylin-Eosin (HE) Schnitt wird nun mit der Hohlzylinder ein zylindrisches Gewebefragment aus dem tumorhaltigen Bereich des Spenderblocks entnommen. Nach Wegrücken von Abdeckpodest und Spenderblock kann die unmittelbar über dem vorgefertigten Loch liegender Zylinder auf Höhe des vorgebohrten Lochs positioniert werden und der Zylinder wird mit einem Stahldraht aus dem Hohlzylinder in das Loch hineingedrückt. Dabei wird darauf geachtet, dass die Oberfläche des Zylinders genau auf dem Niveau der Blockoberfläche zu liegen kommt. Danach wird der Mehrfachblockhalter eine Position weiterbewegt und das zweite leere Paraffinblock (Empfänger-Block) wird gleichermaßen bearbeitet. Nach Füllung der Löcher an Koordinate A1a der ersten sechs TMA-Replikat kann ein zweiter Mehrfachblockhalter eingesetzt werden, sodass weitere sechs Kopien des geplanten TMA-Blocks hergestellt werden können. Falls benötigt können weitere Mehrfachblockhalter dazu verwendet werden und so die Zahl der Replikat auf 18, 24 oder mehr zu steigern. Nach Füllung der Position A1a in allen Replikatblöcken wird der elektrische Schrittmotor betätigt und der Array wird auf die Position A1b vorgeschoben danach wird die Prozedur mit dem zweiten Tumor-Spenderblock der für den TMA vorgesehenen Tumorkohorte weitergeführt. Die TMA-Herstellung ist abgeschlossen, wenn alle vorgesehenen Replikat entweder komplett vollgebaut sind (letzte Tumorposition an Position F9e gefüllt) oder aber alle dafür vorgesehenen Tumoren in den TMA eingebaut sind.



A



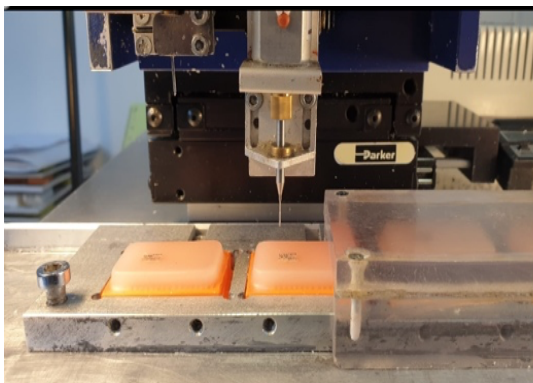
B



C



D



E



F

Abbildung 15: **Prozessschritte der TMA-Herstellung.** A Geordnete Schnitte und korrespondierende Blöcke in zu stanzender Reihenfolge. B Lochbohrung im ersten Empfängerblock. C Gewebeentnahme mit Hilfe einer Hohlneedle aus dem Spenderblock. D Einbringen der Gewebestanze in den Empfängerblock. E Danach erfolgt die Lochbohrung im zweiten Empfängerblock (Replikat), der wie im vorherigen Block gleichermaßen bearbeitet wird. F Sechs hergestellte identische Replikate.

2.2 TMAs für die Desmoglein 3 Studie

Für das vorliegende Projekt wurden zwei verschiedene TMA-Typen verwendet, ein Normalgewebe TMA und ein Multitumor TMA.

Der Normalgewebe TMA beinhaltet jeweils acht Proben von acht verschiedenen Patienten aus 76 verschiedenen Gewebekategorien. Ein Übersichtsbild des Normalgewebe TMAs ist in Abbildung 16 dargestellt. Die genaue Zusammensetzung dieses TMAs ist in Tabelle 3 gezeigt.

NTA11

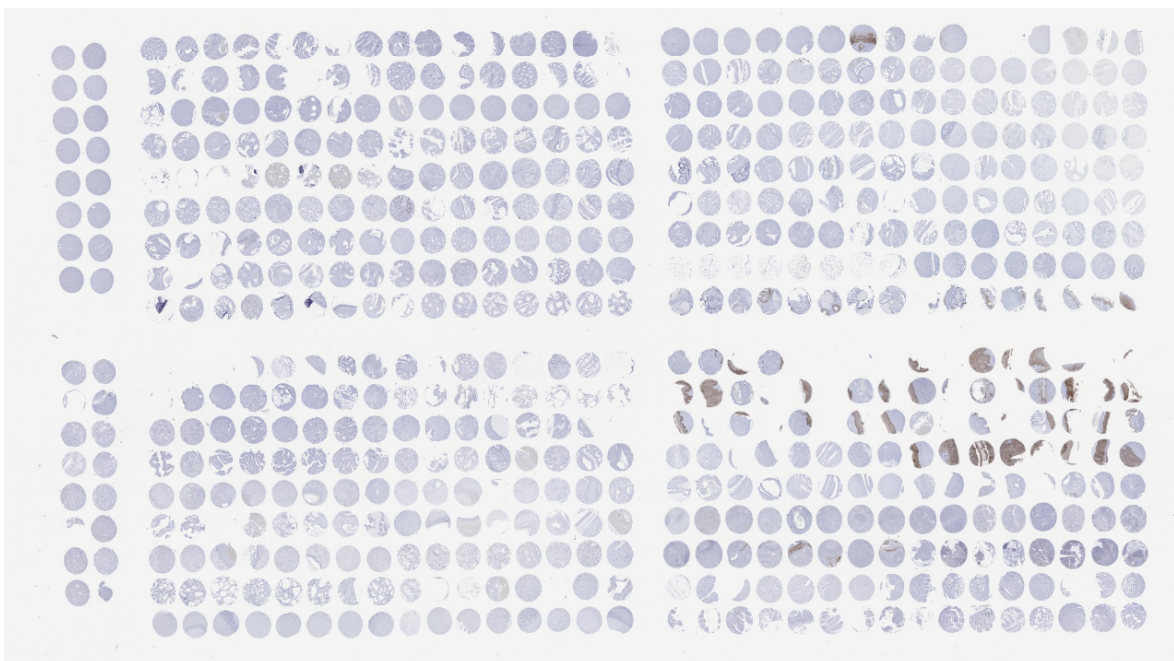


Abbildung 16: Übersichtsbild des Normalgewebe TMAs (Arrayname NTA11)

Tabelle 3: **Normalgewebe Tissue-Microarray**. Gewebeproben sortiert nach der auf dem Paraffinblock aufgetragenen Reihenfolge. Angegeben sind das Organ und der Gewebetyp.

Zusammensetzung des Normalgewebe TMAs; Organ, Gewebe			
1.	Aorta, Endothel	39.	Rektum, Mukosa
2.	Aorta, Media	40.	Gallenblase, Epithel
3.	Herz	41.	Leber
4.	Quergestreifte Skelettmuskulatur	42.	Pankreas
5.	Zunge, Muskulatur	43.	Glandula parotidea
6.	Uterus, Myometrium	44.	Glandula submandibularis
7.	Appendix, muskuläre Wand	45.	Glandula sublingualis
8.	Ösophagus, muskuläre Wand	46.	Knochenmark
9.	Magen, muskuläre Wand	47.	Duodenum, Brunner-Drüse
10.	Ileum, muskuläre Wand	48.	Niere, Kortex
11.	Colon descendes, muskuläre Wand	49.	Niere, Mark
12.	Nierenbecken, muskuläre Wand	50.	Prostata
13.	Harnblase, muskuläre Wand	51.	Glandula vesiculosa
14.	Penis, Corpus spongiosum	52.	Nebenhoden
15.	Ovar, Stroma	53.	Hoden
16.	Fettgewebe	54.	Bronchus, Mukosa
17.	Haut	55.	Bronchialdrüse
18.	Haut, Haarfollikel, Talgdrüse	56.	Sinus paranasalis
19.	Lippe, Mundschleimhaut	57.	Lunge
20.	Mundhöhle	58.	Mamma
21.	Tonsille, Oberflächenepithel	59.	Endozervix
22.	Analkanal, Zona cutanea	60.	Endometrium, Proliferationsphase
23.	Analkanal, Zona transitionalis	61.	Endometrium, Sekretionsphase
24.	Ektozervix	62.	Tuba uterina, Mukosa
25.	Ösophagus, Plattenepithel	63.	Unreife Plazenta, Dezidua
26.	Nierenbecken, Urothel	64.	Ovar, Corpus luteum
27.	Harnblase, Urothel	65.	Ovar, folliculäre Zyste
28.	Ausgereifte Plazenta mit Amnion und Chorion	66.	Unreife Plazenta
29.	Lymphknoten	67.	Reife Plazenta
30.	Milz	68.	Nebennierenrinde
31.	Thymus	69.	Nebenschilddrüse
32.	Tonsille	70.	Schilddrüse
33.	Magen, Antrum	71.	Kleinhirn, Stratum moleculare
34.	Magen, Corpus	72.	Kleinhirn, Stratum neuronorum
35.	Duodenum, Mukosa	73.	Großhirn, Rinde
36.	Ileum, Mukosa	74.	Großhirn, Mark
37.	Appendix, Mukosa	75.	Hypophyse, Hinterlappen und Infundibulum
38.	Colon descendes, Mukosa	76.	Hypophyse, Vorderlappen

Für die Tumoruntersuchungen wurden insgesamt 44 TMA-Blöcke, welche jeweils 386 bis 604 verschiedene Tumoren beinhalteten, verwendet. Die genaue Zusammensetzung des TMAs ist in Tabelle 4 dargestellt. Die TMAs beinhalteten insgesamt 15,869 Primärtumoren von 137 Tumortypen und Subtypen. Detaillierte Angaben zu histopathologischen und oder molekularen Werten wie beispielsweise pT-Stadium, Pn-Status, Blutgefäßinvasion (V), Lymphgefäßinfiltration (L), Zustand von Mismatch-Reparaturenengen (MMR-Status), über das Vorhandensein von RAS-Mutationen waren zumindest teilweise verfügbar von Mammakarzinomen von nicht speziellem Typ (n=600), Urothelkarzinomen (n=1.073), kolorektalen Karzinomen (n=2.351), Magenkarzinomen (n=327) und Adenokarzinomen des Pankreas (n=598). Angaben zum Grad, pT-Stadium und HPV-Status waren von insgesamt 902 Plattenepithelkarzinomen von verschiedenen Ursprungsorten vorhanden. Alle Proben stammten von den Archiven des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorfs, des Instituts für Pathologie des klinischen Zentrums Osnabrück und von der Abteilung für Pathologie des akademischen Lehrkrankenhauses in Fürth. Alle Gewebe waren in vierprozentigem gepuffertem Formalin fixiert worden und danach in Paraffin eingebettet. Die Verwendung von archivierten Überresten von diagnostischem Gewebe für die Herstellung von Tissue-Microarrays und deren Nutzung für wissenschaftliche Analysen einschließlich der Verwendung von Patientendaten waren in Übereinstimmung mit den örtlichen Gesetzen (HmbKHG, §12) erlaubt und zudem von der örtlichen Ethikkommission genehmigt (Ethikkommission Hamburg, WF-049/09). Alle Arbeiten wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

Tabelle 4: Auflistung der untersuchten Tumorentitäten im Multitumor-Array.

Tumorgruppe	Tumortyp/ -subtyp	Fallzahl (N)
Tumoren der Haut	Pilomatrixom	35
	Basalzellkarzinom	88
	Nävuszellnävus	29
	Plattenepithelkarzinom der Haut	90
	Malignes Melanom	46
	Malignes Melanom mit Lymphknotenmetastasierung	86
	Merkelzellkarzinom	46
Tumoren des Kopfes und des Nackens	Plattenepithelkarzinom des Larynx	109
	Plattenepithelkarzinom des Pharynx	60
	Orales Plattenepithelkarzinom des Mundboden	130
	Pleomorphes Adenom der Parotisdrüse	50
	Warthintumor der Parotis	49
	Basalzelladenom der Speicheldrüsen	15
Tumoren der Lunge, Pleura und des Thymus	Adenokarzinom der Lunge	196
	Plattenepithelkarzinom der Lunge	80
	Kleinzelliges Karzinom der Lunge	16
	Epitheloides Mesencheliom	39
	Mesencheliom, sonstige	76
	Thymom	29
Tumoren des weiblichen Genitaltraktes	Plattenepithelkarzinom der Vagina	78
	Plattenepithelkarzinom der Vulva	130
	Plattenepithelkarzinom der Zervix	128
	Adenokarzinom der Zervix	21
	Endometrioides Endometriumkarzinom	236
	Seröses Endometriumkarzinom	82
	Karzinom des Uterus	48
	Endometriumkarzinom, high grade, G3	13
	Klarzelliges Endometriumkarzinom	8
	Endometrioides Ovarialkarzinom	110
	Seröses Ovarialkarzinom	559
	Muzinöses Ovarialkarzinom	96
	Klarzelliges Ovarialkarzinom	50
	Karzinom des Ovars	47
	Granulosazelltumor des Ovars	37
	Leydigzelltumor des Ovars	4
	Sertolizelltumor des Ovars	1
	Sertoli-Leydigzelltumor des Ovars	3
	Steroidzelltumor des Ovars	3
Brenner Tumor	41	

Tabelle 4: Auflistung der untersuchten Tumorentitäten im Multitumor-Array.

Tumoren der Mamma	Invasives Mammakarzinom, nicht spezieller Typ	499
	Lobuläres Mammakarzinom	192
	Medulläres Mammakarzinom	23
	Tubuläres Mammakarzinom	20
	Muzinöses Mammakarzinom	29
	Phylloides Mammakarzinom	50
Tumoren des Verdauungs-Systems	Adenomatöser Polyp, low-grade Dysplasie	50
	Adenomatöser Polyp, high-grade Dysplasie	50
	Adenokarzinom des Kolons	2482
	Adenokarzinom des Magens, diffuser Typ	176
	Adenokarzinom des Magens, intestinaler Typ	174
	Adenokarzinom des Magens, gemischter Typ	62
	Adenokarzinom des Ösophagus	83
	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	76
	Plattenepithelkarzinom des Analkanals	89
	Cholangiozelluläres Karzinom	50
	Adenokarzinom der Gallenblase	31
	Klatskintumor der Gallenblase	41
	Hepatozelluläres Karzinom	300
	Duktales Adenokarzinom des Pankreas	612
	Pankreatisch-ampulläres Karzinom	89
	Azinuszellkarzinom des Pankreas	16
Gastrointestinaler Stromatumor (GIST)	50	
Tumoren des Harntrakts	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2, low grade	177
	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2, high grade	141
	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa, G3	219
	Urothelkarzinom, pT2-4 G3	735
	Plattenepithelkarzinom der Blase	22
	Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom der Blase	23
	Sarkomatoides Urothelkarzinom	25
	Urothelkarzinom (Nierenbecken)	62
	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	1287
	Papilläres Nierenzellkarzinom	368
	Klarzelliges (tubuläres) papilläres Nierenzellkarzinom	26
	Chromophobes Nierenzellkarzinom	170
	Onkozytom	257

Tabelle 4: Auflistung der untersuchten Tumorentitäten im Multitumor-Array.

Tumoren des männlichen Genitaltraktes	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 3+3	83
	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 4+4	80
	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 5+5	85
	Adenokarzinom der Prostata (Rekurrenz)	258
	kleinzelliges neuroendokrines Karzinom der Prostata	19
	Seminom	621
	Embryonales Karzinom des Hodens	50
	Leydigzelltumor des Hodens	30
	Sertolizelltumor des Hodens	2
	“Sex-cord“-Stromatumor des Hodens	1
	Spermatozytischer Tumor des Hodens	1
	Dottersacktumor	50
	Teratom	50
	Plattenepithelkarzinom des Penis	80
Tumoren des endokrinen Systems	Schilddrüsenadenom	113
	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	391
	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	154
	Medulläres Schilddrüsenkarzinom	111
	Nebenschilddrüsenadenom	43
	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	45
	Nebennierenrindenadenom	50
	Nebennierenrindencarzinom	26
	Phäochromozytom	50
	Neuroendokriner Tumor des Appendix	22
	Kolorektaler Neuroendokriner Tumor	12
	Neuroendokriner Tumor des Ileum	49
	Neuroendokriner Tumor der Lunge	19
	Neuroendokriner Tumor des Pankreas	97
	Kolorektales Neuroendokrines Karzinom	12
	Neuroendokrines Karzinom der Gallenblase	4
	Neuroendokrines Karzinom des Pankreas	14
Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes	Hodgkin Lymphom	103
	Kleinzelliges lymphozytisches B-Zell Lymphom	50
	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom	113
	Follikuläres Lymphom	88
	T-Zell Non-Hodgkin Lymphom	25
	Mantelzell-Lymphom	18
	Marginalzonenlymphom	16
	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom des Hoden	16
Burkitt Lymphom	5	

Tabelle 4: Auflistung der untersuchten Tumorentitäten im Multitumor-Array.

Tumoren des Weichteilgewebes und des Knochens	Tendosynoviales großzelliges Tumor	45
	Granulosazelltumor	53
	Leiomyoma	50
	Leiomyosarkoma	87
	Liposarkoma	132
	Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST)	13
	Myofibrosarkom	26
	Angiosarkom	73
	Angiomyolipom	91
	Dermatofibrosarkom protuberans	21
	Ganglioneurom	14
	Kaposi-Sarkom	8
	Neurofibrom	117
	Sarkom, nicht spezifiziert (NOS)	74
	Paragangliom	41
	Ewing sarkom	23
	Rhabdomyosarkom	6
	Schwannom	121
	Synovial Sarkom	12
	Osteosarkom	43
Chondrosarkom	38	
Rhabdoid tumor	5	
Summe	15869	

2.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, welches die Visualisierung von spezifischen Proteinen an Gewebeschnitten ermöglicht (Sternberger et al., 1970). In vielen Fällen erlaubt der Nachweis von gewebespezifischen Proteinen eine bessere Einordnung eines histologischen Befundes. Dies gilt insbesondere für Tumoren, wo beispielsweise der Nachweis vom prostataspezifischen Antigen (PSA) im Falle einer Adenokarzinommetastase die Zuordnung dieser Metastase zu einem primären Prostatakarzinom ermöglicht (Epstein et al., 1993). Im Grundsatz ist die Methode einfach. Ein Antikörper gegen das Zielprotein wird auf einen Gewebeschnitt aufgebracht, sodass sich der Antikörper- wenn diese vorhanden sind – an die Zielproteine bindet.

Nach Abwaschen von überflüssigem, nicht gebundenem Antikörper kann der gebundene Antikörper mit einem Visualisierungssystem detektiert werden. Kernpunkt aller Visualisierungssysteme sind Sekundärantikörper, welche aus einer anderen Spezies gewonnen wurden als die Primärantikörper und sich an den Fc-Teil der diagnostischen Primärantikörper bindet. Durch die Kopplung des Sekundärantikörpers an ein Visualisierungssystem kann die Bindung des Sekundärantikörpers an dem Primärantikörper sichtbar gemacht werden (Ramos-Vara und Miller, 2014).

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung ist in Abbildung 17 schematisch dargestellt.

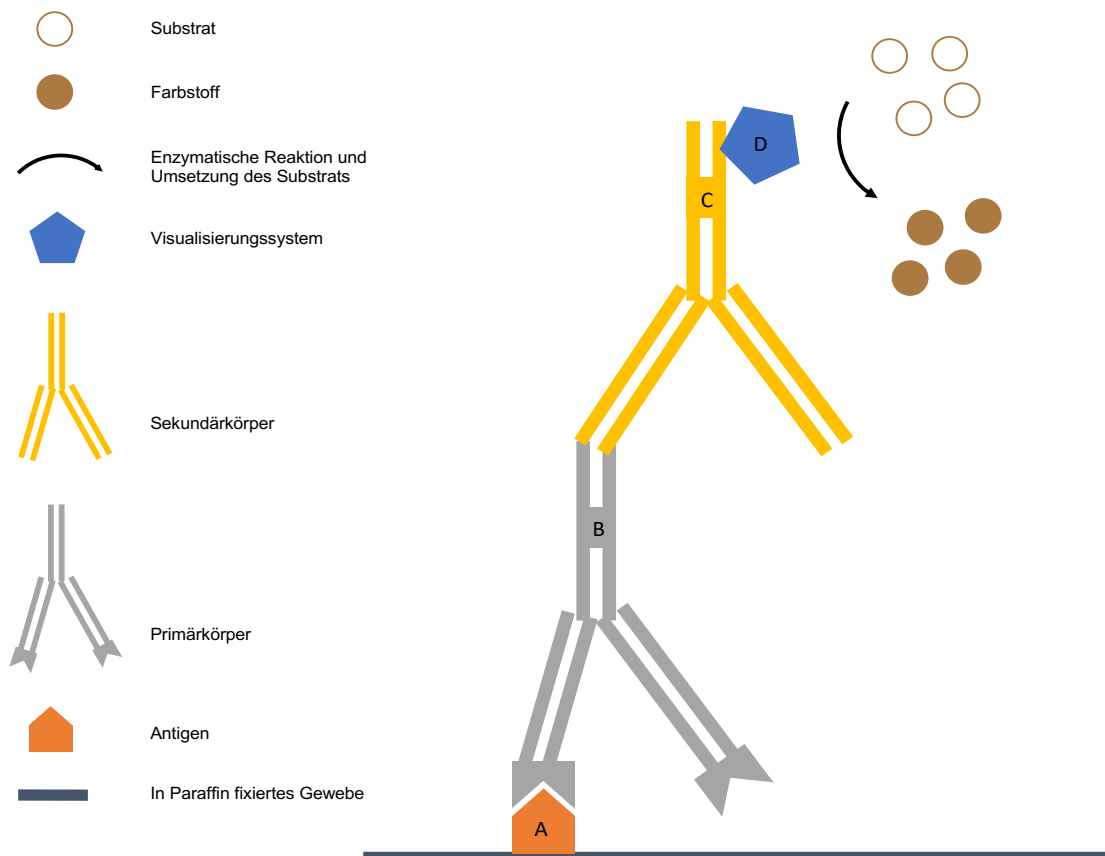


Abbildung 17: **Schematische Darstellung der immunhistochemischen Antigen-detektion.** Modifiziert nach (Ramos-Vara und Miller et al., 2014).

In der Praxis gibt es allerdings zwei besondere Schwierigkeiten, mit denen die diagnostische Immunhistochemie in Pathologie-Instituten zu kämpfen hat.

Schwierigkeit Nummer eins ist die routinemäßige Fixierung von diagnostischen Gewebeproben. Die Fixierung hat den Zweck die Autolyse von aus dem Körper entnommenen Geweben zu verhindern (Howat und Wilson, 2014). Im Falle von Formalin, dem am häufigsten verwendeten Fixativ kommt es dabei zu einem „Crosslinking“ (Vernetzung) von Proteinen, welche sich mit anderen Proteinen und Nukleinsäuren vernetzen. Die damit verbundene Veränderung der Sekundärstruktur führt zur Maskierung zahlreicher Epitope, welche dann für Antikörper nicht oder nur eingeschränkt zugänglich sind. Zudem können zusätzliche Epitope entstehen (Shi et al., 1991). Antikörper, welche an unfixierten Geweben perfekt funktionieren und an unfixierten Proteinen durch Westernblot, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder Protein-Arrays validiert worden sind, funktionieren deswegen an formalinfixiertem Gewebe häufig nicht oder nur ungenügend (Howat und Wilson, 2014; Shi et al., 1991). Die internationale Arbeitsgruppe für Antikörpervalidierung (The International Working Group for Antibody Validation, IWGAV) hat deswegen postuliert, dass Antikörper für die Verwendung an formalinfixierten Geweben entweder durch einen Vergleich mit einem anderen Verfahren für die Expressionsmessung oder aber durch Vergleich mit den Färbe-Ergebnissen eines anderen (gegen das gleiche Protein gerichteten) Antikörpers validiert werden müssen (Uhlen et al., 2016). Durch Anwendung der hitzeinduzierten Epitop Demaskierung (Heat induced epitope retrieval, HIER) lässt sich die formalinbedingte Proteinvernetzung teilweise beheben, sodass viele Antikörper nach Behandlung für die Immunhistochemie vorgesehenen Schnitte mit Flüssigkeit und großer Hitze für immunhistochemische Färbung verwendet werden können. Allerdings ist auch nach der „HIER“-Prozedur kein Bindungsverhalten der Antikörper zu erwarten, welches denjenigen bei unfixierten Proteinen entsprechen würde (Fritschy, 2008; Stevens et al., 2016).

Schwierigkeit Nummer zwei ist die inhärente Variabilität von Antikörpern. Die meisten verfügbaren Antikörper sind durch die Vakzinierung eines Labortiers mit dem Zielprotein oder Teilen davon (sogenannte Peptide) hergestellt worden. Derartige Beimpfungen führen zur Ausbildung von zahlreichen verschiedenen Antikörpern, welche alle gegen das gleiche Protein gerichtet sind, sich aber in ihren Bindungseigenschaften (Affinität, Spezifität und Sensitivität) unterscheiden (Saper, 2009). Die Zahl der unterschiedlichen Antikörper, welche bei Inkubation mit einem Protein gebildet werden, unterscheidet sich zwischen Spezies (Forthal, 2014; Kurosawa et al., 2012; Lu et al., 2020; Saper, 2009).

Die zu erwartenden Werte für Maus, Kaninchen und Mensch sind in Tabelle 5 aufgelistet. Bis heute gibt es keine Verfahren, welche es erlauben von den zahllosen verschiedenen gegen ein bestimmtes Protein gebildeten Antikörpern eines Labortiers den besten zu extrahieren und nachher in ein kommerzielles Produkt zu verwandeln. Die Antikörperherstellung verläuft deswegen weitgehend zufällig, sodass unterschiedliche Hersteller bei dem Versuch Antikörper gegen ein bestimmtes Protein herzustellen immer Antikörper erzeugen werden, welche sich in ihren Eigenschaften von allen bisher zur Verfügung stehenden Antikörpern gegen das Zielprotein unterscheiden (Cheung et al., 2012; Eyer et al., 2020; Gérard et al., 2020; Wine et al., 2015, 2013). Die inhärente biologische Variabilität von Antikörpern ist eine wichtige Ursache dafür, dass sich die Ergebnisse von Studien zur Expressionshäufigkeit und Bedeutung der Expression bestimmter Proteine bei bestimmten Tumorarten teilweise eklatant voneinander unterscheiden (Butko et al., 2014; Ma et al., 2020). Die mit einem Antikörper „a“ erzielten Studiendaten sind bei Verwendung eines Antikörpers „b“ nicht sicher anwendbar.

Spezies	Die Zahl der zu erwartenden verschiedenen Antikörper (n)
Maus	30-77 (Eyer et al., 2020, Gerard et al., 2020) 100 (Goodman et al., 2018)
Kaninchen	12-30 (Wine et al. 2013, Cheung et al., 2012)
Mensch	50-400 (Wine et al., 2015) 40-147 (Lee et al., 2016)

Tabelle 5: **Die Zahl der unterschiedlichen Antikörper, welche bei Inkubation mit einem Protein gebildet werden.** Dargestellt für Maus, Kaninchen und Mensch.

2.4 Desmoglein 3 Immunhistochemie

Alle immunhistochemischen Untersuchungen der 44 für das Projekt benötigten TMA-Schnitte wurden an einem Tag, in einem einzigen Reagenziensatz und unter absolut identischen Bedingungen durchgeführt. Die TMA-Schnitte (2,5µm Schnittdicke) wurden am Vortag hergestellt und auf Objektträger aufgebracht. Im Rahmen der Vorbereitung für immunhistochemischen Untersuchungen und zum Zweck der Entparaffinierung wurden die TMA-Schnitte zunächst über Nacht im Brutschrank bei 60 °C gelagert, mit Xylol behandelt, mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und anschließend unter destilliertem Wasser abgespült. Die Vorbehandlung der Schnitte beinhaltete eine hitzeinduzierte Antigendemaskierungsprozedur, für fünf Minuten in einem Autoklav bei 121°C unter Zugabe von Tris-EDTA-Citrat Puffer mit einem pH-Wert von 7,8 (Target Retrieval Solution, Dako). Zur Vermeidung einer unspezifischen Antikörperbindung erfolgt nun die Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität. Hierzu werden die Objektträger in einer feuchten Kammer ausgelegt, mit Blocking Solution (Dako #52023) für 10 Minuten behandelt und dreimal mit TBS-T-Puffer für je fünf Minuten gespült. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Desmoglein 3 spezifischen Primärantikörper (monoklonaler Maus-Antikörper, MSVA-543M, #4355-543M, MS Validated Antibodies, Hamburg, Deutschland,) bei 37 °C für 60 Minuten in einer Verdünnung von 1:150 und die erneute Spülung mit TBS-T-Puffer. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Dako EnVision, mouse/rabbit #K5007) für 30 Minuten bei 37 °C. Eine Behandlung mit TBS-T Puffer ist auch bei diesem Arbeitsschritt erforderlich, um unspezifische Antikörperreaktionen zu vermeiden. Schließlich wurde die Antigen-Antikörper-Reaktion mit dem EnVision- Kit (#K5007) gemäß den Anweisungen des Herstellers visualisiert. Nach Spülung unter destilliertem Wasser wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt, in Leitungswasser gebläut, in aufsteigender Alkoholreihe und anschließender Xylol-Behandlung dehydriert und zuletzt mit einer Folie im Automaten eingedeckt. Eine genaue Übersicht der Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung ist in Tabelle 6 dargestellt.

Zum Zweck der Antikörpervalidierung wurde der Normalgewebe TMA mit einem weiteren Antikörper gegen Dsg3 (EPR14101, ab183743, Abcam, Cambridge, UK) in einer Verdünnung von 1:150 und einem ansonsten identischen Protokoll gefärbt.

Tabelle 6: Färbeprotokoll der Desmoglein 3 Immunhistochemie. Dargestellt sind die verschiedenen Schritte des Färbeprozesses.

Ziel	Reagenzien und Arbeitsschritte
1.Vorbereitung der Objektträger (Entparaffinierung)	Von jedem TMA-Block wird ein 2,5 µm dicker Schnitt hergestellt und Schnitte über Nacht bei 60°C im Brutschrank lagern
	Xylol-Behandlung (3 mal 5 Minuten)
	Rehydrierung mittels einer absteigenden Alkoholreihe → Spülung mittels Aqua destillata
2.Vorbehandlung (Demaskierung der Antigene)	Inkubation mit Tris-EDTA-Citrat-Puffer (pH 7,8) im Autoklav → Target Retrieval Solution Buffer, DAKO (5 min., 121 °C)
	Spülen mit Aqua destillata (2-mal)
	Inkubation im Brutschrank und Spülung mit TBS-T-Puffer (5 min)
3. Peroxidaseblock	H ₂ O ₂ Behandlung (Peroxidase Blocking Solution) → Vermeidung der nicht spezifischen Antikörperbindung (10 min)
	Inkubation im Brutschrank und Spülung mit TBS-T-Puffer (2*5 min)
4. Inkubation mit dem Primäantikörper	Inkubation mit Primäantikörper; MSVA-543M, #4355-543M; Verdünnung: 1:150 (60 min bei 37 °C)
	Inkubation im Brutschrank und Spülung mit TBS-T-Puffer (3*5 min)
5. Inkubation mit dem Sekundärkörper	Zugabe des Sekundärantikörpers (Dako EnVision, mouse/rabbit) (30 min bei 37 Grad)
	Inkubation im Brutschrank und Spülung mit TBS-T-Puffer (3*5 min)
6.Chromogenprozess (Visualisierung)	Zugabe des Chromogens (DAB-Chromogen, Dako) (10 min bei Raumtemperatur)
	Spülen mit Aqua destillata
	Hämatoxylin (3 min)
	Bläuen mit Leitungswasser (5 min)
	Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe bis Xylol →Eindecken jedes Objektträgers im Eindeckautomaten

Für Tumorgewebe wurde der Prozentsatz der Dsg3-positiven Tumorzellen geschätzt und die Färbeintensität semiquantitativ erfasst (0, 1+, 2+, 3+). Für die statistische Analyse wurden die Färbeergebnisse wie folgt in vier Gruppen eingeteilt: Negativ: überhaupt keine Färbung, schwache Färbung: Färbeintensität von 1+ in $\leq 70\%$ oder Färbeintensität von 2+ in $\leq 30\%$ der Tumorzellen, mäßige Färbung: Färbeintensität von 1+ in $> 70\%$ der Tumorzellen, Färbeintensität von 2+ in $> 30\%$ aber in $\leq 70\%$ oder Färbeintensität von 3+ in $\leq 30\%$ der Tumorzellen, starke Färbung: Färbeintensität von 2+ in $> 70\%$ oder Färbeintensität von 3+ in $> 30\%$ der Tumorzellen. Tabelle 7 zeigt einen Überblick über die Auswertungskriterien.

Tabelle 7: Auswertungskriterien.

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

2.5 Statistik

Statistische Berechnungen wurden mit der Software JMP 16 (SAS Institute Inc., NC, USA) durchgeführt. Mit Hilfe von Kontingenztabellen und dem χ^2 -Test wurde nach Zusammenhängen zwischen Dsg3-Immunfärbung und Tumorphänotyp gesucht. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Technische Aspekte

Insgesamt 14.094 (88,8%) von 15.869 Tumorgewebsproben und mindestens jeweils vier Gewebeproben der einzelnen Normalgewebekategorien waren in unserer Tissue-Microarray Untersuchung auswertbar. Die Ursachen für nicht auswertbare Tumorgewebsproben lag entweder im kompletten Fehlen einzelner Stenzen an den vorgesehenen Koordinatenpunkten oder aber im fehlenden Nachweis einzelner Tumorzellen Gewebe.

3.2 Desmoglein 3 in Normalgeweben

Die Desmoglein 3 Immunfärbung war prinzipiell membranös, wobei bei starker membranöser Färbung oft ein zytoplasmatischer Färbeanteil sichtbar wurde. In Normalgeweben fand sich eine Desmoglein 3 Färbung insbesondere in verhornenden und nicht verhornenden Plattenepithelien, wobei das Ausmaß der Färbung zwischen einzelnen Gewebeproben variierte. In allen Fällen war aber die Dsg3 Färbung in den unteren/basalen Anteilen des Plattenepithels stärker ausgeprägt als in den höheren Zelllagen. Insbesondere bei verhorntem Plattenepithel war die obere Hälfte der Epithelschicht meist Dsg3 negativ. Auch Haarfollikel und Talgdrüsen der Haut waren kräftig Dsg3 positiv. Eine Dsg3 Färbung fand sich auch in anderen plattenepithelialen Strukturen wie beispielsweise in einzelnen Schichten des Kryptenepithels der Tonsille oder in Hassall-Körperchen des Thymus. Auch andere epitheliale Thymuszellen waren Dsg3 positiv. In nicht plattenepithelialen Geweben war eine Dsg3 Färbung selten anzutreffen und typischerweise schwächer ausgeprägt. Eine schwache bis mäßig starke Dsg3 Färbung konnte in einem Teil der Zellen des respiratorischen Epithels, einzelne Kryptenzellen des Duodenums und des Ileums sowie in einigen Basalzellen von kleinen Ausführungsgängen von Speicheldrüsen gefunden werden. Repräsentative Bilder unserer Studie sind in den Abbildungen 18 A- H dargestellt. Alle diese Färbeergebnisse waren nicht nur mit dem Studienantikörper MSVA-543M sondern auch mit dem Validierungsantikörper EPR14101 nachweisbar. Eine vergleichende Darstellung der Befunde mit beiden Antikörpern an konsekutiven Schnitten ist in Abbildungen 19 A-F dargestellt. Eine Dsg3 Färbung war nicht nachweisbar in den Organen: Magen, Kolorektum, Pankreas, Leber, Gallenblase, Brunner-Drüsen, Niere, Prostata, Samenblasen, Hoden, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Nebenniere, Bronchialdrüsen, Lunge, Brustdrüsen, Endometrium, Endozervix, Eileiter, Ovar (einschließlich Follikelzysten und corpora lutea), mesenchymalen Geweben, lymphatischen Organe, Knochenmark, Hypophyse und dem Gehirn.

A)

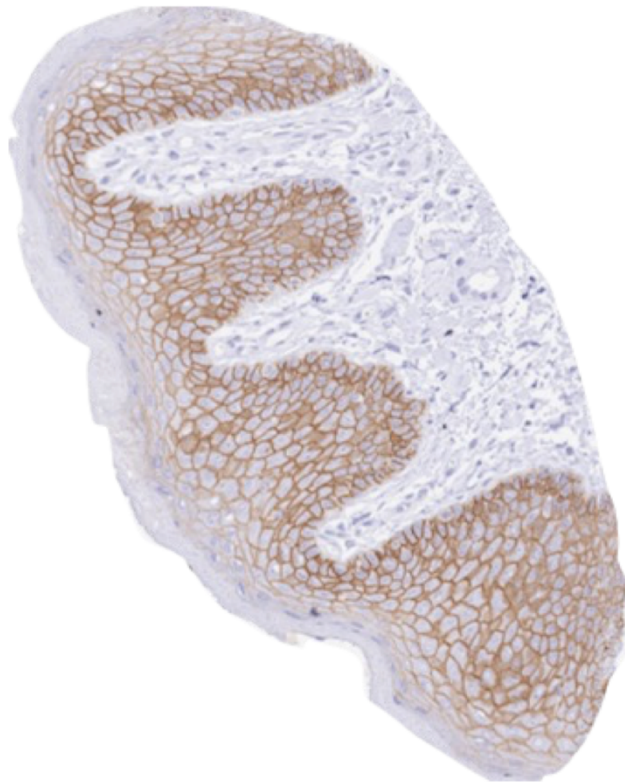


Abbildung 18: **Haut**: Mäßige bis starke membranöse Dsg3-Färbung der basalen und suprabasalen Zellschichten der Epidermis der Haut.

B)

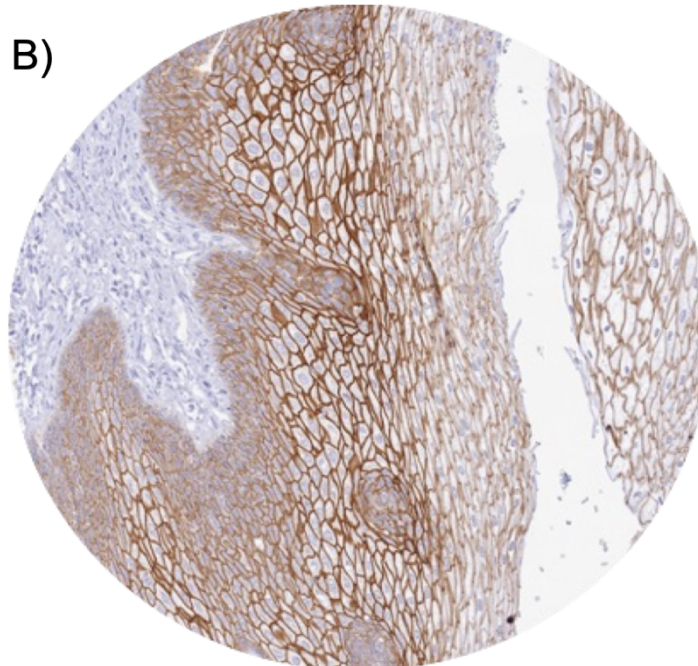


Abbildung 18: **Ösophagus**: Mäßige bis starke Dsg3-Positivität des Plattenepithels des Ösophagus.

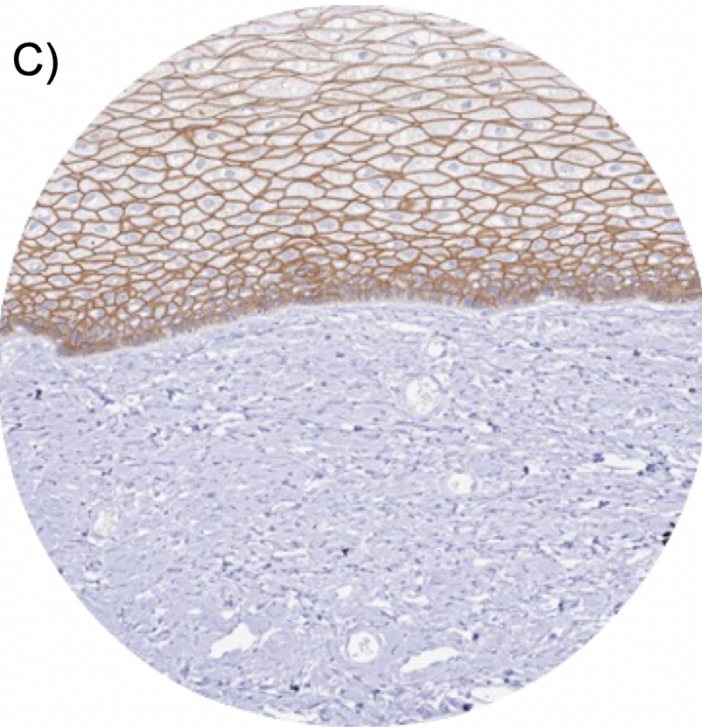


Abbildung 18: **Zervix**: Mäßige bis starke Dsg3-Positivität des Plattenepithels der Zervix.

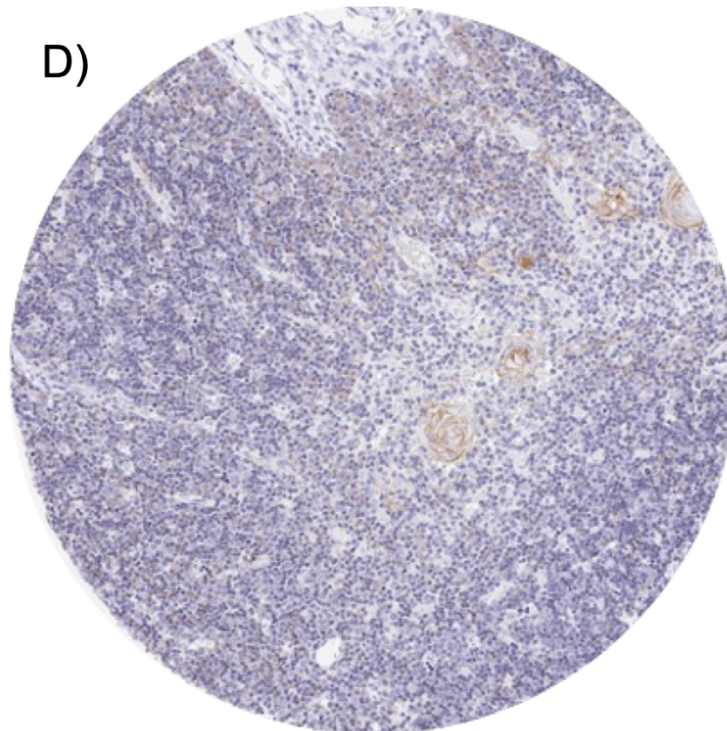


Abbildung 18: **Thymus**: Schwache Dsg3-Positivität der Hassall-Körperchen und anderer Epithelzellen des Thymus.

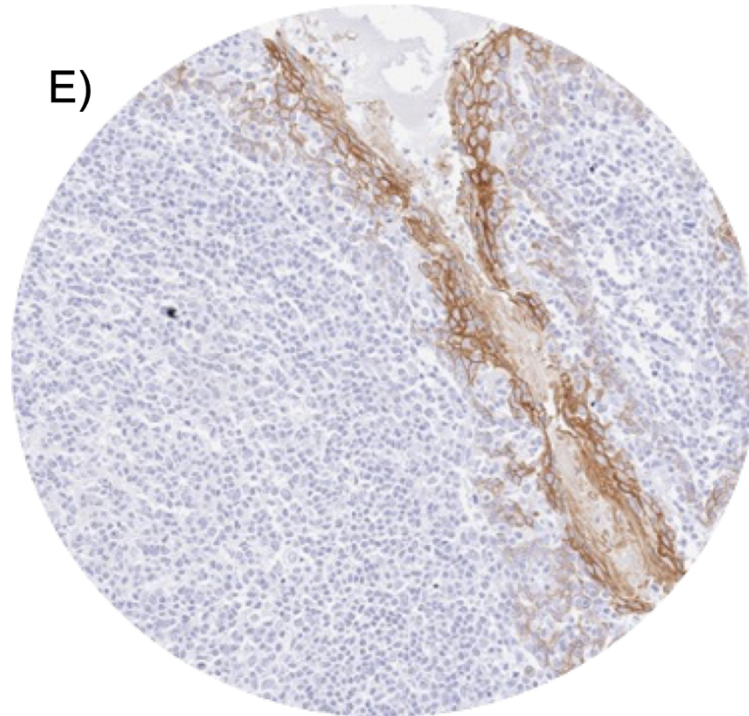


Abbildung 18: **Tonsille**: Mäßige Dsg3-Färbung in einer Untergruppe von Zellen des Plattenepithels der Tonsillenkrypten.

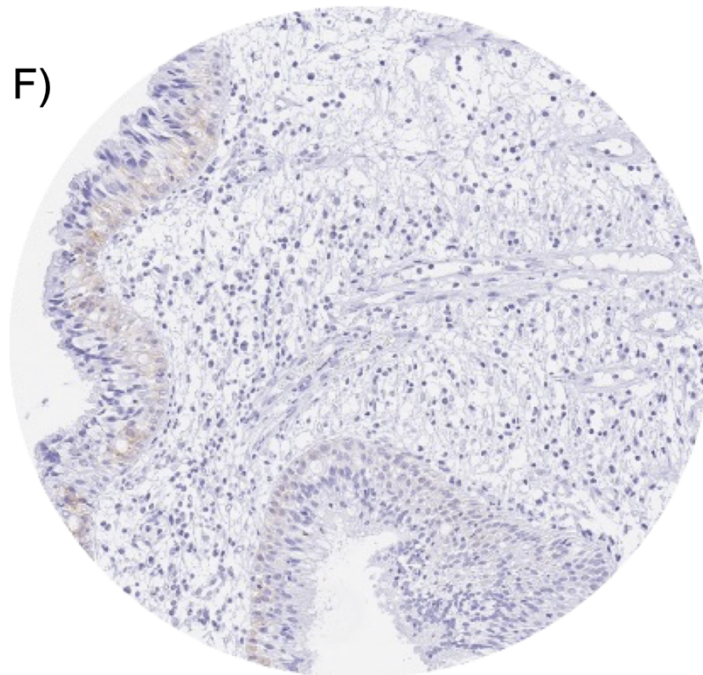


Abbildung 18: **Bronchus (respiratorisches Epithel)**: Schwache Dsg3-Färbung einer Fraktion von Zellen des respiratorischen Epithels des Bronchus.

G)

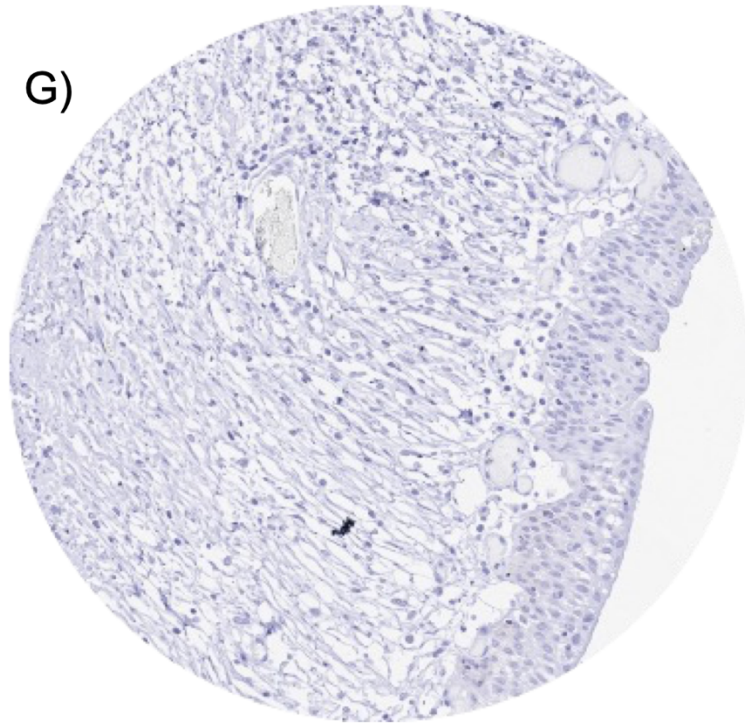


Abbildung 18: **Harnblase**: Keine Dsg3-Färbung im normalen Urothel der Harnblase.

H)

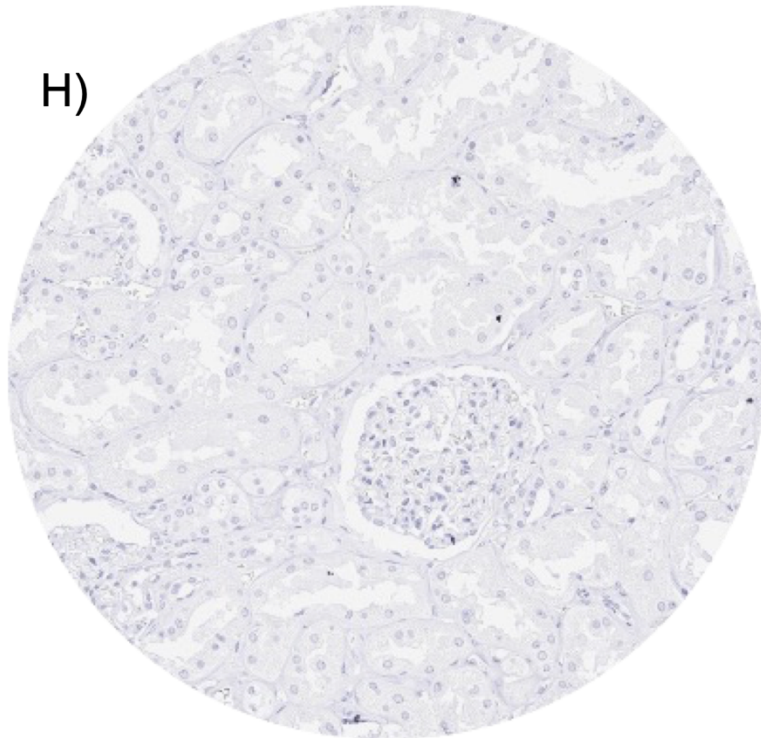


Abbildung 18: **Niere, Rinde**: Keine Dsg3-Färbung

Die folgenden Abbildungen 19 A-F stellen die Befunde mit dem Antikörper MSVA-543M sowie dem Validierungsantikörper EPR14101 an konsekutiven Schnitten dar und zeigen die Übereinstimmung der mit zwei unabhängigen Dsg3-Antikörpern erzielten immunhistochemischen Färbegergebnisse.

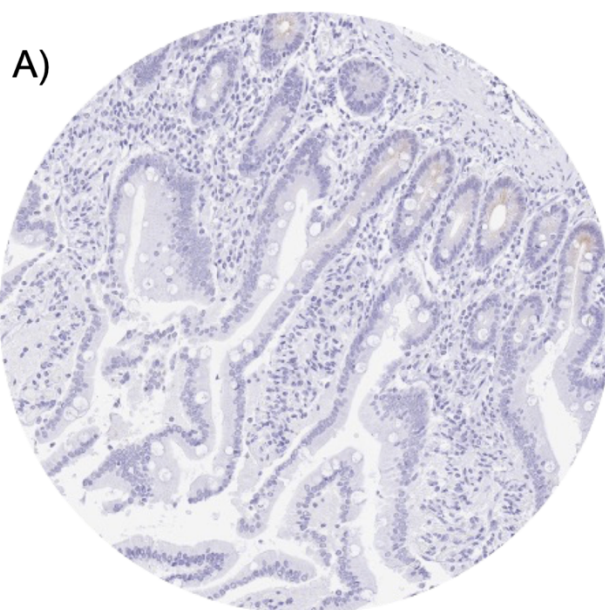


Abbildung 19: **Duodenum**: Schwache membranöse apikale Dsg3-Färbung in Kryptenepithelzellen (verwendeter Antikörper MSVA-543M).

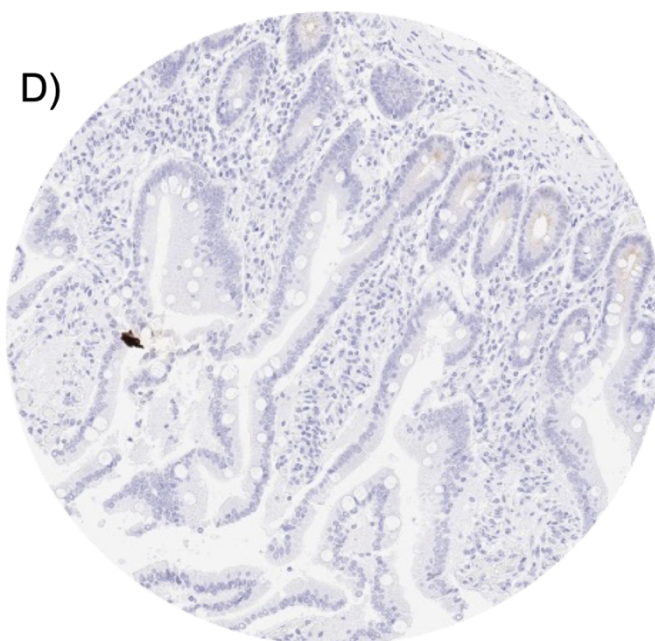


Abbildung 19: **Duodenum**: Schwache membranöse apikale Dsg3-Färbung in Kryptenepithelzellen (verwendeter Antikörper EPR141).

B)

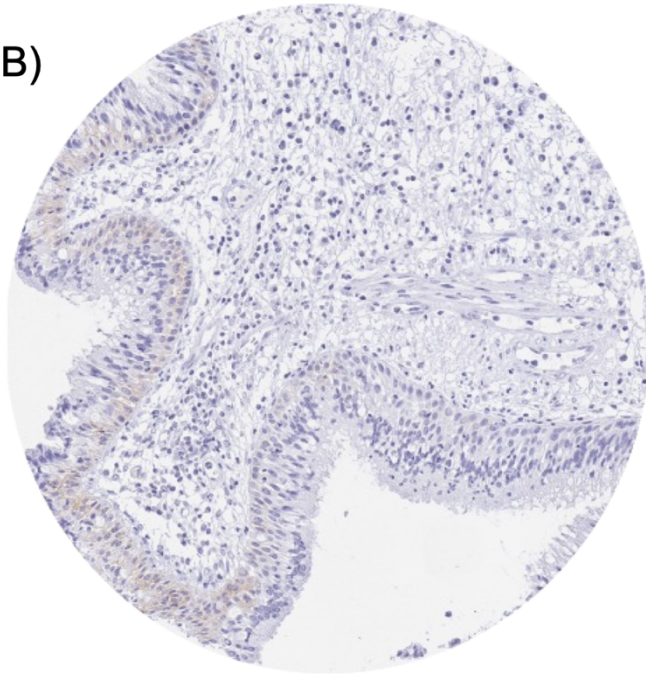


Abbildung 19: **Bronchus (respiratorisches Epithel)**: Schwache Dsg3-Färbung einer Fraktion von Zellen des respiratorischen Epithels des Bronchus (verwendeter Antikörper MSVA-543M).

E)

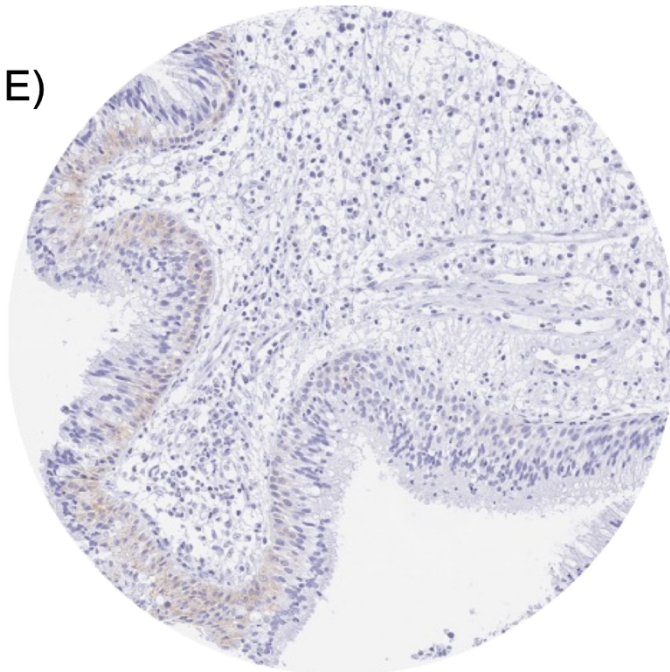


Abbildung 19: **Bronchus (respiratorisches Epithel)**: Schwache Dsg3-Färbung einer Fraktion von Zellen des respiratorischen Epithels des Bronchus (verwendeter Antikörper EPR14101).

C)

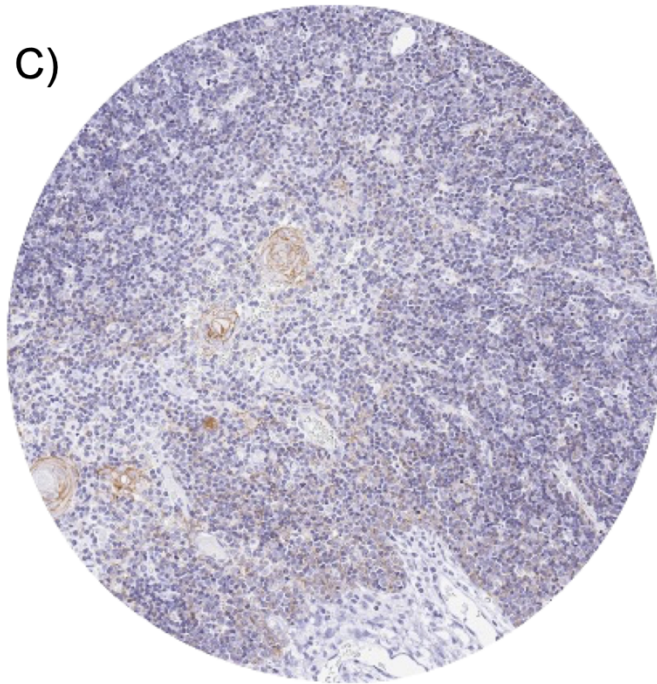


Abbildung 19: **Thymus**: Schwache Dsg3-Positivität der Hassall-Körperchen und anderer Epithelzellen des Thymus (verwendeter Antikörper MSVA-543M).

F)

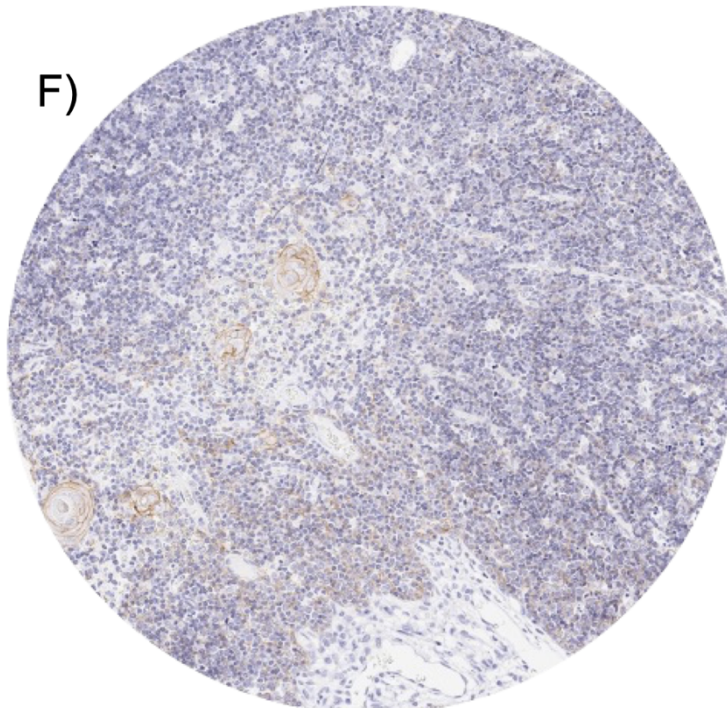


Abbildung 19: **Thymus**: Schwache Dsg3-Positivität der Hassall-Körperchen und anderer Epithelzellen des Thymus (verwendeter Antikörper EPR14101).

3.3 Desmoglein 3 in Tumoren

Ebenso wie in Normalgeweben war die Dsg3 Färbung in Tumoren überwiegend membranös und insbesondere bei starker Färbung, begleitet von einer meist deutlich schwächer ausgeprägten zytoplasmatischen Anfärbung. Eine rein zytoplasmatische Anfärbung war in keinem Tumor nachweisbar. Eine Dsg3 Färbung fand sich in 1,202 (8.5%) der 14,094 auswertbaren Tumoren. Darunter fanden sich 674 (4.8%) mit schwacher, 407 (2.9%) mit moderater und 121 (0.9%) der Tumoren mit starker Dsg3 Färbung. Insgesamt 47 (34.3%) von 137 Tumorkategorien zeigten mindestens in einem Fall eine nachweisbare Dsg3 Anfärbung, während 15 Tumorkategorien (10.9%) mindestens einen Fall mit starker Dsg3 Positivität aufwiesen. Die Häufigkeit der Dsg3 Positivität ist organsystematisch in Tabelle 8 dargestellt. Repräsentative Bilder von Dsg3 positiven und negativen Tumoren sind in Abbildungen 20 A-H dargestellt. Eine Dsg3 Positivität und auch eine starke Dsg3 Positivität fand sich am häufigsten in Plattenepithelkarzinomen unterschiedlicher Ursprungsorte (positiv in 71.2%-97.3%), Basalzellkarzinomen der Haut (41.9%), verschiedenen benignen Tumoren, hauptsächlich von den Speicheldrüsen (8,0%-38,9%) und in verschiedenen Kategorien urothelialer Neoplasien (2.1-20.7%). Eine Dsg3 Positivität in weniger als zehn Prozent der Fälle fand sich in den 23 zusätzlichen Tumorkategorien einschließlich eines Falles eines diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms.

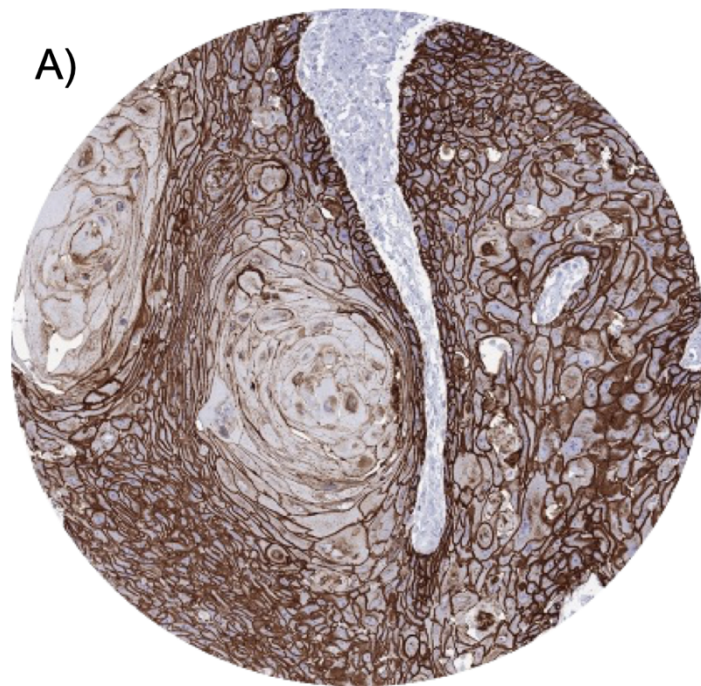


Abbildung 20: **Vulva**: Starke membranöse Dsg3-Immunfärbung in Tumorzellen eines Plattenepithelkarzinoms der Vulva.

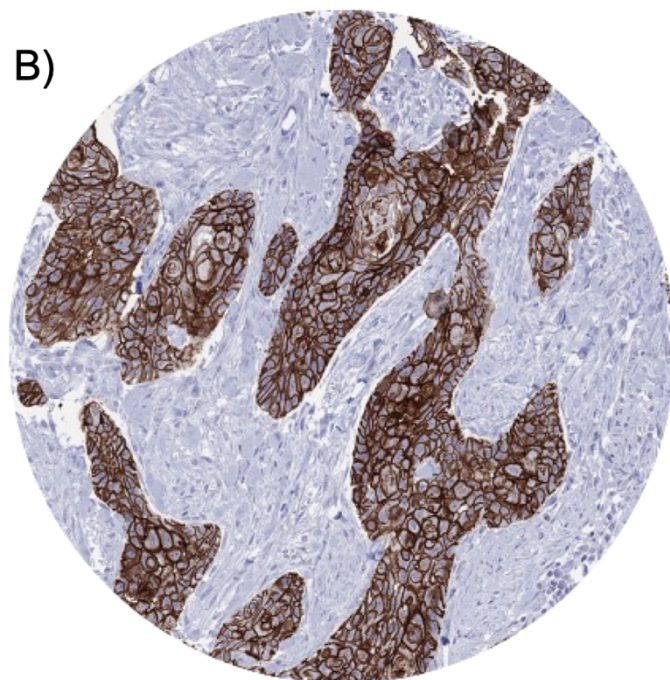


Abbildung 20: **Larynx**: Starke membranöse Dsg3-Immunfärbung in Tumorzellen eines Plattenepithelkarzinoms des Larynx.

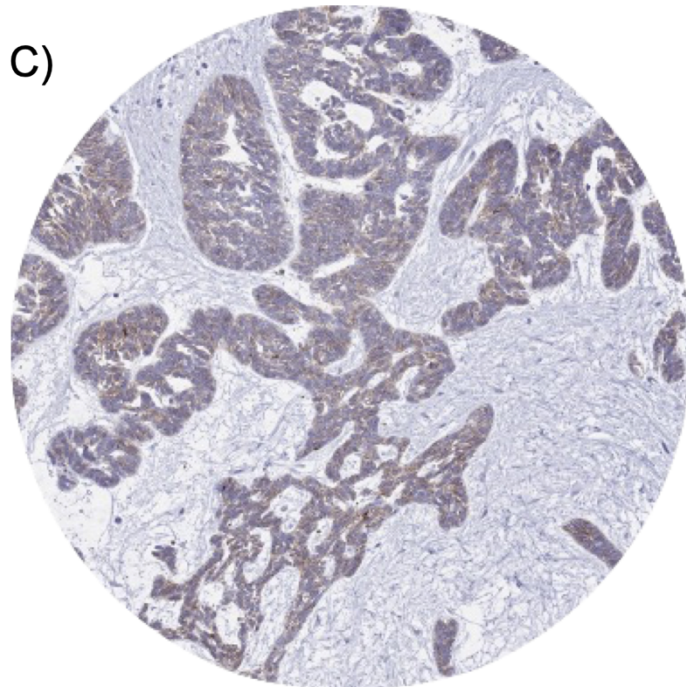


Abbildung 20: **Haut:** Schwache Dsg3-Immunfärbung in Tumorzellen eines Basalzellkarzinoms der Haut.

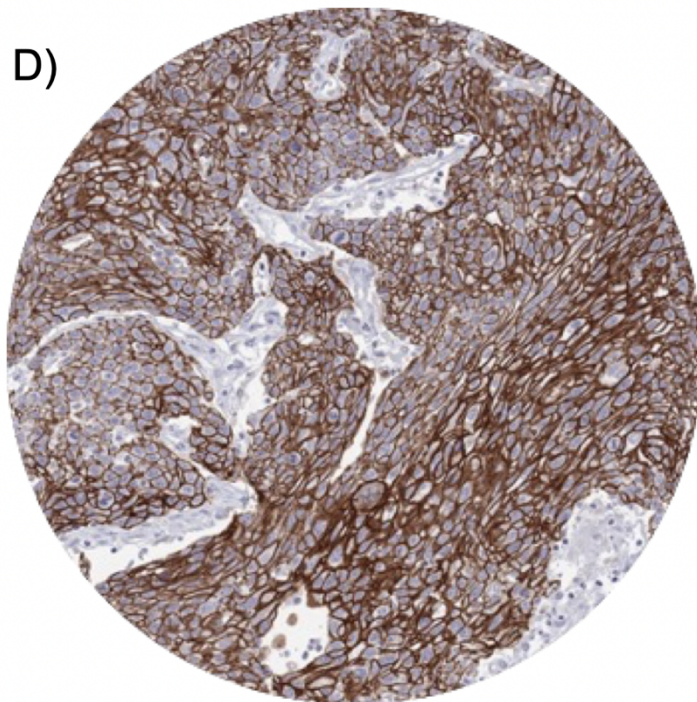


Abbildung 20: **Nierenbecken:** Starke Dsg3-Positivität in Tumorzellen eines muskelinvasiven Urothelkarzinoms des Nierenbeckens.

E)

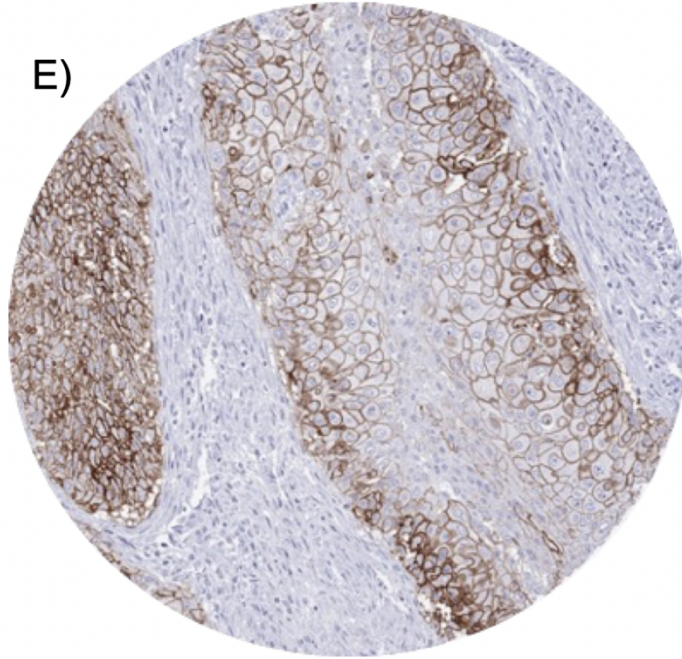


Abbildung 20: **Harnblase:** Starke Dsg3-Positivität in Tumorzellen eines muskelinvasiven Urothelkarzinoms der Harnblase mit fokaler Plattenepithel-Differenzierung.

F)

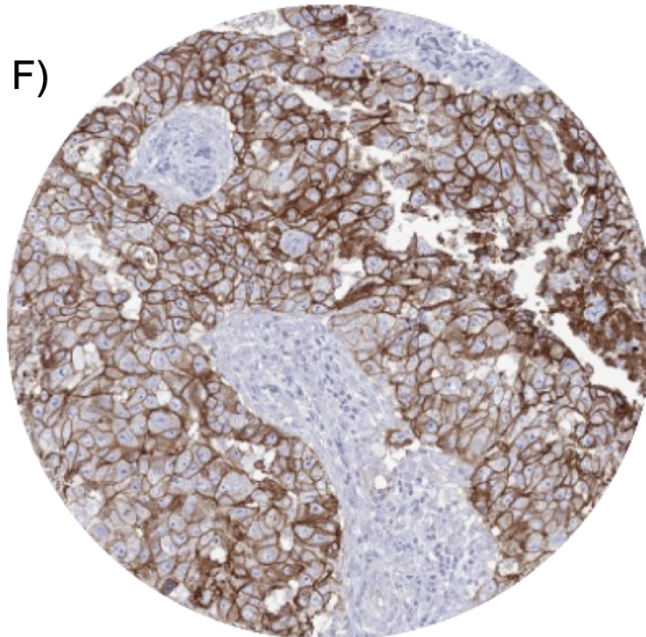


Abbildung 20: **Mamma:** Starke Dsg3-Positivität in Tumorzellen eines invasiven Mammakarzinoms von nicht-speziallem Typ.

G)

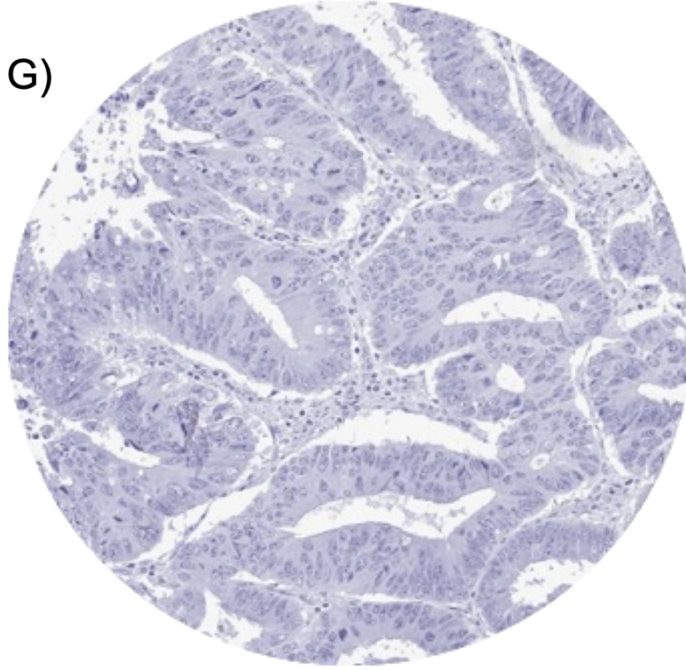


Abbildung 20: **Kolon:** Keine Dsg3 Anfärbung in Tumorzellen eines Adenokarzinoms des Kolons.

H)

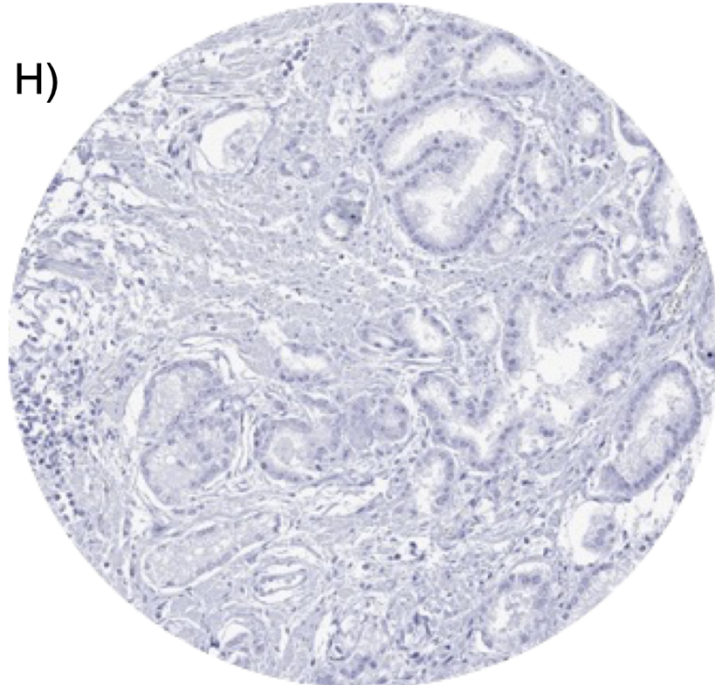


Abbildung 20: **Prostata:** Keine Dsg3 Anfärbung in Tumorzellen eines Adenokarzinoms der Prostata.

Tabelle 8: Dsg3 immunhistochemische Färbung in Tumorgeweben.

Tumorgruppe	Tumortyp/ -subtyp	in TMA (n)	Auswertbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
Tumoren der Haut	Pilomatrixom	35	25	84.0	12.0	4.0	0.0
	Basalzellkarzinom	88	74	58.1	33.8	5.4	2.7
	Nävuszellnävus	29	26	100.0	0.0	0.0	0.0
	Platteneithelkarzinom der Haut	90	90	11.1	33.3	37.8	17.8
	Malignes Melanom	46	43	100.0	0.0	0.0	0.0
	Malignes Melanom Lymphknotenmetastasen	86	86	97.7	2.3	0.0	0.0
	Merkelzellkarzinom	46	31	100.0	0.0	0.0	0.0
Tumoren des Kopfes und des Nackens	Platteneithelkarzinom des Larynx	109	77	13.0	24.7	41.6	20.8
	Platteneithelkarzinom des Pharynx	60	58	13.8	34.5	31.0	20.7
	Orales Platteneithelkarzinom des Mundboden	130	107	16.8	34.6	36.4	12.1
	Pleomorphes Adenom der Parotis	50	31	87.1	12.9	0.0	0.0
	Warthintumor der Parotis	49	36	61.1	36.1	2.8	0.0
	Basalzelladenom der Speicheldrüsen	15	10	70.0	30.0	0.0	0.0
Tumoren der Lunge, Pleura und des Thymus	Adenokarzinom der Lunge	196	180	99.4	0.0	0.6	0.0
	Platteneithelkarzinom der Lunge	80	73	28.8	42.5	24.7	4.1
	Kleinzelliges Lungenkarzinom	16	11	100.0	0.0	0.0	0.0
	Epitheloides Mesenthiom	39	31	100.0	0.0	0.0	0.0
	Mesenthiom, sonstige	76	51	100.0	0.0	0.0	0.0
	Thymom	29	25	92.0	4.0	4.0	0.0

Tumorgruppe	Tumortyp/ -subtyp	in TMA (n)	Auswertbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
Tumoren des weiblichen Genitaltraktes	Plattenepithelkarzinom der Vagina	78	44	15.9	47.7	29.5	6.8
	Plattenepithelkarzinom der Vulva	130	110	2.7	35.5	49.1	12.7
	Plattenepithelkarzinom der Zervix	128	109	19.3	35.8	38.5	6.4
	Adenokarzinom der Zervix	21	21	100.0	0.0	0.0	0.0
	Endometrioides Endometriumkarzinom	236	211	96.2	3.8	0.0	0.0
	Seröses Endometriumkarzinom	82	56	100.0	0.0	0.0	0.0
	Karzinom des Uterus	48	44	97.7	2.3	0.0	0.0
	Endometriumkarzinom, high grade G3	13	12	100.0	0.0	0.0	0.0
	Klarzelliges Endometriumkarzinom	8	7	100.0	0.0	0.0	0.0
	Endometrioides Ovarialkarzinom	110	99	98.0	2.0	0.0	0.0
	Seröses Ovarialkarzinom	559	531	99.8	0.2	0.0	0.0
	Muzinöses Ovarialkarzinom	96	80	97.5	2.5	0.0	0.0
	Klarzelliges Ovarialkarzinom	50	48	100.0	0.0	0.0	0.0
	Karzinom des Ovars	47	40	100.0	0.0	0.0	0.0
	Granulosazelltumor des Ovars	37	37	100.0	0.0	0.0	0.0
	Leydigzelltumor des Ovars	4	4	100.0	0.0	0.0	0.0
	Sertolizelltumor des Ovars	1	1	100.0	0.0	0.0	0.0
	Sertoli-Leydigzelltumor des Ovars	3	3	100.0	0.0	0.0	0.0
	Steroidzelltumor des Ovars	3	3	100.0	0.0	0.0	0.0
	Brenner Tumor	41	37	100.0	0.0	0.0	0.0
Tumoren der Mamma	Invasives Mammakarzinom, nicht spezieller Typ	499	491	95.1	4.1	0.6	0.2
	Lobuläres Mammakarzinom	192	166	100.0	0.0	0.0	0.0
	Medulläres Mammakarzinom	23	22	95.5	4.5	0.0	0.0
	Tubuläres Mammakarzinom	20	16	100.0	0.0	0.0	0.0
	Muzinöses Mammakarzinom	29	25	100.0	0.0	0.0	0.0
	Phylloides Mammakarzinom	50	47	100.0	0.0	0.0	0.0

Tumorgruppe	Tumortyp/ -subtyp	in TMA (n)	Auswertbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
Tumoren des Verdauungs-Systems	Adenomatöser Polyp, low-grade Dysplasie	50	25	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenomatöser Polyp, high-grade Dysplasie	50	45	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom des Kolons	2482	2247	94.4	5.3	0.3	0.0
	Adenokarzinom des Magens, diffuser Typ	176	146	99.3	0.7	0.0	0.0
	Adenokarzinom des Magens, intestinaler Typ	174	162	91.4	8.0	0.6	0.0
	Adenokarzinom des Magens, gemischter Typ	62	52	94.2	5.8	0.0	0.0
	Adenokarzinom des Ösophagus	83	78	93.6	5.1	1.3	0.0
	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	76	69	15.9	44.9	39.1	0.0
	Plattenepithelkarzinom des Anal-Kanals	89	67	10.4	25.4	47.8	16.4
	Cholangiozelluläres Karzinom	50	40	95.0	5.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom der Gallenblase	31	31	93.5	6.5	0.0	0.0
	Klatskintumor der Gallenblase	41	40	97.5	2.5	0.0	0.0
	Hepatozelluläres Karzinom	300	287	99.7	0.3	0.0	0.0
	Duktales Adenokarzinom des Pankreas	612	402	95.0	5.0	0.0	0.0
	Pankreatisch-ampulläres Karzinom	89	71	98.6	1.4	0.0	0.0
	Azinuszellkarzinom des Pankreas	16	15	100.0	0.0	0.0	0.0
	Gastrointestinaler Stromatumor (GIST)	50	43	100.0	0.0	0.0	0.0

Tumorgruppe	Tumortyp/ -subtyp	in TMA (n)	Auswertbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
Tumoren des männlichen Genitaltraktes	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 3+3	83	83	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 4+4	80	80	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 5+5	85	85	100.0	0.0	0.0	0.0
	Adenokarzinom der Prostata (Rekurrenz)	258	257	99.2	0.4	0.0	0.4
	kleinzelliges neuroendokrines Karzinom der Prostata	19	15	100.0	0.0	0.0	0.0
	Seminom	621	603	100.0	0.0	0.0	0.0
	Embryonales Karzinom des Hodens	50	46	100.0	0.0	0.0	0.0
	Leydigzelltumor des Hodens	30	30	100.0	0.0	0.0	0.0
	Sertolizelltumor des Hodens	2	2	100.0	0.0	0.0	0.0
	"Sex-cord"-Stromatumor des Hodens	1	1	100.0	0.0	0.0	0.0
	spermatozytischer Tumor des Hodens	1	1	100.0	0.0	0.0	0.0
	Dottersacktumor	50	43	97.7	2.3	0.0	0.0
	Teratom	50	35	80.0	11.4	8.6	0.0
	Plattenepithelkarzinom des Penis	80	78	10.3	33.3	39.7	16.7

Tumoren des Harntraktes	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2, low grade	177	126	100.0	0.0	0.0	0.0
	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2, high grade	141	97	97.9	2.1	0.0	0.0
	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa, G3	219	172	97.1	1.7	1.2	0.0
	Urothelkarzinom, pT2-4 G3	735	611	81.0	12.9	4.9	1.1
	Plattenepithelkarzinom der Harnblase	22	21	14.3	38.1	47.6	0.0
	Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom der Blase	23	22	100.0	0.0	0.0	0.0
	Sarkomatoides Urothelkarzinom	25	21	81.0	14.3	4.8	0.0
	Urothelkarzinom (Nierenbecken)	62	58	79.3	15.5	1.7	3.4
	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	1287	1201	100.0	0.0	0.0	0.0
	Papilläres Nierenzellkarzinom	368	338	100.0	0.0	0.0	0.0
	Klarzelliges (tubuläres) papilläres Nierenzellkarzinom	26	25	100.0	0.0	0.0	0.0
	Chromophobes Nierenzellkarzinom	170	157	100.0	0.0	0.0	0.0
	Onkozytom	257	232	100.0	0.0	0.0	0.0

Tumorgruppe	Tumortyp/ -subtyp	in TMA (n)	Auswertbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
Tumoren des endokrinen Systems	Schilddrüsenadenom	113	111	100.0	0.0	0.0	0.0
	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	391	380	100.0	0.0	0.0	0.0
	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	154	154	100.0	0.0	0.0	0.0
	Medulläres Schilddrüsenkarzinom	111	108	100.0	0.0	0.0	0.0
	Nebenschilddrüsenadenom	43	41	100.0	0.0	0.0	0.0
	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	45	44	100.0	0.0	0.0	0.0
	Nebennierenrindenadenom	50	45	100.0	0.0	0.0	0.0
	Nebennierenrindencarzinom	26	20	100.0	0.0	0.0	0.0
	Phäochromozytom	50	44	100.0	0.0	0.0	0.0
	Neuroendokriner Tumor des Appendix	22	17	100.0	0.0	0.0	0.0
	Kolorektaler Neuroendokriner Tumor	12	11	100.0	0.0	0.0	0.0
	Neuroendokriner Tumor des Ileum	49	49	100.0	0.0	0.0	0.0
	Neuroendokriner Tumor der Lunge	19	17	100.0	0.0	0.0	0.0
	Neuroendokriner Tumor des Pankreas	97	85	100.0	0.0	0.0	0.0
	Kolorektales Neuroendokrines Karzinom	12	11	100.0	0.0	0.0	0.0
	Neuroendokrines Karzinom der Gallenblase	4	4	100.0	0.0	0.0	0.0
Neuroendokrines Karzinom des Pankreas	14	14	100.0	0.0	0.0	0.0	

Tumorgruppe	Tumortyp/ -subtyp	in TMA (n)	Auswertbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes	Hodgkin Lymphom	103	80	100.0	0.0	0.0	0.0
	Kleinzelliges lymphozytisches B-Zell Lymphom	50	48	100.0	0.0	0.0	0.0
	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom	113	109	99.1	0.9	0.0	0.0
	Follikuläres Lymphom	88	87	100.0	0.0	0.0	0.0
	T-Zell Non-Hodgkin Lymphom	25	25	100.0	0.0	0.0	0.0
	Mantelzell Lymphom	18	18	100.0	0.0	0.0	0.0
	Marginalzonenlymphom	16	15	100.0	0.0	0.0	0.0
	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom des Hoden	16	16	100.0	0.0	0.0	0.0
	Burkitt Lymphom	5	3	100.0	0.0	0.0	0.0

Tumorgruppe	Tumortyp/ -subtyp	in TMA (n)	Auswertbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
Tumoren des Weichteilgewebes und des Knochens	Tendosynovialer Riesenzelltumor	45	25	100.0	0.0	0.0	0.0
	Granulosazelltumor	53	31	100.0	0.0	0.0	0.0
	Leiomyom	50	49	100.0	0.0	0.0	0.0
	Leiomyosarkom	87	77	100.0	0.0	0.0	0.0
	Liposarkom	132	115	100.0	0.0	0.0	0.0
	Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST)	13	13	100.0	0.0	0.0	0.0
	Myofibrosarkom	26	26	100.0	0.0	0.0	0.0
	Angiosarkom	73	58	100.0	0.0	0.0	0.0
	Angiomyolipom	91	89	100.0	0.0	0.0	0.0
	Dermatofibrosarkom protuberans	21	17	100.0	0.0	0.0	0.0
	Ganglioneurom	14	14	100.0	0.0	0.0	0.0
	Kaposi Sarkom	8	6	100.0	0.0	0.0	0.0
	Neurofibrom	117	103	100.0	0.0	0.0	0.0
	Sarkom, nicht spezifiziert (NOS)	74	72	100.0	0.0	0.0	0.0
	Paragangliom	41	41	100.0	0.0	0.0	0.0
	Ewing sarkom	23	18	100.0	0.0	0.0	0.0
	Rhabdomyosarkom	6	6	100.0	0.0	0.0	0.0
	Schwannom	121	114	100.0	0.0	0.0	0.0
	Synovial Sarkom	12	11	100.0	0.0	0.0	0.0
	Osteosarkom	43	36	100.0	0.0	0.0	0.0
Chondrosarkom	38	23	100.0	0.0	0.0	0.0	
Rhabdoid tumor	5	5	100.0	0.0	0.0	0.0	

Die Dsg3 Färbung war in diesen Tumorentitäten mit nur geringer Expressionshäufigkeit meistens schwach oder selten mäßig stark ausgeprägt. In einem Teil der Fälle war der fokale Nachweis einer Dsg3 Färbung auf Areale limitiert, welche eine fokale plattenepitheliale Differenzierung aufzeigten (Abbildung 20 E). Allerdings konnte eine Dsg3 Expression auch in nicht plattenepithelialen Neoplasien ohne eindeutige morphologische Anhaltspunkte für eine fokale plattenepitheliale Differenzierung gefunden werden. Eine Rangordnung der Tumorkategorien nach ihrer Häufigkeit der Dsg3 Positivität ist in Abbildung 21 dargestellt. Die Beziehung zwischen Dsg3 Färbung und histopathologischen Parametern ist für die Tumorarten Urothelkarzinome, Magenkarzinom, Invasive Mammakarzinome von nicht speziellem Typ, Adenokarzinom des Kolons, Adenokarzinom des Pankreas und Plattenepithelkarzinome in Tabelle 9 dargestellt.

Abbildung 21: Eine Rangordnung der Tumorkategorien nach ihrer Häufigkeit der Dsg3 Positivität. Dargestellt sind sowohl der Prozentsatz der positiven Fälle (blaue Punkte) als auch der Prozentsatz der stark positiven Fälle (orangefarbene Punkte).



Die Daten zeigen, dass der Nachweis einer Dsg3 Anfärbung in urothelialen Karzinomen mit invasivem Tumorwachstum assoziiert ist und mit fortgeschrittenem pT Stadium ($p=0.0102$), pN+ ($p=0.0162$), V+ ($p=0.0189$), L1 ($p=0.0151$), und MMR (missmatch-Protein-Ausfall) ($p=0.0023$) bei kolorektalen Karzinomen assoziiert ist. Zudem war eine verminderte Dsg3 Expression in einer Kohorte von 599 erfolgreich untersuchten Plattenepithelkarzinomen von 11 verschiedenen Ursprungsorten mit einem hohen Malignitätsgrad assoziiert ($p<0.0001$). Keine Assoziation fand sich hingegen zwischen der Dsg3 Färbung und dem HPV-Status bei Plattenepithelkarzinomen (Tabelle 10). Assoziationen zwischen Dsg3 Färbung und klinisch-pathologischen Parametern waren in invasiven Mammakarzinomen von nicht-speziiellem Typ, duktalem Adenokarzinomen des Pankreas und den gastrischen Adenokarzinomen nicht nachweisbar.

Tabelle 9: Dsg3 Färbung und histopathologischen Parametern verschiedener Tumorentitäten.

Tumorentität	Histopathologische Parameter		Analysierbare Fallzahl (n)	Dsg3 immunhistochemische Färberegebnisse				p
				negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	
Urothelkarzinome	Alle Tumoren		887	89.7	7.0	2.7	0.6	
	nicht-invasive vs. invasive Tumoren	pTa G2 low	126	100.0	0.0	0.0	0.0	<0.0001
		pTa G2 high	97	97.9	2.1	0.0	0.0	
		pTa G3	143	97.9	1.4	0.7	0.0	
		pT2-4	469	81.9	12.2	4.9	1.1	
	nicht-invasive Tumoren	pTa G2 low	126	100.0	0.0	0.0	0.0	0.2449
		pTa G2 high	97	97.9	2.1	0.0	0.0	
		pTa G3	143	97.9	1.4	0.7	0.0	
	Tumor Stadium	pT2*	135	85.2	10.4	3.7	0.7	0.5028
		pT3*	215	79.1	13.0	6.0	1.9	
		pT4*	105	83.8	11.4	4.8	0.0	
	Grad	G2*	21	85.7	9.5	4.8	0.0	0.8913
		G3*	434	81.8	12.0	5.1	1.2	
	Lymphknoten Status	pN0*	266	81.6	12.8	4.5	1.1	0.7162
		pN+*	170	83.8	9.4	5.6	1.3	
	Magenkarzinom	Tumor Stadium	pT1-2	52	92.3	5.8	1.9	0.0
pT3			109	93.6	4.6	1.8	0.0	
pT4			106	92.5	7.5	0.0	0.0	
Lymphknoten Status		pN0	67	92.5	6.0	1.5	0.0	0.1707
		pN1	59	96.6	3.4	0.0	0.0	
		pN2	53	84.9	11.3	3.8	0.0	
		pN3	88	95.5	4.5	0.0	0.0	

Tumorentität	Histopathologische Parameter	Analysierbare Fallzahl (n)	Dsg3 immunhistochemische Färbegergebnisse				p	
			negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)		
Invasive Mammarkarzinome von nicht speziellem Typ	Alle Tumoren	417	95.2	4.3	0.5	0.0		
	Tumor Stadium	pT1	174	95.4	4.6	0.0	0.0	0.5507
		pT2	200	95.0	4.0	1.0	0.0	
		pT3-4	38	94.7	5.3	0.0	0.0	
	Grad	G1	14	100.0	0.0	0.0	0.0	0.3552
		G2	235	96.6	3.0	0.4	0.0	
		G3	167	92.8	6.6	0.6	0.0	
	Lymphknoten Status	pN0	208	94.7	4.3	1.0	0.0	0.4782
		pN1	104	98.1	1.9	0.0	0.0	
		pN2	47	95.7	4.3	0.0	0.0	
		pN3	18	88.9	11.1	0.0	0.0	
	Kolorektales Adenokarzinom	Alle Tumoren	2171	94.2	5.5	0.3	0.0	
		Tumor Stadium	pT1	78	100.0	0.0	0.0	0.0
pT2			415	93.0	6.7	0.2	0.0	
pT3			1196	94.0	5.9	0.2	0.0	
pT4			434	94.9	4.1	0.9	0.0	
Lymphknoten Status		pN0	1120	95.5	4.3	0.2	0.0	0.0162
		pN+	1000	92.7	6.8	0.5	0.0	
Blutgefäß-invasion		V0	1524	94.8	5.1	0.1	0.0	0.0189
		V+	568	92.4	6.7	0.9	0.0	
Lymphgefäß-Infiltration		L0	691	96.2	3.6	0.1	0.0	0.0151
		L1	1409	93.3	6.3	0.4	0.0	
Lokalisation		links	1160	93.4	6.3	0.3	0.0	0.6155
		rechts	434	94.5	5.1	0.5	0.0	
Mismatch repair Status		profizient	1098	93.1	6.5	0.5	0.0	0.0023
		defizient	88	100.0	0.0	0.0	0.0	
RAS Mutation Status		Wildtyp	430	95.3	4.4	0.2	0.0	0.1722
		Mutation	344	93.0	7.0	0.0	0.0	

Tumorentität	Histopathologische Parameter	Analysierbare Fallzahl (n)	Dsg3 immunhistochemische Färbeargebnisse				p	
			negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)		
Duktales Adenokarzinom des Pankreas	Tumor Stadium	pT1	9	100.0	0.0	0.0	0.0	0.3954
		pT2	44	93.2	6.8	0.0	0.0	
		pT3	258	95.3	4.7	0.0	0.0	
		pT4	18	100.0	0.0	0.0	0.0	
	Grad	G1	11	90.9	9.1	0.0	0.0	0.7758
		G2	224	95.1	4.9	0.0	0.0	
		G3	77	96.1	3.9	0.0	0.0	
	Lymphknoten Status	pN0	73	97.3	2.7	0.0	0.0	0.3686
		pN+	255	94.9	5.1	0.0	0.0	
	Rezidiv Status	R0	161	94.4	5.6	0.0	0.0	0.3666
		R1	145	96.6	3.4	0.0	0.0	
	Mismatch repair Status	profizient	303	95.0	5.0	0.0	0.0	0.6528
		defizient	2	100.0	0.0	0.0	0.0	
	Platteneithelkarzinome **	Tumor Stadium	pT1	248	12.9	30.6	43.5	12.9
pT2			228	15.8	34.6	38.2	11.4	
pT3			132	13.6	40.9	37.9	7.6	
pT4			117	12.8	35.9	36.8	14.5	
Lymphknoten Status		pN0	300	14.0	33.0	41.0	12.0	0.3941
		pN+	289	15.6	38.4	34.9	11.1	
Grad		G1	21	0.0	14.3	66.7	19.0	<0.0001
		G2	343	8.2	28.6	47.8	15.5	
		G3	235	21.3	43.4	30.2	5.1	
		pT3*	215	79.1	13.0	6.0	1.9	
		pT4*	105	83.8	11.4	4.8	0.0	

Tabelle 10: Dsg3 Färbung und HPV Status.

Tumortyp	HPV-Status	n	Dsg3 immunhistochemische Färberegebnisse				p
			Negativ (%)	Schwach (%)	Moderat (%)	Stark (%)	
Alle Plattenepithelkarzinome	negativ	307	15.3	30.9	38.1	15.6	0.0851
	positiv	233	8.2	34.3	40.3	17.2	
Orales Plattenepithelkarzinom	negativ	64	12.5	34.4	37.5	15.6	0.8708
	positiv	11	9.1	45.5	36.4	9.1	
Pharynx, Plattenepithelkarzinom	negativ	22	22.7	31.8	31.8	13.6	0.1025
	positiv	33	3.0	39.4	30.3	27.3	
Larynx, Plattenepithelkarzinom	negativ	44	11.4	20.5	47.7	20.5	0.2831
	positiv	7	14.3	0.0	42.9	42.9	
Zervix, Plattenepithelkarzinom	negativ	9	22.2	33.3	33.3	11.1	0.8914
	positiv	65	15.4	36.9	41.5	6.2	
Vagina, Plattenepithelkarzinom	negativ	14	21.4	35.7	42.9	0.0	0.3817
	positiv	14	14.3	35.7	35.7	14.3	
Vulva, Plattenepithelkarzinom	negativ	54	0.0	37.0	51.9	11.1	0.5055
	positiv	26	0.0	26.9	53.8	19.2	
Penis, Plattenepithelkarzinom	negativ	29	17.2	20.7	44.8	17.2	0.1229
	positiv	46	4.3	41.3	37.0	17.4	
Plattenepithelkarzinom der Haut	negativ	38	5.3	31.6	31.6	31.6	0.5221
	positiv	1	0.0	100.0	0.0	0.0	
Plattenepithelkarzinom des Anal-Kanals	negativ	4	0.0	0.0	75.0	25.0	0.4740
	positiv	30	6.7	20.0	46.7	26.7	

4 Diskussion

Unsere erfolgreiche Untersuchung von 14.094 Tumoren von 137 verschiedenen Tumorentitäten identifizierte eine Dsg3-Expression in 47 unterschiedlichen Tumorkategorien und ermöglichte die Darstellung einer Rangliste unserer 137 Entitäten nach der Häufigkeit und Intensität der Dsg3 Expression. Eine immunhistochemische Untersuchung von mehr als 10.000 Tumoren wäre ohne Anwendung der Tissue-Microarray Methode nicht denkbar. Auch bei konservativer Berechnung der Färbekosten pro Schnitt mit fünf Euro pro Analyse hätte die vorliegende Studie ein Reagenzien Budget von mehr als 80,000 Euro benötigt. Die Untersuchung der 44 für das Projekt benötigten TMA-Schnitte erfolgten in einem Zeitraum von drei Tagen. Am Tag eins wurden alle 44 TMA-Schnitte hergestellt und am Tag drei wurden alle 44 TMA-Schnitte in einem einzigen Reagenziensatz manuell gefärbt. Die Zeit zwischen Schnittherstellung und immunhistochemischer Färbung übt einen wesentlichen Einfluss aus auf die Intensität immunhistochemischer Färbungen (Fergenbaum et al., 2004, Mirlacher et al., 2004; Torhorst et al., 2001) . Diese kritische Zeitspanne bei einer Studie mit mehr als 16,000 Schnitten konstant zu halten wäre eine kaum zu bewältigende logistische Aufgabe. Ein weiterer wesentlicher Vorteil der TMA-Methode ist die identische Tumorgewebsmenge, welche pro Patient zur Untersuchung gelangt. Studien haben nämlich gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit eines positiven immunhistochemischen Färbeergebnisses mit der Menge des untersuchten Tumorgewebes ansteigt (Torhorst et al., 2001; Camp et al., 2000; Fernebro et al., 2002; Gulmann et al., 2003; Hoos et al., 2001, 2001; Rosen et al., 2004; Rubin et al., 2002). Günstig ist dabei auch die Tatsache, dass die gewählte Gewebemenge pro Patient (0,06 mm Durchmesser Ø) der Menge nahekommt, welche oft in kleinen Tumorbiosien zur Untersuchung gelangt. Die TMA-Methode simuliert somit weitgehendst die diagnostischen Verhältnisse an kleinen Organbiosien.

Die in dieser Studie erzielten Daten passen grundsätzlich zu den Ergebnissen der früheren Literatur und zeigen eine prädominante Rolle von Dsg3 in Plattenepithelien und davon abgeleiteten Neoplasien. Die 12 von uns untersuchten Plattenepithelkarzinom-Kategorien von verschiedenen Ursprungsorten nahmen in unserer Rangliste der Tumoren nach Dsg3 Positivität dementsprechend auch die 12 Toppositionen ein, wobei alle in mindestens 70 Prozent der Fälle ein positives Färbeergebnis zeigten. Dass auf Platz 13 das Basalzellkarzinom der Haut (41.9% positiv) folgt, ist nicht erstaunlich, es handelt sich doch hierbei um eine dem Plattenepithelkarzinom verwandte Entität. Urotheliale Neoplasien und fünf benigne epitheliale Neoplasien, meist ausgehend von den Speicheldrüsen nahmen die nächsten Positionen unserer Rangliste ein. In der Mehrheit der Fälle hat sich in diesen Tumoren eine Dsg3 Positivität in Arealen mit plattenepithelialer Differenzierung gezeigt.

Es ist gut bekannt, dass eine plattenepitheliale Differenzierung zumindest bei einem Teil der urothelialen Karzinome (Sjödahl et al., 2012), Teratomen (Iwasa et al., 2007), Pilomatrixome (Travaglino et al., 2021), Basalzelladenome (Paker et al., 2012) oder Thymome (Truong et al., 1990) auftritt. Auch in Warthin-Tumoren der Speicheldrüsen sind plattenepitheliale Metaplasien (Yorita et al., 2019) und selbst Übergänge in plattenepitheliale Karzinome (Morrison and Shaw, 1988) beschrieben. Dass eine meist weniger stark ausgeprägte Dsg3 Expression in einem kleineren Teil der Fälle auch in anderen nicht plattenepithelialen Neoplasien vorkommen kann, passt prinzipiell zu RNA-Expressionsdaten von Tumoren, welche im Rahmen des International Cancer Genome Consortium (ICGC) und der The Cancer Genome Atlas (TCGA) gewonnen werden konnten (<https://www.cancer.gov/tcga>). Diese Daten zeigen eine geringgradige Dsg3-RNA-Expression beispielsweise in einzelnen Karzinomen von Kolorektum, Magen, Pankreas, Mamma und Endometrium. Angesichts der engen Beziehung zwischen der Dsg3-Expression und der Differenzierung von Keratinozyten könnte spekuliert werden, dass eine gelegentliche plattenepitheliale Differenzierung in diesen Tumorarten für die Dsg3 Expression verantwortlich sein könnte. Das gelegentliche Auftreten einer plattenepithelialen Differenzierung ist bei vielen Tumorarten bekannt wie beispielsweise auch beim kolorektalen Adenokarzinom (Ozuner et al., 2015), Adenokarzinom des Magens (Akce et al., 2019), Adenokarzinom des Pankreas (Raman et al., 2018), Mammakarzinom (Tejera Hernández et al., 2022) und im Endometriumkarzinom (Zaino et al., 1991).

Tatsächlich haben mehrere Autoren früher vorgeschlagen, dass die Dsg3 Immunhistochemie ein Verfahren darstellen könnte, welches bei der Identifikation von plattenepithelial differenzierten Tumoren Anteilen bei Lungen- und Urothelkarzinomen helfen könnte (Dong et al., 2020; Galindo et al., 2019; Gómez-Morales et al., 2013; Gulmann et al., 2013; Saaber et al., 2015). Die Tatsache, dass in unserer Studie 71,2 % der Plattenepithelkarzinome aber nur 0,6 % der Adenokarzinome der Lunge Dsg3-positiv waren, wäre mit einer Anwendung von Dsg3-Antikörpern für die klinisch relevante Unterscheidung dieser beiden Tumorentitäten zu vereinbaren. Die Unterscheidung zwischen Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen der Lunge macht an kleinen Gewebeproben häufig Schwierigkeiten, insbesondere bei wenig differenzierten Tumoren (Travis et al., 2015). Da Lungenkarzinomen häufig zu fortgeschritten sind, um sie operativ zu entfernen, muss die gesamte Diagnostik oftmals an kleinen Biopsien erfolgen (Galindo et al., 2019). Die Unterscheidung zwischen Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen ist sowohl für die primäre Therapiewahl als auch für die Wahl der nachfolgenden molekularen Untersuchungen von Bedeutung.

Therapeutische Unterschiede bestehen in der Indikation, Durchführung, Ausmaß der Resektion, Behandlungsergebnissen und Komplikationen, molekulare (immunhistochemische) Panels hingegen unterscheiden sich in der Spezifität und Sensitivität für die Färbung von Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen (Savci-Heijink et al., 2009). Die Auswahl der Behandlung für Patienten mit Lungenkrebs wird in erster Linie durch die Unterscheidung von Lungenkarzinomen in kleinzellige und nicht-kleinzellige Lungenkarzinome einschließlich Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und großzellige Karzinome und das Stadium der Erkrankung bestimmt (Gadgeel et al., 2012; Liao et al., 2012; Travis et al., 1995). Dsg3 ist bisher bei der Unterscheidung von pulmonalen Adenokarzinomen von Plattenepithelkarzinomen nicht routinemäßig eingesetzt. Dies ist möglicherweise dadurch bedingt, dass die bisherige Literatur kontroverse Daten erzielt hat. Dsg3 Positivität fand sich in früheren Studien in 10.0%-100% von Plattenepithelkarzinomen und in 0%-6.6% von Adenokarzinomen der Lunge (Cohen et al., 2017; Galindo et al., 2019; Saaber et al., 2015; Savci-Heijink et al., 2009). Bisher typischerweise genutzte Marker für die Unterscheidung pulmonaler Adenokarzinome von Plattenepithelkarzinomen sind p40, p63, TTF1, Napsin-A, CK7, and CK5/6 (Galindo et al., 2019). Um zu klären, ob die Verwendung von Dsg3 einen zusätzlichen Nutzen bei Unterscheidung dieser Tumoren bringt, sind zukünftige Studien erforderlich.

Eine fokale und möglicherweise auch ausgedehnte plattenepitheliale Differenzierung wurde bei 6-40 % der Urothelkarzinome beschrieben, insbesondere im Fall eines invasiven Tumorwachstums (Erdemir et al., 2007; Liu et al., 2017; Lobo et al., 2020). Rein morphologisch ist die Identifikation von plattenepithelial differenzierten Tumoranteilen in urothelialen Neoplasien häufig schwierig. Die diagnostischen Schwierigkeiten bei Identifikation und Quantifizierung plattenepithelialer Tumoranteile sind eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Daten zur möglichen klinischen Relevanz einer plattenepithelialen Differenzierung bei Urothelkarzinomen. Mehrere Studien hatten früher über einen besonders aggressiveren Krankheitsverlauf (Erdemir et al., 2007; Liu et al., 2017; Makise et al., 2015) und eine höhere Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie bei Urothelkarzinomen mit plattenepithelialer Differenzierung berichtet (Logothetis et al., 1989, 1985; Martin et al., 1989).

Unsere Beobachtung von 85,7 % Dsg3-positiven Plattenepithelkarzinomen der Harnblase in Kombination mit der offensichtlichen plattenepithelialen Differenzierung von multiplen Dsg3-positiven Urothelkarzinomen (Abbildung 20 E) unterstützt prinzipiell die Idee der Nutzung der Dsg3 Immunhistochemie für die objektive Identifizierung plattenepithelial differenzierter Urothel-Neoplasien Anteile. Viele andere typischen Plattenepithel-Marker wie beispielsweise p63 und p40 können für diese Unterscheidung nicht herangezogen werden, da diese Proteine im Urothel und Plattenepithel gleichermaßen exprimiert werden (GTEx Consortium, 2013; Hoang et al., 2015; Karlsson et al., 2021; Lizio et al., 2017, 2015). Frühere Studien hatten für die Identifikation von plattenepithelial differenzierten Urothel-Tumoranteilen Dsg3 in Kombination mit MAC387 (Hoang et al., 2015) oder die Kombination von Uroplakin III, S100P, GATA3, CK14 und Dsg3 empfohlen (Gulmann et al., 2013).

Eine Vielzahl von Studien hatten früher auf eine mögliche tumorsuppressive oder onkogene Funktion von Dsg3 hingewiesen. Die große Zahl von den in unserer Studie eingeschlossenen Tumoren erlaubte uns Beziehungen zwischen der Dsg3 Expression und den klinisch-pathologischen Parametern für Tumoraggressivität zu untersuchen. Die Gesamtheit dieser Daten deutet darauf hin, dass sich die prognostische Bedeutung der Dsg3 Expression unterscheidet zwischen Tumoren, welche von Dsg3 exprimierenden Geweben abstammen, zum Beispiel Plattenepithelkarzinome und von Tumoren, welche von nicht Dsg3 exprimierenden Geweben abstammen. Bei Plattenepithelkarzinomen - ausgehend von Dsg3 positivem normalem Plattenepithel- fand sich eine Tendenz zu aggressivem Verhalten bei Tumoren mit verminderter oder fehlender Dsg3 Immunfärbung, sodass der Dsg3 Verlust bei Plattenepithelkarzinomen mit einem hohen Malignitätsgrad assoziiert ($p < 0,0001$). In Tumorentitäten, welche von Dsg3 negativen Normalgeweben ausgehend, bestand eine Tendenz zu Assoziationen zwischen Dsg3 Positivität und ungünstigen Tumorparametern. Bei insgesamt aber meist kleiner Zahl Dsg3 exprimierender Tumoren erreichten diese tendenziellen Unterschiede meist kein adäquates Signifikanzniveau. Insgesamt sprechen die Daten aber dafür, dass eine aberrante Dsg3 Expression mit der Tumorprogression und potenziell ungünstiger Prognose assoziiert ist. Allerdings ist diese Beziehung nicht besonders stark. Als Erklärung für diese Beobachtung käme die früher beobachteten Anhaltspunkte für tumorsuppressive (Chao et al., 2016; Chi et al., 2022; Fang et al., 2014; Rehman et al., 2019; Saaber et al., 2015; Wang et al., 2007) oder onkogene (Abula et al., 2021.; Brown et al., 2014b; Chen et al., 2013, 2007; Dong et al., 2020; Ormanns et al., 2015; Patel et al., 2013) Funktionen von Dsg3 in Frage.

Eine alternative Erklärung wäre aber auch eine aberrante Dsg3 Expression im Rahmen der Tumor-Dedifferenzierung. So kann es sein, dass bei Plattenepithelkarzinomen, die Fähigkeit zur Dsg3 Expression im Rahmen der allgemeinen Deregulierung zellulärer Funktionen verloren gehen kann. In Tumoren, welche von Geweben ausgehen die typischerweise Dsg3 negativ sind, kann eine weitgehendst nach dem Zufallsprinzip erfolgende Deregulierung der Zellfunktionen in einem kleinen Teil der Fälle zu einer „De-novo“ Expression von Dsg3 führen. In diesem Fall würde die Dsg3 Expression auch ohne eine eigene biologische Wirkung auf das Zellverhalten einen Surrogat-Marker für „Entdifferenzierung“ und damit auch ungünstige Prognose darstellen.

Angesichts der großen Zahl der in unserer Studie analysierten Tumoren wurde ein besonderes Augenmerk auf die Qualität der verwendeten Antikörper und unseres Assays gelegt. Die Internationale Arbeitsgruppe für Antikörpervalidierung (IWGAV) hatte für Antikörper zur Anwendung an formalinfixiertem Gewebe die Durchführung von mindestens einem von zwei Validierungsschritten gefordert. Diese sind entweder der Vergleich der Färbeergebnisse mit Expressionsdaten, welche mit einer anderen Methode erzielt wurden oder aber der Vergleich mit einem zweiten unabhängigen Antikörper für das gleiche Zielprotein (Uhlen et al., 2016). Beide Verfahren wurden in dieser Studie angewendet. Zudem wurde auch eine ungewöhnliche große Zahl von Normalgeweben für die Antikörpervalidierung herangezogen. Unser Normalgewebe- Array (76 verschiedene Normalgewebe) beinhaltet einen sehr großen Anteil der im adulten Menschen vorkommenden Gewebetypen und dürfte damit auch einen großen Anteil der beim adulten Menschen exprimierten Proteine in mindestens einigen wenigen Gewebearten aufweisen. Die Evaluation unseres Antikörpers an einer so großen Zahl von Normalgeweben resultiert in einer hohen Chance auffällig auftretende Kreuzreaktionen mit „nicht Dsg3 Proteinen“ zu erkennen.

Die sonst üblichen Validierungsverfahren von Antikörpern basieren meist auf Protein-Extrakten einzelner Zelllinien, wobei nicht sichergestellt ist, dass alle relevanten Proteine auf eine mögliche Kreuzreaktivität untersucht werden.

Der Vergleich der Dsg3 Färbeergebnisse mit RNA-Daten von Normalgeweben, welche in drei voneinander unabhängigen öffentlich zugänglichen RNA-Datenbanken zusammengestellt waren darunter der Human Protein Atlas (HPA) RNA-seq-Gewebedatensatz (Karlsson et al., 2021), das FANTOM5-Projekt (Lizio et al., 2017, 2015) und das Genotype-Tissue-Expression (GTEx) Projekt (GTEx Consortium, 2013), sind sehr gut vereinbar mit der Spezifität unseres Antikörpers, weil eine Dsg3 Immunfärbung in allen Organen nachweisbar war, bei denen auch eine Dsg3 RNA-Expression dokumentiert worden war (Haut, Ösophagus, Vagina, Zervix, Speicheldrüse, Tonsille, Thymus). Der Nachweis von einer Dsg3 Immunfärbung in Organen ohne bekannte RNA-Expression wie beispielsweise einzelnen Kryptenzellen der duodenalen und ilealen Darmschleimhaut und im respiratorischen Epithel konnte durch „Verdünnungsdefekte“ bedingt sein. Die von uns identifizierten Zelltypen machen nur einen kleinen Teil der Gesamtmenge der jeweiligen Organe aus, sodass angenommen werden muss, dass die wenigen positiven Zellen nicht zu einer nachweisbaren Dsg3 Expression in RNA-Präparationen von Dünndarm oder Bronchus führen würden. Die Validität der Dsg3 Immunfärbung in diesen Organen wurde allerdings durch den Nachweis einer identischen Färbung mit unserem Validierungsantikörper (EPR14101) dokumentiert (Abbildungen 19 A-F). Konsekutive Schnitten aus den Organen mit diskrepanten Immunfärbung/RNA Daten ergaben mit beiden Antikörpern eine identische Färbung der gleichen Zelltypen.

Insgesamt geben unsere Daten einen umfassenden Überblick über die Dsg3 Expression in normalen und neoplastischen Geweben. Die Daten zeigen, dass die Dsg3 Expression überwiegend in Plattenepithelkarzinomen verschiedener Organe vorkommt und dass ein Dsg3 Expressionsverlust in diesen Tumoren mit einer Dedifferenzierung und mutmaßlich einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Die Identifikation von fokalen plattenepithelial differenzierten Tumoranteilen könnte eine mögliche diagnostische Anwendung der Dsg3 Immunhistochemie darstellen.

5 Zusammenfassung

Desmoglein-3 (Dsg3) ist ein Transmembran-Glykoprotein, welches vorzugsweise in Desmosomen von Keratinozyten im Plattenepithel vorkommt. Sowohl der Verlust als auch die Hochregulierung von Dsg3 werden mit dem Fortschreiten von bösartigen Neoplasien in Verbindung gebracht. Um die Dsg3-Expression in Normal- und Tumorgewebe umfassend zu evaluieren, wurde ein Tissue- Microarray mit 15 869 Proben von 137 verschiedenen Tumortypen und -subtypen sowie 608 Proben von 76 verschiedenen normalen Gewebetypen immunhistochemisch untersucht. Insgesamt 47 (34.3%) von 137 Tumorkategorien zeigten mindestens in einem Fall eine nachweisbare Dsg3 Anfärbung, während 15 Tumorkategorien (10.9%) mindestens einen Fall mit starker Dsg3 Positivität aufwiesen. Eine Dsg3 Positivität und auch eine starke Dsg3 Positivität fand sich am häufigsten in Plattenepithelkarzinomen unterschiedlicher Ursprungsorte (positiv in 71.2%-97.3%), Basalzellkarzinomen der Haut (41.9%), verschiedenen benignen Tumoren hauptsächlich von den Speicheldrüsen (8,0%-38,9%) und in verschiedenen Kategorien urothelialer Neoplasien (2.1-20.7%). Eine Dsg3 Positivität in weniger als zehn Prozent der Fälle fand sich in den 23 zusätzlichen Tumorkategorien. Eine hohe Dsg3-Expression stand im Zusammenhang mit invasivem Tumorwachstum in urothelialen Karzinomen ($p < 0,0001$), sowie mit fortgeschrittenem pT Stadium ($p = 0.0102$), pN+ ($p = 0.0162$), V+ ($p = 0.0189$), L1 ($p = 0.0151$) bei kolorektalen Karzinomen assoziiert ist. Zudem war eine verminderte Dsg3 Expression in einer Kohorte von 599 erfolgreich untersuchten Plattenepithelkarzinomen von 11 verschiedenen Ursprungsorten mit einem hohen Malignitätsgrad assoziiert ($p < 0.0001$). Assoziation zwischen Dsg3 Färbung und klinisch-pathologischen Parametern waren in invasiven Mammakarzinomen von nicht-speziallem Typ, duktalem Adenokarzinomen des Pankreas und den gastrischen Adenokarzinomen nicht nachweisbar. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Dsg3 Expression überwiegend in Plattenepithelkarzinomen verschiedener Organe vorkommt und dass ein Dsg3 Expressionsverlust in diesen Tumoren mit einer Dedifferenzierung und mutmaßlich einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Die Identifikation von fokalen plattenepithelial differenzierten Tumoranteilen könnte eine mögliche diagnostische Anwendung der Dsg3 Immunhistochemie darstellen.

6 Abstract

Desmoglein-3 (Dsg3) is a transmembrane glycoprotein which is preferably found in desmosomes of keratinocytes in squamous epithelium. Both loss and upregulation of Dsg3 has been implicated in cancer progression. To comprehensively evaluate Dsg3 expression in normal and neoplastic tissues, a tissue microarray containing 15,869 samples from 137 different tumor types and subtypes as well as 608 samples of 76 different normal tissue types was analyzed by immunohistochemistry. Dsg3 immunostaining was detectable in 47 (34.3%) tumor categories including 15 (10.9%) tumor types with at least one strongly positive case. The highest rate of Dsg3 positivity was found in squamous cell carcinomas from various sites (71.2%-97.3%), basal cell carcinomas of the skin (41.9%), various tumors from salivary glands (12.9%-38.9%), and in urothelial neoplasms (2.1%-20.7%). Dsg3 positivity in less than 10% of cases was seen in 23 additional cancer categories. Dsg3 staining was almost always weak and rarely moderate in these tumors. High Dsg3 expression was linked to invasive growth in urothelial carcinoma ($p < 0.0001$), as well as to advanced pT stage ($p = 0.0102$), nodal metastasis ($p = 0.0162$), blood vessel infiltration ($p = 0.0189$) and lymph vessel infiltration ($p = 0.0151$) in colorectal cancer. Reduced Dsg3 expression was linked to high grade in a cohort of 599 squamous cell carcinomas from 11 different sites of origin ($p < 0.0001$). Associations between Dsg3 immunostaining and clinicopathological features were not found in invasive breast cancer of no special type, ductal adenocarcinomas of the pancreas and in gastric adenocarcinomas. In summary, Dsg3 expression predominates in squamous cell carcinomas and loss of Dsg3 immunostaining goes along with dedifferentiation of these tumors. The identification of focal squamous differentiation in other neoplasms may constitute a diagnostic application of Dsg3 immunohistochemistry.

7 Abkürzungsverzeichnis

As	Aminosäuren
Ca ²⁺	doppelt positiv geladene Calcium-Ionen
CAR	engl. cell adhesion recognition site, Zelladhäsionserkennungsstelle
CDHF6	Cadherin Family Member 6
cm ²	Quadratzentimeter
COOH	Carboxylgruppe
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dp	Desmoplakin
DSC	Desmocollinen
DSG	Desmogleinen
Dsg3	Desmoglein 3
EA	Extrazellulärer Anker
EC	Ektodomäne
ECD	Extrazelluläre Domäne
EGFR	engl. Epidermal Growth Factor Receptor
HIER	Heat induced-epitope-retrieval
HPA	The Human Protein Atlas
HPV	Humane Papillomviren
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IWGAV	International Working Group for Antibody Validation
kDa	Kilodalton
mm	Millimeter
MMR	Mismatch Reparatengenegen
MTA	Medizinischtechnische/r Assistent:in
NH ₂	Aminogruppe
p38MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PF	Pemphigus foliaceus
Pg	Plakoglobin
PKC	Proteinkinase C
Pkp	Plakophilin
PLC	Phospholipase C
Pn	Perineurale Invasion
pT	Ausdehnung und Verhalten des Tumors, TNM-Klassifikation
PV	Pemphigus vulgaris
PVA	Pemphigus vulgaris antigen
RAS	Rattensarkomvirus Protein
RNA	Ribonukleinsäuren
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20, Puffer
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMA	Tissue – Microarray
Trp2	Tryptophan-Rest
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

8 Literaturverzeichnis

- Abula, Y., Su, Y., Tuniyazi, D., Yi, C., 2021. Desmoglein 3 contributes to tumorigenicity of pancreatic ductal adenocarcinoma through activating Src–FAK signaling. *Anim. Cells Syst.* 25, 1–8. <https://doi.org/10.1080/19768354.2021.1943707>
- Agackiran, Y., Ozcan, A., Akyurek, N., Memis, L., Findik, G., Kaya, S., 2012. Desmoglein-3 and Napsin A double stain, a useful immunohistochemical marker for differentiation of lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma from other subtypes. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM* 20, 350–355. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e318245c730>.
- Akce, M., Jiang, R., Alese, O.B., Shaib, W.L., Wu, C., Behera, M., El-Rayes, B.F., 2019. Gastric squamous cell carcinoma and gastric adenosquamous carcinoma, clinical features and outcomes of rare clinical entities: a National Cancer Database (NCDB) analysis. *J. Gastrointest. Oncol.* 10, 85–94. <https://doi.org/10.21037/jgo.2018.10.06>.
- Al Kuraya, K., Simon, R., Sauter, G., 2004. Tissue microarrays for high-throughput molecular pathology. *Ann. Saudi Med.* 24, 169–174. <https://doi.org/10.5144/0256-4947.2004.169>.
- Amagai, M., Hashimoto, T., Green, K.J., Shimizu, N., Nishikawa, T., 1995. Antigen-specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. *J. Invest. Dermatol.* 104, 895–901. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12606168>.
- Amagai, M., Hashimoto, T., Shimizu, N., Nishikawa, T., 1994. Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by baculovirus. *J. Clin. Invest.* 94, 59–67. <https://doi.org/10.1172/JCI117349>.
- Amagai, M., Karpati, S., Prussick, R., Klaus-Kovtun, V., Stanley, J.R., 1992. Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J. Clin. Invest.* 90, 919–926. <https://doi.org/10.1172/JCI115968>.
- Amagai, M., Klaus-Kovtun, V., Stanley, J.R., 1991. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 67, 869–877. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90360-b](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90360-b).
- Amagai, M., Koch, P.J., Nishikawa, T., Stanley, J.R., 1996. Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. *J. Invest. Dermatol.* 106, 351–355. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12343081>.
- Amagai, M., Stanley, J.R., 2012. Desmoglein as a target in skin disease and beyond. *J. Invest. Dermatol.* 132, 776–784. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.390>
- Andl, C.D., Stanley, J.R., 2001. Central role of the plakoglobin-binding domain for desmoglein 3 incorporation into desmosomes. *J. Invest. Dermatol.* 117, 1068–1074. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01528.x>.
- Angst, B.D., Marcozzi, C., Magee, A.I., 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J. Cell Sci.* 114, 629–641. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.4.629>.
- Arnemann, J., Sullivan, K.H., Magee, A.I., King, I.A., Buxton, R.S., 1993. Stratification-related expression of isoforms of the desmosomal cadherins in human epidermis. *J. Cell Sci.* 104 (Pt 3), 741–750. <https://doi.org/10.1242/jcs.104.3.741>.
- Arnold_Eva 2014 Bedeutung von Desmoglein 2 und Desmoglein 3 für die interzelluläre Adhäsion in Keratinozyten. Dr. rer. nat. Dissertation. Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

- Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., Wolf, R., 2012. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin. Dermatol.* 30, 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007>.
- Bir, F., Çeliker, D., Evyapan, B.F., Yaren, A., Edirne, T., 2016. New immunohistochemical markers in the differential diagnosis of nonsmall cell lung carcinoma. *Turk. J. Med. Sci.* 46, 1854–1861. <https://doi.org/10.3906/sag-1501-68>.
- Blaschuk, O.W., Sullivan, R., David, S., Pouliot, Y., 1990. Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev. Biol.* 139, 227–229. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(90\)90290-y](https://doi.org/10.1016/0012-1606(90)90290-y).
- Boggon, T.J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B.M., Shapiro, L., 2002. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* 296, 1308–1313. <https://doi.org/10.1126/science.1071559>.
- Brown, A.F., Sirohi, D., Fukuoka, J., Cagle, P.T., Policarpio-Nicolas, M., Tacha, D., Jagirdar, J., 2013. Tissue-preserving antibody cocktails to differentiate primary squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and small cell carcinoma of lung. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 137, 1274–1281. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0635-OA>.
- Brown, L., Wan, H., 2015. Desmoglein 3: A Help or a Hindrance in Cancer Progression? *Cancers* 7, 266–286. <https://doi.org/10.3390/cancers7010266>.
- Brown, L., Waseem, A., Cruz, I.N., Szary, J., Gunic, E., Mannan, T., Unadkat, M., Yang, M., Valderrama, F., O'Toole, E.A., Wan, H., 2014. Desmoglein 3 promotes cancer cell migration and invasion by regulating activator protein 1 and protein kinase C-dependent-Ezrin activation. *Oncogene* 33, 2363–2374. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.186>.
- Bubendorf, L., Nocito, A., Moch, H., Sauter, G., 2001. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J. Pathol.* 195, 72–79. <https://doi.org/10.1002/path.893>.
- Butko, M., Pallat, H., Cordoba, A., Yu, X.C., 2014. Recombinant antibody color resulting from advanced glycation end product modifications. *Anal. Chem.* 86, 9816–9823. <https://doi.org/10.1021/ac5024099>.
- Buxton, R.S., Cowin, P., Franke, W.W., Garrod, D.R., Green, K.J., King, I.A., Koch, P.J., Magee, A.I., Rees, D.A., Stanley, J.R., 1993. Nomenclature of the desmosomal cadherins. *J. Cell Biol.* 121, 481–483. <https://doi.org/10.1083/jcb.121.3.481>.
- Buxton, R.S., Magee, A.I., 1992. Structure and interactions of desmosomal and other cadherins. *Semin. Cell Biol.* 3, 157–167. [https://doi.org/10.1016/s1043-4682\(10\)80012-1](https://doi.org/10.1016/s1043-4682(10)80012-1).
- Camp, R.L., Charette, L.A., Rimm, D.L., 2000. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 80, 1943–1949. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780204>.
- Chao, T.-B., Li, C.-F., Lin, C.-Y., Tian, Y.-F., Chang, I.-W., Sheu, M.-J., Lee, Y.-E., Chan, T.-C., He, H.-L., 2016. Prognostic significance of DSG3 in rectal adenocarcinoma treated with preoperative chemoradiotherapy. *Future Oncol. Lond. Engl.* 12, 1457–1467. <https://doi.org/10.2217/fon-2016-0071>.
- Chen, Y.-J., Chang, J.T., Lee, L., Wang, H.-M., Liao, C.-T., Chiu, C.-C., Chen, P.-J., Cheng, A.-J., 2007. DSG3 is overexpressed in head neck cancer and is a potential molecular target for inhibition of oncogenesis. *Oncogene* 26, 467–476. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209802>.
- Chen, Y.-J., Lee, L.-Y., Chao, Y.-K., Chang, J.T., Lu, Y.-C., Li, H.-F., Chiu, C.-C., Li, Y.-C., Li, Y.-L., Chiou, J.-F., Cheng, A.-J., 2013. DSG3 facilitates cancer cell growth and invasion through the DSG3-plakoglobin-TCF/LEF-Myc/cyclin D1/MMP signaling pathway. *PLoS One* 8, e64088. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064088>

- Cheung, W.C., Beausoleil, S.A., Zhang, X., Sato, S., Schieferl, S.M., Wieler, J.S., Beaudet, J.G., Ramenani, R.K., Popova, L., Comb, M.J., Rush, J., Polakiewicz, R.D., 2012. A proteomics approach for the identification and cloning of monoclonal antibodies from serum. *Nat. Biotechnol.* 30, 447–452. <https://doi.org/10.1038/nbt.2167>.
- Chi, Z., Balani, J., Gopal, P., Hammer, S., Lewis, C.M., Peng, L., 2022. Characterization of Desmoglein 3 (DSG3) as a Sensitive and Specific Marker for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2022, 2220940. <https://doi.org/10.1155/2022/2220940>.
- Cohen, A.S., Khalil, F.K., Welsh, E.A., Schabath, M.B., Enkemann, S.A., Davis, A., Zhou, J.-M., Boulware, D.C., Kim, J., Haura, E.B., Morse, D.L., 2017. Cell-surface marker discovery for lung cancer. *Oncotarget* 8, 113373–113402. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23009>.
- Collins, J.E., Legan, P.K., Kenny, T.P., MacGarvie, J., Holton, J.L., Garrod, D.R., 1991. Cloning and sequence analysis of desmosomal glycoproteins 2 and 3 (desmocollins): cadherin-like desmosomal adhesion molecules with heterogeneous cytoplasmic domains. *J. Cell Biol.* 113, 381–391. <https://doi.org/10.1083/jcb.113.2.381>.
- Cowley, C.M.E., Simrak, D., Marsden, M.D., King, I.A., Arnemann, J., Buxton, R.S., 1997. A YAC Contig Joining the Desmocollin and Desmoglein Loci on Human Chromosome 18 and Ordering of the Desmocollin Genes. *Genomics* 42, 208–216. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4718>.
- Cserhalmi-Friedman, P.B., Frank, J.A., Ahmad, W., Panteleyev, A.A., Aita, V.M., Christiano, A.M., 2001. Structural analysis reflects the evolutionary relationship between the human desmocollin gene family members. *Exp. Dermatol.* 10, 95–99. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2001.010002095.x>.
- Delva, E., Tucker, D.K., Kowalczyk, A.P., 2009. The desmosome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a002543. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002543>.
- Di Zenzo, G., Di Lullo, G., Corti, D., Calabresi, V., Sinistro, A., Vanzetta, F., Didona, B., Cianchini, G., Hertl, M., Eming, R., Amagai, M., Ohyama, B., Hashimoto, T., Sloostra, J., Sallusto, F., Zambruno, G., Lanzavecchia, A., 2012. Pemphigus autoantibodies generated through somatic mutations target the desmoglein-3 cis-interface. *J. Clin. Invest.* 122, 3781–3790. <https://doi.org/10.1172/JCI64413>
- DiVito, K.A., Charette, L.A., Rimm, D.L., Camp, R.L., 2004. Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 84, 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700131>.
- Dong, Y., Li, S., Sun, X., Wang, Y., Lu, T., Wo, Y., Leng, X., Kong, D., Jiao, W., 2020. Desmoglein 3 and Keratin 14 for Distinguishing Between Lung Adenocarcinoma and Lung Squamous Cell Carcinoma. *OncoTargets Ther.* 13, 11111–11124. <https://doi.org/10.2147/OTT.S270398>.
- Dusek, R.L., Godsel, L.M., Green, K.J., 2007. Discriminating roles of desmosomal cadherins: beyond desmosomal adhesion. *J. Dermatol. Sci.* 45, 7–21. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2006.10.006>.
- Epstein, J.I., 1993. PSA and PAP as immunohistochemical markers in prostate cancer. *Urol. Clin. North Am.* 20, 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, 803–807. <https://doi.org/10.1007/s11255-006-9151-0>.
- 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. Baltim. Md 1950* 205, 1176–1184. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000112>.
- Eyre, R.W., Stanley, J.R., 1988. Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen. *J. Clin. Invest.* 81, 807–812. <https://doi.org/10.1172/JCI113387>.

- Eyre, R.W., Stanley, J.R., 1987. Human autoantibodies against a desmosomal protein complex with a calcium-sensitive epitope are characteristic of pemphigus foliaceus patients. *J. Exp. Med.* 165, 1719–1724. <https://doi.org/10.1084/jem.165.6.1719>.
- Fang, W.-K., Chen, B., Xu, X.-E., Liao, L.-D., Wu, Z.-Y., Wu, J.-Y., Shen, J., Xu, L.-Y., Li, E.-M., 2014. Altered expression and localization of desmoglein 3 in esophageal squamous cell carcinoma. *Acta Histochem.* 116, 803–809. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2014.01.010>.
- Fergenbaum, J.H., Garcia-Closas, M., Hewitt, S.M., Lissowska, J., Sakoda, L.C., Sherman, M.E., 2004. Loss of antigenicity in stored sections of breast cancer tissue microarrays. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 13, 667–672.
- Fernebro, E., Dictor, M., Bendahl, P.-O., Fernö, M., Nilbert, M., 2002. Evaluation of the tissue microarray technique for immunohistochemical analysis in rectal cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 126, 702–705. <https://doi.org/10.5858/2002-126-0702-EOTTMT>.
- Forthal, D.N., 2014. Functions of Antibodies. *Microbiol. Spectr.* 2, 1–17.
- Frank, J., Cserhalmi-Friedman, P.B., Ahmad, W., Panteleyev, A.A., Aita, V.M., Christiano, A.M., 2001. Characterization of the desmosomal cadherin gene family: genomic organization of two desmoglein genes on human chromosome 18q12. *Exp. Dermatol.* 10, 90–94. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2001.010002090.x>.
- Fritschy, J.-M., 2008. Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. *Eur. J. Neurosci.* 28, 2365–2370. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06552.x>.
- Fukuoka, J., Dracheva, T., Shih, J.H., Hewitt, S.M., Fujii, T., Kishor, A., Mann, F., Shilo, K., Franks, T.J., Travis, W.D., Jen, J., 2007. Desmoglein 3 as a prognostic factor in lung cancer. *Hum. Pathol.* 38, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.08.006>.
- Funahashi, S.-I., Kawai, S., Fujii, E., Taniguchi, K., Nakano, K., Ishikawa, S., Aburatani, H., Suzuki, M., 2018. Generation of an anti-desmoglein 3 antibody without pathogenic activity of pemphigus vulgaris for therapeutic application to squamous cell carcinoma. *J. Biochem. (Tokyo)* 164, 471–481. <https://doi.org/10.1093/jb/mvy074>.
- Gadgeel, S.M., Ramalingam, S.S., Kalemkerian, G.P., 2012. Treatment of lung cancer. *Radiol. Clin. North Am.* 50, 961–974. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2012.06.003>.
- Galindo, I., Gómez-Morales, M., Díaz-Cano, I., Andrades, Á., Caba-Molina, M., Miranda-León, M.T., Medina, P.P., Martín-Padron, J., Fárez-Vidal, M.E., 2019. The value of desmosomal plaque-related markers to distinguish squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Ups. J. Med. Sci.* 125, 19–29. <https://doi.org/10.1080/03009734.2019.1692101>.
- Garrod, D., Chidgey, M., 2008. Desmosome structure, composition and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 572–587. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.014>.
- Garrod, D.R., Merritt, A.J., Nie, Z., 2002. Desmosomal cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 537–545. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(02\)00366-6](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(02)00366-6).
- Gérard, 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., Delincé, M., Essono, S., Jia, B., Iannascoli, B., Richard-Le Goff, O., Kumar, R., Stewart, S.N., Pousse, Y., Shen, B., Grosselin, K., Saudemont, B., Sautel-Caillé, A., Godina, A., McNamara, S., Eyer, K., Millot, G.A., Baudry, J., England, P., Nizak, C., Jensen, A., Griffiths, A.D., Bruhns, P., Brenan, C., 2020. High-throughput single-cell activity-based screening and sequencing of antibodies using droplet microfluidics. *Nat. Biotechnol.* 38, 715–721. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0466-7>.

- Getsios, S., Huen, A.C., Green, K.J., 2004. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 271–281. <https://doi.org/10.1038/nrm1356>.
- Gómez-Morales, M., Cámara-Pulido, M., Miranda-León, M.T., Sánchez-Palencia, A., Boyero, L., Gómez-Capilla, J.A., Fárez-Vidal, M.E., 2013. Differential immunohistochemical localization of desmosomal plaque-related proteins in non-small-cell lung cancer. *Histopathology* 63, 103–113. <https://doi.org/10.1111/his.12126>.
- Gorbsky, G., Steinberg, M.S., 1981. Isolation of the intercellular glycoproteins of desmosomes. *J. Cell Biol.* 90, 243–248. <https://doi.org/10.1083/jcb.90.1.243>
- Green, K.J., Gaudry, C.A., 2000. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 208–216. <https://doi.org/10.1038/35043032>.
- Green, K.J., Simpson, C.L., 2007. Desmosomes: new perspectives on a classic. *J. Invest. Dermatol.* 127, 2499–2515. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701015>
- Greenwood, M.D., Marsden, M.D., Cowley, C.M.E., Sahota, V.K., Buxton, R.S., 1997. Exon–Intron Organization of the Human Type 2 Desmocollin Gene (DSC2): Desmocollin Gene Structure Is Closer to “Classical” Cadherins Than to Desmogleins. *Genomics* 44, 330–335. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4894>.
- Gruver, A.M., Amin, M.B., Luthringer, D.J., Westfall, D., Arora, K., Farver, C.F., Osunkoya, A.O., McKenney, J.K., Hansel, D.E., 2012. Selective immunohistochemical markers to distinguish between metastatic high-grade urothelial carcinoma and primary poorly differentiated invasive squamous cell carcinoma of the lung. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 136, 1339–1346. <https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0575-OA>.
- GTEX Consortium, 2013. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat. Genet.* 45, 580–585. <https://doi.org/10.1038/ng.2653>.
- Gulmann, C., Butler, D., Kay, E., Grace, A., Leader, M., 2003. Biopsy of a biopsy: validation of immunoprofiling in gastric cancer biopsy tissue microarrays. *Histopathology* 42, 70–76. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2003.01556.x>.
- Gulmann, C., Paner, G.P., Parakh, R.S., Hansel, D.E., Shen, S.S., Ro, J.Y., Annaiah, C., Lopez-Beltran, A., Rao, P., Arora, K., Cho, Y., Herrera-Hernandez, L., Alsabeh, R., Amin, M.B., 2013. Immunohistochemical profile to distinguish urothelial from squamous differentiation in carcinomas of urothelial tract. *Hum. Pathol.* 44, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.05.018>.
- Gumbiner, B.M., 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 622–634. <https://doi.org/10.1038/nrm1699>.
- 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, 1231–1236. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.19648.x>.
- Harrison, O., Brasch, J., Lasso, G., Katsamba, P., Ahlsen, G., Honig, B., Shapiro, L., 2016. Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 201606272. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606272113>.
- Hartlieb, E., Kempf, B., Partilla, M., Vigh, B., Spindler, V., Waschke, J., 2013. Desmoglein 2 Is Less Important than Desmoglein 3 for Keratinocyte Cohesion. *PLOS ONE* 8, e53739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053739>.
- Heupel, W.-M., Zillikens, D., Drenckhahn, D., Waschke, J., 2008. Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 181, 1825–1834. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.1825>.

- Hoang, L.L., Tacha, D., Bremer, R.E., Haas, T.S., Cheng, L., 2015. Uroplakin II (UPII), GATA3, and p40 are Highly Sensitive Markers for the Differential Diagnosis of Invasive Urothelial Carcinoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM* 23, 711–716. <https://doi.org/10.1097/PAI.000000000000143>.
- Holthöfer, B., Windoffer, R., Troyanovsky, S., Leube, R.E., 2007. Structure and function of desmosomes. *Int. Rev. Cytol.* 264, 65–163. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)64003-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)64003-0).
- Hoos, A., Urist, M.J., Stojadinovic, A., Mastorides, S., Dudas, M.E., Leung, D.H., Kuo, D., Brennan, M.F., Lewis, J.J., Cordon-Cardo, C., 2001. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am. J. Pathol.* 158, 1245–1251. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64075-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64075-8).
- Howat, W.J., Wilson, B.A., 2014. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods San Diego Calif* 70, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.01.022>.
- Huang, W., Williamson, S.R., Rao, Q., Lopez-Beltran, A., Montironi, R., Eble, J.N., Grignon, D.J., Idrees, M.T., Emerson, R.E., Zhou, X.-J., Zhang, S., Baldrige, L.A., Hahn, N.M., Wang, M., Koch, M.O., Cheng, L., 2013. Novel markers of squamous differentiation in the urinary bladder. *Hum. Pathol.* 44, 1989–1997. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.04.005>.
- Huilgol, S.C., Black, M.M., 1995. Management of the immunobullous disorders. II. Pemphigus. *Clin. Exp. Dermatol.* 20, 283–293. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.1995.tb01327.x>.
- Hulpiau, P., van Roy, F., 2009. Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 349–369. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.09.027>
- Hunt, D., Rickman, L., Whittock, N., Eady, R., Šimrak, D., Dopping-Hepenstal, P., Stevens, H., Armstrong, Dk., Hennies, H., Küster, W., Hughes, A., Arnemann, J., Leigh, I., McGrath, J., Kelsell, D., Buxton, R., 2001. Spectrum of dominant mutations in the desmosomal cadherin desmoglein 1, causing the skin disease striate palmoplantar keratoderma. *Eur. J. Hum. Genet.* 9, 197–203. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200605>.
- Hunt, D.M., Sahota, V.K., Taylor, K., Šimrak, D., Hornigold, N., Arnemann, J., Wolfe, J., Buxton, R.S., 1999. Clustered Cadherin Genes: A Sequence-Ready Contig for the Desmosomal Cadherin Locus on Human Chromosome 18. *Genomics* 62, 445–455. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.6036>.
- Ivanov, D.B., Philippova, M.P., Tkachuk, V.A., 2001. Structure and Functions of Classical Cadherins. *Biochem. Mosc.* 66, 1174–1186. <https://doi.org/10.1023/A:1012445316415>.
- Iwasa, A., Oda, Y., Kaneki, E., Ohishi, Y., Kurihara, S., Yamada, T., Hirakawa, T., Wake, N., Tsuneyoshi, M., 2007. Squamous cell carcinoma arising in mature cystic teratoma of the ovary: an immunohistochemical analysis of its tumorigenesis. *Histopathology* 51, 98–104. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02727.x>.
- Izaguirre, M.F., Casco, V.H., 2016. E-cadherin roles in animal biology: A perspective on thyroid hormone-influence. *Cell Commun. Signal. CCS* 14, 27. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0150-1>.
- Johnson, J.L., Najor, N.A., Green, K.J., 2014. Desmosomes: Regulators of Cellular Signaling and Adhesion in Epidermal Health and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4, a015297. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015297>
- Jones, J.C., Yokoo, K.M., Goldman, R.D., 1986. Further analysis of pemphigus autoantibodies and their use in studies on the heterogeneity, structure, and function of desmosomes. *J. Cell Biol.* 102, 1109–1117. <https://doi.org/10.1083/jcb.102.3.1109>.

- Kanno, M., Isa, Y., Aoyama, Y., Yamamoto, Y., Nagai, M., Ozawa, M., Kitajima, Y., 2008. P120-catenin is a novel desmoglein 3 interacting partner: identification of the p120-catenin association site of desmoglein 3. *Exp. Cell Res.* 314, 1683–1692. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.01.031>.
- Karlsson, M., Zhang, C., Méar, L., Zhong, W., Digre, A., Katona, B., Sjöstedt, E., Butler, L., Odeberg, J., Dusart, P., Edfors, F., Oksvold, P., von Feilitzen, K., Zwahlen, M., Arif, M., Altay, O., Li, X., Ozcan, M., Mardinoglu, A., Fagerberg, L., Mulder, J., Luo, Y., Ponten, F., Uhlén, M., Lindskog, C., 2021. A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci. Adv.* 7, eabh2169. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abh2169>.
- Kárpáti, S., Amagai, M., Prussick, R., Cehrs, K., Stanley, J.R., 1993. Pemphigus vulgaris antigen, a desmoglein type of cadherin, is localized within keratinocyte desmosomes. *J. Cell Biol.* 122, 409–415. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.2.409>
- Kárpáti, S., Amagai, M., Prussick, R., Stanley, J.R., 1994. Pemphigus vulgaris antigen is a desmosomal desmoglein. *Dermatol. Basel Switz.* 189 Suppl 1, 24–26. <https://doi.org/10.1159/000246923>.
- Kazakydasan, S., Rahman, Z.A.A., Ismail, S.M., Abraham, M.T., Kallarakkal, T.G., 2017. Prognostic significance of VEGF-C in predicting micrometastasis and isolated tumour cells in N0 oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* 46, 194–200. <https://doi.org/10.1111/jop.12476>.
- Kempf, B., 2020. Interaktion ausgewählter Mechanismen der Pemphigus-Pathogenese. *Med. Dissertation.* Julius-Maximilians-Universität Würzburg. <https://doi.org/10.25972/OPUS-22048>.
- Kitajima, Y., 2013. New insights into desmosome regulation and pemphigus blistering as a desmosome-remodeling disease. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 29, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2012.08.001>.
- Kluth, M., Harasimowicz, S., Burkhardt, L., Grupp, K., Krohn, A., Prien, K., Gjoni, J., Haß, T., Galal, R., Graefen, M., Haese, A., Simon, R., Hühne-Simon, J., Koop, C., Korb, J., Weischenfeld, J., Huland, H., Sauter, G., Quaas, A., Wilczak, W., Tsourlakidis, M.-C., Minner, S., Schlomm, T., 2014. Clinical significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer. *Int. J. Cancer* 135, 1369–1380. <https://doi.org/10.1002/ijc.28784>.
- Kneisel, A., Hertl, M., 2011. Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *J. Dtsch. Dermatol. Ges. J. Ger. Soc. Dermatol. JDDG* 9, 844–856; quiz 857. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2011.07793.x>.
- Koch, P.J., Goldschmidt, M.D., Walsh, M.J., Zimbelmann, R., Schmelz, M., Franke, W.W., 1991. Amino acid sequence of bovine muzzle epithelial desmocollin derived from cloned cDNA: a novel subtype of desmosomal cadherins. *Differ. Res. Biol. Divers.* 47, 29–36. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1991.tb00218.x>.
- Koch, P.J., Goldschmidt, M.D., Zimbelmann, R., Troyanovsky, R., Franke, W.W., 1992. Complexity and expression patterns of the desmosomal cadherins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 353–357. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.1.353>.
- Koch, P.J., Mahoney, M.G., Cotsarelis, G., Rothenberger, K., Lavker, R.M., Stanley, J.R., 1998. Desmoglein 3 anchors telogen hair in the follicle. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 17), 2529–2537. <https://doi.org/10.1242/jcs.111.17.2529>.
- Koch, P.J., Walsh, M.J., Schmelz, M., Goldschmidt, M.D., Zimbelmann, R., Franke, W.W., 1990. Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. *Eur. J. Cell Biol.* 53, 1–12.
- Koga, H., Tsuruta, D., Ohyama, B., Ishii, N., Hamada, T., Ohata, C., Furumura, M., Hashimoto, T., 2013. Desmoglein 3, its pathogenicity and a possibility for therapeutic target in pemphigus vulgaris. *Expert Opin. Ther. Targets* 17, 293–306. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.744823>.

- 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, 844–847. <https://doi.org/10.1038/nm0798-844>.
- Kowalczyk, A.P., Green, K.J., 2013. Structure, function, and regulation of desmosomes. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 116, 95–118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00005-4>.
- Krunic, A.L., Garrod, D.R., Smith, N.P., Orchard, G.S., Cvijetic, O.B., 1996. Differential expression of desmosomal glycoproteins in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin: an immunohistochemical aid to diagnosis. *Acta Derm. Venereol.* 76, 394–398. <https://doi.org/10.2340/0001555576394398>.
- Kurosawa, N., Yoshioka, M., Fujimoto, R., Yamagishi, F., Isobe, M., 2012. Rapid production of antigen-specific monoclonal antibodies from a variety of animals. *BMC Biol.* 10, 80. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-80>.
- Lee, J., Boutz, D.R., Chromikova, V., Joyce, M.G., Vollmers, C., Leung, K., Horton, A.P., DeKosky, B.J., Lee, C.-H., Lavinder, J.J., Murrin, E.M., Chrysostomou, C., Hoi, K.H., Tsybovsky, Y., Thomas, P.V., Druz, A., Zhang, B., Zhang, Y., Wang, L., Kong, W.-P., Park, D., Popova, L.I., Dekker, C.L., Davis, M.M., Carter, C.E., Ross, T.M., Ellington, A.D., Wilson, P.C., Marcotte, E.M., Mascola, J.R., Ippolito, G.C., Krammer, F., Quake, S.R., Kwong, P.D., Georgiou, G., 2016. Molecular-level analysis of the serum antibody repertoire in young adults before and after seasonal influenza vaccination. *Nat. Med.* 22, 1456–1464. <https://doi.org/10.1038/nm.4224>
- Liao, R.G., Watanabe, H., Meyerson, M., Hammerman, P.S., 2012. Targeted therapy for squamous cell lung cancer. *Lung Cancer Manag.* 1, 293–300. <https://doi.org/10.2217/lmt.12.40>.
- 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 J. Moffitt Cancer Cent.* 24, 78–82. <https://doi.org/10.1177/107327481702400113>.
- Lizio, M., Harshbarger, J., Abugessaisa, I., Noguchi, S., Kondo, A., Severin, J., Mungall, C., Arenillas, D., Mathelier, A., Medvedeva, Y.A., Lennartsson, A., Drabløs, F., Ramilowski, J.A., Rackham, O., Gough, J., Andersson, R., Sandelin, A., Ienasescu, H., Ono, H., Bono, H., Hayashizaki, Y., Carninci, P., Forrest, A.R.R., Kasukawa, T., Kawaji, H., 2017. Update of the FANTOM web resource: high resolution transcriptome of diverse cell types in mammals. *Nucleic Acids Res.* 45, D737–D743. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw995>.
- Lizio, M., Harshbarger, J., Shimoji, H., Severin, J., Kasukawa, T., Sahin, S., Abugessaisa, I., Fukuda, S., Hori, F., Ishikawa-Kato, S., Mungall, C.J., Arner, E., Baillie, J.K., Bertin, N., Bono, H., de Hoon, M., Diehl, A.D., Dimont, E., Freeman, T.C., Fujieda, K., Hide, W., Kaliyaperumal, R., Katayama, T., Lassmann, T., Meehan, T.F., Nishikata, K., Ono, H., Rehli, M., Sandelin, A., Schultes, E.A., 't Hoen, P.A.C., Tatum, Z., Thompson, M., Toyoda, T., Wright, D.W., Daub, C.O., Itoh, M., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Forrest, A.R.R., Kawaji, H., FANTOM consortium, 2015. Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas. *Genome Biol.* 16, 22. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0560-6>.
- Lobo, N., Shariat, S.F., Guo, C.C., Fernandez, M.I., Kassouf, W., Choudhury, A., Gao, J., Williams, S.B., Galsky, M.D., Taylor, J.A., Roupret, M., Kamat, A.M., 2020. What Is the Significance of Variant Histology in Urothelial Carcinoma? *Eur. Urol. Focus* 6, 653–663. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2019.09.003>.
- Logothetis, C.J., Dexeus, F.H., Chong, C., Sella, A., Ayala, A.G., Ro, J.Y., Pilat, S., 1989. Cisplatin, cyclophosphamide and doxorubicin chemotherapy for unresectable urothelial tumors: the M.D. Anderson experience. *J. Urol.* 141, 33–37. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)40578-7](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)40578-7).

- Logothetis, C.J., Samuels, M.L., Ogden, S., Dexeus, F.H., Swanson, D., Johnson, D.E., von Eschenbach, A., 1985. Cyclophosphamide, doxorubicin and cisplatin chemotherapy for patients with locally advanced urothelial tumors with or without nodal metastases. *J. Urol.* 134, 460–464. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)47240-5](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)47240-5).
- Lotan, T.L., Gurel, B., Sutcliffe, S., Esopi, D., Liu, W., Xu, J., Hicks, J.L., Park, B.H., Humphreys, E., Partin, A.W., Han, M., Netto, G.J., Isaacs, W.B., De Marzo, A.M., 2011. PTEN protein loss by immunostaining: analytic validation and prognostic indicator for a high risk surgical cohort of prostate cancer patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 6563–6573. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1244>.
- Lotan, T.L., Wei, W., Ludkovski, O., Morais, C.L., Guedes, L.B., Jamaspishvili, T., Lopez, K., Hawley, S.T., Feng, Z., Fazli, L., Hurtado-Coll, A., McKenney, J.K., Simko, J., Carroll, P.R., Gleave, M., Lin, D.W., Nelson, P.S., Thompson, I.M., True, L.D., Brooks, J.D., Lance, R., Troyer, D., Squire, J.A., 2016. Analytic Validation of a Clinical-Grade PTEN Immunohistochemistry Assay in Prostate Cancer by Comparison to PTEN FISH. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 29, 904–914. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.88>.
- Lu, R.-M., Hwang, Y.-C., Liu, I.-J., Lee, C.-C., Tsai, H.-Z., Li, H.-J., Wu, H.-C., 2020. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J. Biomed. Sci.* 27, 1. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>.
- Ma, H., Ó'Fágáin, C., O'Kennedy, R., 2020. Antibody stability: A key to performance - Analysis, influences and improvement. *Biochimie* 177, 213–225. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.08.019>.
- 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, 7203–7209.
- Mancini, M., Bassani, S., Passafaro, M., 2020. Right Place at the Right Time: How Changes in Protocadherins Affect Synaptic Connections Contributing to the Etiology of Neurodevelopmental Disorders. *Cells* 9, 2711. <https://doi.org/10.3390/cells9122711>.
- 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, 250–253. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.3.250>.
- Mirlacher, M., Kasper, M., Storz, M., Knecht, Y., Dürmüller, U., Simon, R., Mihatsch, M.J., Sauter, G., 2004. Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 17, 1414–1420. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800208>.
- Moeder, C.B., Giltmane, J.M., Harigopal, M., Molinaro, A., Robinson, A., Gelmon, K., Huntsman, D., Camp, R.L., Rimm, D.L., American Society of Clinical Oncology, College of American Pathologists, 2007. Quantitative justification of the change from 10% to 30% for human epidermal growth factor receptor 2 scoring in the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guidelines: tumor heterogeneity in breast cancer and its implications for tissue microarray based assessment of outcome. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 5418–5425. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.8033>.
- Morrison, G.A., Shaw, H.J., 1988. Squamous carcinoma arising within a Warthin's tumour of the parotid gland. *J. Laryngol. Otol.* 102, 1189–1191. <https://doi.org/10.1017/s0022215100107686>.
- Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M., Rini, J.M., 1996. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 380, 360–364. <https://doi.org/10.1038/380360a0>.
- Nagvekar, S., Spadigam, A., Dhupar, A., 2016. Determining the potential of desmoglein 3 as a sensitive and specific immunohistochemical marker for the detection of micrometastasis in patients with primary oral squamous cell carcinoma.

- Contemp. Oncol. Poznan Pol. 20, 374–380.
<https://doi.org/10.5114/wo.2016.64596>.
- Nie, Z., Merritt, A., Rouhi-Parkouhi, M., Tabernero, L., Garrod, D., 2011. Membrane-impermeable Cross-linking Provides Evidence for Homophilic, Isoform-specific Binding of Desmosomal Cadherins in Epithelial Cells♦. *J. Biol. Chem.* 286, 2143–2154. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.192245>.
- Nocito, A., Bubendorf, L., Tinner, E.M., Süess, K., Wagner, U., Forster, T., Kononen, J., Fijan, A., Bruderer, J., Schmid, U., Ackermann, D., Maurer, R., Alund, G., Knönagel, H., Rist, M., Anabitar, M., Hering, F., Hardmeier, T., Schoenenberger, A.J., Flury, R., Jäger, P., Fehr, J.L., Schraml, P., Moch, H., Mihatsch, M.J., Gasser, T., Sauter, G., 2001. Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J. Pathol.* 194, 349–357. [https://doi.org/10.1002/1096-9896\(200107\)194:3<349::AID-PATH887>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1096-9896(200107)194:3<349::AID-PATH887>3.0.CO;2-D).
- Nollet, F., Kools, P., van Roy, F., 2000. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J. Mol. Biol.* 299, 551–572. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3777>
- Nomenclature of the desmosomal cadherins, 1993. *J. Cell Biol.* 121, 481–483.
- Nuber, U.A., Schäfer, S., Schmidt, A., Koch, P.J., Franke, W.W., 1995. The widespread human desmocollin Dsc2 and tissue-specific patterns of synthesis of various desmocollin subtypes. *Eur. J. Cell Biol.* 66, 69–74.
- Ormanns, S., Altendorf-Hofmann, A., Jackstadt, R., Horst, D., Assmann, G., Zhao, Y., Bruns, C., Kirchner, T., Knösel, T., 2015. Desmogleins as prognostic biomarkers in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* 113, 1460–1466. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.362>.
- Ozuner, G., Aytac, E., Gorgun, E., Bennett, A., 2015. Colorectal squamous cell carcinoma: a rare tumor with poor prognosis. *Int. J. Colorectal Dis.* 30, 127–130. <https://doi.org/10.1007/s00384-014-2058-9>.
- Paker, I., Yilmazer, D., Arikok, A.T., Saylam, G., Hucumenoglu, S., 2012. Basal cell adenoma with extensive squamous metaplasia and cellular atypia: a case report with cytohistopathological correlation and review of the literature. *Diagn. Cytopathol.* 40, 48–55. <https://doi.org/10.1002/dc.21584>.
- Patel, V., Martin, D., Malhotra, R., Marsh, C.A., Doçi, C.L., Nathan, C.-A.O., Sinha, U.K., Singh, B., Molinolo, A.A., Rusling, J.F., Gutkind, J.S., 2013. DSG3 as a Biomarker for the Ultrasensitive Detection of Occult Lymph Node Metastasis in Oral Cancer Using Nanostructured Immunoarrays. *Oral Oncol.* 49, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.08.001>.
- Pietkiewicz, P., Gornowicz-Porowska, J., Bowszyc-Dmochowska, M., Jagielska, J., Helak-Łapaj, C., Kaczmarek, E., Dmochowski, M., 2014. Discordant expression of desmoglein 2 and 3 at the mRNA and protein levels in nodular and superficial basal cell carcinoma revealed by immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Clin. Exp. Dermatol.* 39, 628–635. <https://doi.org/10.1111/ced.12355>
- Pollmann, R., 2020. Charakterisierung der adaptiven Autoimmunantwort beim Pemphigus vulgaris. Dr. rer. nat. Dissertation. Universität Marburg.
- Posy, S., Shapiro, L., Honig, B., 2008. Sequence and structural determinants of strand swapping in cadherin domains: do all cadherins bind through the same adhesive interface? *J. Mol. Biol.* 378, 954–968. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.02.063>.
- Raman, P., Maddipati, R., Lim, K.H., Tozeren, A., 2018. Pancreatic cancer survival analysis defines a signature that predicts outcome. *PloS One* 13, e0201751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201751>.
- Ramos-Vara, J.A., Miller, M.A., 2014. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. *Vet. Pathol.* 51, 42–87. <https://doi.org/10.1177/0300985813505879>.
- Rehman, A., Cai, Y., Hünefeld, C., Jedličková, H., Huang, Y., Teck Teh, M., Sharif Ahmad, U., Uttagomol, J., Wang, Y., Kang, A., Warnes, G., Harwood, C.,

- Bergamaschi, D., Kenneth Parkinson, E., Röcken, M., Wan, H., 2019. The desmosomal cadherin desmoglein-3 acts as a keratinocyte anti-stress protein via suppression of p53. *Cell Death Dis.* 10, 750. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1988-0>.
- Rosen, D.G., Huang, X., Deavers, M.T., Malpica, A., Silva, E.G., Liu, J., 2004. Validation of tissue microarray technology in ovarian carcinoma. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 17, 790–797. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800120>.
- Rötzer, V., Hartlieb, E., Winkler, J., Walter, E., Schlipp, A., Sardy, M., Spindler, V., Waschke, J., 2016. Desmoglein 3-Dependent Signaling Regulates Keratinocyte Migration and Wound Healing. *J. Invest. Dermatol.* 136, 301–310. <https://doi.org/10.1038/JID.2015.380>.
- Rubin, M.A., Dunn, R., Strawderman, M., Pienta, K.J., 2002. Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. *Am. J. Surg. Pathol.* 26, 312–319. <https://doi.org/10.1097/00000478-200203000-00004>.
- Ruiz, C., Seibt, S., Al Kuraya, K., Siraj, A.K., Mirlacher, M., Schraml, P., Maurer, R., Spichtin, H., Torhorst, J., Popovska, S., Simon, R., Sauter, G., 2006. Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *Int. J. Cancer* 118, 2190–2194. <https://doi.org/10.1002/ijc.21581>.
- Saaber, F., Chen, Y., Cui, T., Yang, L., Mireskandari, M., Petersen, I., 2015. Expression of desmogleins 1-3 and their clinical impacts on human lung cancer. *Pathol. Res. Pract.* 211, 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2014.10.008>.
- Saito, M., Tucker, D.K., Kohlhorst, D., Niessen, C.M., Kowalczyk, A.P., 2012. Classical and desmosomal cadherins at a glance. *J. Cell Sci.* 125, 2547–2552. <https://doi.org/10.1242/jcs.066654>.
- Sakai, Y., Nakai, T., Ohbayashi, C., Imagawa, N., Yanagita, E., Satake, R., Nitta, A., Kajimoto, K., Sakuma, T., Itoh, T., 2013. Immunohistochemical profiling of ALK fusion gene-positive adenocarcinomas of the lung. *Int. J. Surg. Pathol.* 21, 476–482. <https://doi.org/10.1177/1066896913489345>
- Saper, C.B., 2009. A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 57, 1–5. <https://doi.org/10.1369/jhc.2008.952770>.
- Savci-Heijink, C.D., Kosari, F., Aubry, M.-C., Caron, B.L., Sun, Z., Yang, P., Vasmatazis, G., 2009. The role of desmoglein-3 in the diagnosis of squamous cell carcinoma of the lung. *Am. J. Pathol.* 174, 1629–1637. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080778>.
- Schmelz, M., Duden, R., Cowin, P., Franke, W.W., 1986. A constitutive transmembrane glycoprotein of Mr 165,000 (desmoglein) in epidermal and non-epidermal desmosomes. II. Immunolocalization and microinjection studies. *Eur. J. Cell Biol.* 42, 184–199.
- Shapiro, L., Fannon, A.M., Kwong, P.D., Thompson, A., Lehmann, M.S., Grübel, G., Legrand, J.F., Als-Nielsen, J., Colman, D.R., Hendrickson, W.A., 1995. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374, 327–337. <https://doi.org/10.1038/374327a0>.
- Shapiro, L., Weis, W.I., 2009. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a003053. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003053>.
- Shi, S.R., Key, M.E., Kalra, K.L., 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 39, 741–748. <https://doi.org/10.1177/39.6.1709656>.
- Silos, S.A., Tamai, K., Li, K., Kivirikko, S., Kouba, D., Christiano, A.M., Uitto, J., 1996. Cloning of the gene for human pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3), a desmosomal cadherin. Characterization of the promoter region and identification of a keratinocyte-specific cis-element. *J. Biol. Chem.* 271, 17504–17511. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.29.17504>.

- Simon, R., Mirlacher, M., Sauter, G., 2004. Tissue microarrays. *BioTechniques* 36, 98–105. <https://doi.org/10.2144/04361RV01>.
- Simon, R., Sauter, G., 2002. Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors. *Exp. Hematol.* 30, 1365–1372. [https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(02\)00965-7](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(02)00965-7).
- Sjödahl, G., Lauss, M., Lövgren, K., Chebil, G., Gudjonsson, S., Veerla, S., Patschan, O., Aine, M., Fernö, M., Ringnér, M., Månsson, W., Liedberg, F., Lindgren, D., Höglund, M., 2012. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 3377–3386. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0077-T>.
- Sternberger, L.A., Hardy, P.H., Cuculis, J.J., Meyer, H.G., 1970. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 18, 315–333. <https://doi.org/10.1177/18.5.315>
- Stevens, K.A., Kovach, C.K., Tompkins, M., Ruegg, P., Cohen, C., 2016. Heat-induced Epitope Retrieval for Immunohistochemistry at High Altitude: A Quality Assurance Study. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM* 24, 531–534. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000214>.
- Szade, J., Majewska, H.I., Żaczek, A.J., Biernat, W., 2019. High-grade non-small cell lung carcinoma: a comparative analysis of the phenotypic profile in small biopsies with the corresponding postoperative material. *Pol. J. Pathol. Off. J. Pol. Soc. Pathol.* 70, 100–108. <https://doi.org/10.5114/pjp.2019.84087>.
- Tacha, D., Yu, C., Bremer, R., Qi, W., Haas, T., 2012. A 6-antibody panel for the classification of lung adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM* 20, 201–207. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31823d7f0e>.
- Takamochi, K., Ohmiya, H., Itoh, M., Mogushi, K., Saito, T., Hara, K., Mitani, K., Kogo, Y., Yamanaka, Y., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Oh, S., Suzuki, K., Kawaji, H., 2016. Novel biomarkers that assist in accurate discrimination of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung. *BMC Cancer* 16, 760. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2792-1>.
- Takeichi, M., 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251, 1451–1455. <https://doi.org/10.1126/science.2006419>.
- Tejera Hernández, A.A., Vega Benítez, V.M., Pavcovich Ruiz, M., Hernández Hernández, J.R., 2022. Metaplastic carcinoma of the breast with squamous differentiation: prognostic factors and multidisciplinary treatment. *World J. Surg. Oncol.* 20, 187. <https://doi.org/10.1186/s12957-022-02656-5>.
- 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, 2249–2256. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63075-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63075-1).
- Travaglino, A., Raffone, A., Russo, D., Guadagno, E., Pignatiello, S., Moretta, P., Zullo, F., Del Basso De Caro, M., Insabato, L., Mascolo, M., 2021. Does endometrial morular metaplasia represent odontogenic differentiation? *Virchows Arch.* 479, 607–616. <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03060-2>.
- Travis, W.D., Travis, L.B., Devesa, S.S., 1995. Lung cancer. *Cancer* 75, 191–202. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19950101\)75:1+<191::aid-cncr2820751307>3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19950101)75:1+<191::aid-cncr2820751307>3.0.co;2-y).
- Travis, W.D., Brambilla, E., Burke, A.P., Marx, A., Nicholson, A.G., 2015. Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 10, 1240–1242. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000663>

- Troeltzsch, Matthias, Künzel, V., Haidari, S., Troeltzsch, Markus, Otto, S., Ehrenfeld, M., Probst, F., Knösel, T., 2022. Desmoglein-3 overexpression in oral squamous cell carcinoma is associated with metastasis formation and early recurrence: An immunohistochemical study. *J. Cranio-Maxillo-fac. Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-fac. Surg.* 50, 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2021.11.015>.
- Truong, L.D., Mody, D.R., Cagle, P.T., Jackson-York, G.L., Schwartz, M.R., Wheeler, T.M., 1990. Thymic carcinoma. A clinicopathologic study of 13 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 14, 151–166. <https://doi.org/10.1097/00000478-199002000-00007>.
- Tsang, S.M., Liu, L., Teh, M.-T., Wheeler, A., Grose, R., Hart, I.R., Garrod, D.R., Fortune, F., Wan, H., 2010. Desmoglein 3, via an Interaction with E-cadherin, Is Associated with Activation of Src. *PLoS ONE* 5, e14211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014211>.
- Tselepis, C., Chidgey, M., North, A., Garrod, D., 1998. Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8064–8069. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8064>.
- Uhlen, M., Bandrowski, A., Carr, S., Edwards, A., Ellenberg, J., Lundberg, E., Rimm, D.L., Rodriguez, H., Hiltke, T., Snyder, M., Yamamoto, T., 2016. A proposal for validation of antibodies. *Nat. Methods* 13, 823–827. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3995>.
- Vleminckx, K., Kemler, R., 1999. Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 21, 211–220. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199903\)21:3<211::AID-BIES5>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199903)21:3<211::AID-BIES5>3.0.CO;2-P).
- Wan, H., 2016. Desmoglein-3, in: Choi, S. (Ed.), *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer, New York, NY, pp. 1–15. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6438-9_101583-1.
- Wan, H., Lin, K., Tsang, S.M., Uttagomol, J., 2016. Evidence for Dsg3 in regulating Src signaling by competing with it for binding to caveolin-1. *Data Brief* 6, 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.11.049>.
- Wang, D., Chen, Z., 2021. Paraneoplastic pemphigus associated with small lymphocytic lymphoma: A case report. *Medicine (Baltimore)* 100, e24039. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000024039>
- Wang, L., Liu, T., Wang, Y., Cao, L., Nishioka, M., Aguirre, R.L., Ishikawa, A., Geng, L., Okada, N., 2007. Altered expression of desmocollin 3, desmoglein 3, and beta-catenin in oral squamous cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and cell proliferation. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 451, 959–966. <https://doi.org/10.1007/s00428-007-0485-5>.
- Waschke, J., 2008. The desmosome and pemphigus. *Histochem. Cell Biol.* 130, 21–54. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0420-0>.
- Waschke, J., Spindler, V., 2014. Desmosomes and extradesmosomal adhesive signaling contacts in pemphigus. *Med. Res. Rev.* 34, 1127–1145. <https://doi.org/10.1002/med.21310>.
- Wheelock, M.J., Johnson, K.R., 2003. Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 509–514. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(03\)00101-7](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(03)00101-7)
- Whitlock, N.V., Haftek, M., Angoulvant, N., Wolf, F., Perrot, H., Eady, R.A., McGrath, J.A., 2000. Genomic amplification of the human plakophilin 1 gene and detection of a new mutation in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. *J. Invest. Dermatol.* 115, 368–374. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00082.x>.
- 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, 2993–2998. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213737110>.

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.06.009>.
- Yagi, T., Takeichi, M., 2000. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev.* 14, 1169–1180.
- Yin, T., Green, K.J., 2004. Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 665–677. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2004.09.005>
- Yorita, K., Nakagawa, H., Miyazaki, K., Fukuda, J., Ito, S., Kosai, M., 2019. Infarcted Warthin tumor with mucoepidermoid carcinoma-like metaplasia: a case report and review of the literature. *J. Med. Case Reports* 13, 12. <https://doi.org/10.1186/s13256-018-1941-3>.
- Zaino, R.J., Kurman, R., Herbold, D., Gliedman, J., Bundy, B.N., Voet, R., Advani, H., 1991. The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma. Data from a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* 68, 2293–2302. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19911115\)68:10<2293::aid-cncr2820681032>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19911115)68:10<2293::aid-cncr2820681032>3.0.co;2-v).
- Zhan, C., Yan, L., Wang, L., Sun, Y., Wang, X., Lin, Z., Zhang, Y., Shi, Y., Jiang, W., Wang, Q., 2015. Identification of immunohistochemical markers for distinguishing lung adenocarcinoma from squamous cell carcinoma. *J. Thorac. Dis.* 7, 1398–1405. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.07.25>
- Zhang, D., Salto-Tellez, M., Putti, T.C., Do, E., Koay, E.S.-C., 2003. Reliability of tissue microarrays in detecting protein expression and gene amplification in breast cancer. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 16, 79–84. <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000047307.96344.93>.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben. Zuerst gebührt mein Dank Prof. Dr. Guido Sauter für die konstruktive Betreuung dieser Promotionsarbeit, die hilfreichen Anregungen und die hervorragende Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Ich bedanke mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Ronald Simon und Frau Dr. rer. nat. Martina Kluth für die zielgerichtete und fachliche Betreuung. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie und im Besonderen Dr. Maximilian Lennartz, Laura Behm, Ingeborg Brandt, Sünje Seekamp und Maren Eisenberg bedanken. Mein besonderer Dank gilt meiner Familie insbesondere meiner Frau Nai für ihre Geduld, Ermutigungen und die vielseitige Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit. Ewig tiefverbunden und dankbar bin ich meiner Mutter Amira, die immer an mich geglaubt hat und den Abschluss meiner Dissertation nicht mehr erleben durfte.

10 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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: