

**Die Expression von Cytokeratin-10 (CK10) in Tumoren und
Normalgeweben: Eine Tissue Microarray-Studie an 11.021
Tumoren**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Moussa Abboud aus

Hamburg

2025

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Guido Sauter

Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Stefan Schneider

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Stefan Schneider

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Katja Weisel

Mitglied der Prüfungskommission: PD Dr. Ursula Valentiner

Datum der mündlichen Prüfung: 29.10.2025

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Zytoskelett	5
1.2. Intermediärfilamente	5
1.3. Cytokeratine	7
1.4. Cytokeratin 10	11
1.4.1. Allgemeines	11
1.4.2. Cytokeratin 10 in Normalgeweben	12
1.4.3. Cytokeratin 10 in Tumoren	13
1.5. Zielsetzung dieser Studie	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Tissue Microarray Technik	16
2.2. TMA für das CK10–Projekt	23
2.3. Immunhistochemie	25
2.4. Immunhistochemische Cytokeratin 10 Untersuchung in unserer Studie	28
2.5. Statistik	30
3. Ergebnisse	31
3.1. Technische Aspekte	31
3.2. Cytokeratin-10 Expression in Normalgeweben	32
3.3. Cytokeratin 10 in Tumorgeweben	36
3.4. Cytokeratin 10 Immunfärbung und Tumorphänotyp/Prognose	49
4. Diskussion	53
5. Zusammenfassung	61
6. English Summary	62
7. Abkürzungsverzeichnis	63
8. Literaturverzeichnis	64

10. Abbildungsverzeichnis	78
11. Tabellenverzeichnis.....	80
12. Erklärung des Eigenanteils	81
13. Eidesstaatliche Erklärung	82
14. Danksagung.....	83

1. Einleitung

1.1. Zytoskelett

Das Zytoskelett von eukaryotischen Zellen ist ein zusammenhängendes Netz aus fadenförmigen Polymeren und regulatorischen Proteinen, welches die eukaryotische Zelle dazu befähigt, den Inhalt der Zelle räumlich zu organisieren, sich biochemisch und physisch mit der Umgebung zu verbinden und Bewegungen sowie Formveränderungen auszuführen. Als dynamisches und anpassungsfähiges Netzwerk ist es sowohl in der Lage, Verformungen zu widerstehen, als auch auf von außen wirkende Kräfte durch strukturelle Reorganisation zu reagieren (Fischer und Fowler 2015; Fletcher und Mullins 2010).

Es besteht im Wesentlichen aus den drei Hauptkomponenten: Aktinfilamente (auch Mikrofilamente, \varnothing 6-8 nm), Intermediärfilamente (\varnothing 10nm) und Mikrotubuli (\varnothing 23-25 nm) (Etienne-Manneville 2018; Fuchs und Weber 1994; Godsel et al. 2008).

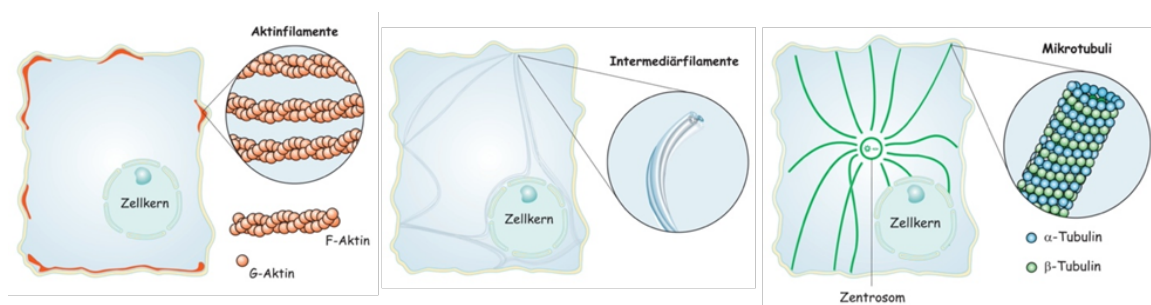


Abbildung 1: Die Hauptkomponenten des Zytoskeletts. Quelle der Abbildung: (Horn 2020)

1.2. Intermediärfilamente

Intermediärfilamente (IF) sind zytoplasmatisch gelegene, flexible, stäbchenförmige Faserproteine, welche Teil des Zytoskeletts sind. Mit einem Durchmesser von 10nm liegen Intermediärfilamente zwischen dem Durchmesser der Mikrofilamente (\varnothing 6-8 nm) und dem der Mikrotubuli (\varnothing 23-25 nm). Dies erklärt auch die Namensgebung dieser Filamente, da intermediär dazwischen liegend bedeutet (Fuchs und Weber 1994; Godsel et al. 2008; Nath und Horn 2020).

Intermediärfilamenten kommen durch ihre Eigenschaften eine wichtige Rolle für die Form und Gestalt der Zelle zu. Dabei weisen sie im Vergleich zu Mikrofilamenten und Mikrotubuli eine besonders hohe Stabilität und Resistenz gegenüber Beeinträchtigungen auf und sind

gleichzeitig reaktionsfähige, hochdynamische Strukturen, welche in der Lage sind, sich zu verkürzen, zu verlängern und neu anzuordnen (Etienne-Manneville 2018; Robert et al. 2016; Ulfing 2019).

Die IF-Proteine sind vielfältig und werden zellspezifisch exprimiert. Dabei können sie auf Grundlage ihrer Primärstrukturhomologie in 6 Subtypen (Tabelle 1) unterteilt werden (Leduc und Etienne-Manneville 2015; Szeverenyi et al. 2008). Strukturell weisen alle IF-Proteine eine zentral gelegene α -helikale Domäne (Stabdomäne) auf, welche von einer N-terminalen Domäne (Kopfdomäne) und einer C-terminalen Domäne (Schwanzdomäne) flankiert wird (Etienne-Manneville 2018). Die Stäbchendomänen zweier IF-Polypeptide richten sich parallel aus und bilden ein Dimer, welches sich wiederum antiparallel mit einem anderen Dimer zu einem unpolaren Tetramer verbindet. Acht Tetramere fügen sich seitlich zusammen und verbinden sich schließlich zu einem unpolaren Intermediärfilament (Robert et al. 2016) (Abbildung 2).

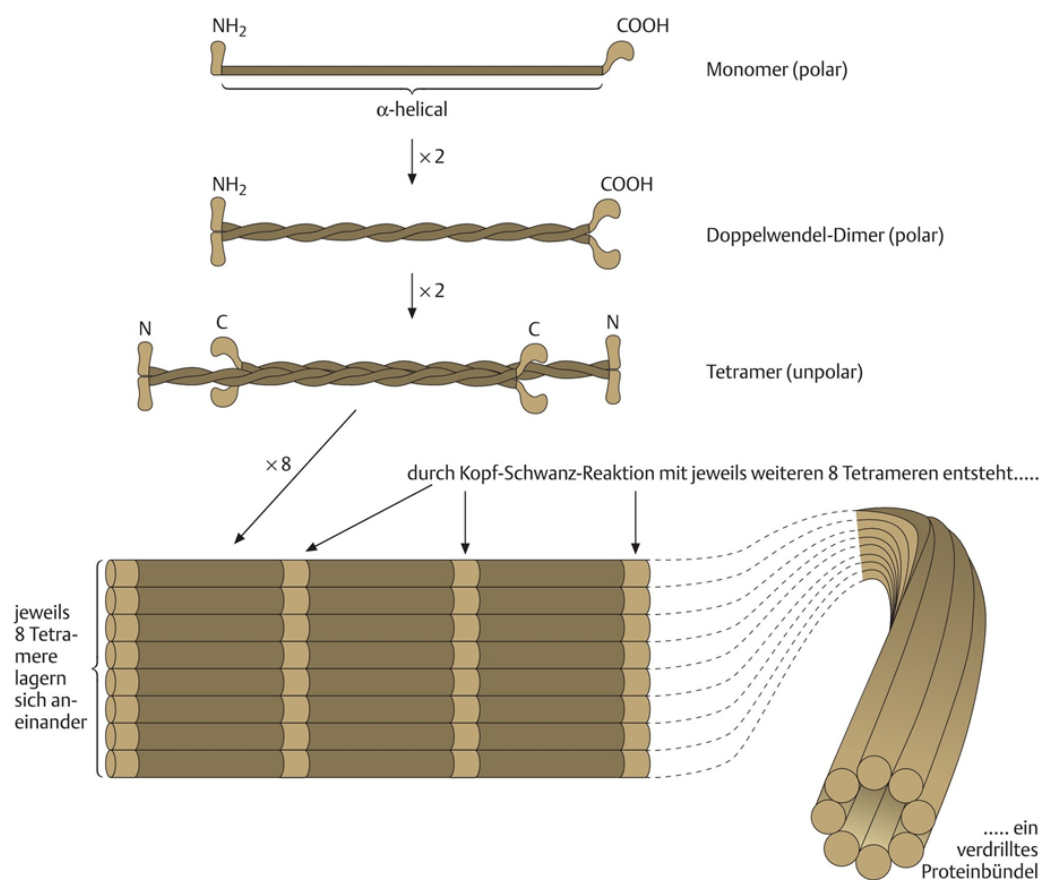


Abbildung 2: Aufbau von Intermediärfilamenten. Quelle der Abbildung: (Poeggel 2013).

Insgesamt werden sie von ca. 70 IF-Genen im menschlichen Genom kodiert, wovon nur 54 den Keratinen zugeordnet werden können (Godsel et al. 2008; Leduc und Etienne-Manneville 2015; Szeverenyi et al. 2008).

Tabelle 1: Intermediärfilamenttypen. Quelle: (Briot et al. 2020)

Protein	Filament Typ	Anzahl der Gene	Masse (kDa)	Zellentyp / Verteilung
Saure Keratine	I	>50	40-60	Keratinocyten/cytosol (epidermis, Haarfollikel, Nägel)
Basische Keratine	II	>50	50-70	Keratinocyten/cytosol (epidermis, Haarfollikel, Nägel)
Vimentin	III	1	54	Mesenchymale Zellen / Cytosol
Desmin	III	1	54	Muskelzellen / Sarkomer
Saures fibrilläres Gliaprotein	III	1	50	Gliazellen, Astrozyten/ Cytosol
Peripherin	III	1	54	Periphere Neurone / Cytosol
Neurofilamente (NF-L)	IV	1	62	Neuronale Axone / Cytosol
Neurofilamente (NF-M)	IV	1	102	Neuronale Axone / Cytosol
Neurofilamente (NF-H)	IV	1	112	Neuronale Axone / Cytosol
Nestin	IV	1	177	Neuroepithelialzellen
Lamin A/C	V	1	74	Kernlamina
Lamin B1	V	1	66	Kernlamina
Lamin B2	V	1	68	Kernlamina
Filensin	VI	1	75	Epithelzelle der Linse
Phakinin	VI	1	46	Epithelzelle der Linse

1.3. Cytokeratine

Keratine (Cytokeratine) sind ein wesentlicher Bestandteil der natürlichen Gewebsstruktur der menschlichen Epidermis und erfüllen dabei wichtige Funktionen in Epithelzellen. Sie werden von Keratinozyten in einer spezifischen Zusammensetzung aus sieben Polypeptiden und einer stark regulierten Reihenfolge, entsprechend des Differenzierungsstatus der Keratinozyten, exprimiert (Moll 2016). Als substanzieller Teil des Zytoskeletts machen Keratine mit 54 Genen die größte und umfangreichste Proteingruppe der Familie der Intermediärfilamente aus. Die 54 Keratin-Gene lassen sich in 28 Typ-I (K9-K10, K12- K28, und K31-K40, einschließlich K33a und K33b) und 26 Typ-II (K1-K8, einschließlich K6a, K6b und K6c und K71-K86) Gene aufteilen (Moll et al. 2008).

Die Keratine wurden entsprechend ihres Molekulargewichts und ihres pH-Wertes kategorisiert. Dabei werden die Keratine des Typ I als saure Keratine und die Keratine des Typ II als basisch-neutrale Keratine kategorisiert (Jacques et al. 2005; Moll et al. 1982a; Moll et al. 1982b).

Im Jahre 2006 wurde die Klassifizierung der Keratine und damit die Konsensnomenklatur von Schweitzer et al. etabliert (Schweizer et al. 2006) und das bis dahin geltende Schema, welches Moll et al. 1982 etabliert hatte (Moll et al. 1982a; Moll et al. 1982b), überarbeitet und erweitert. Entsprechend der neuen Konsensnomenklatur (Tabelle 2) erhielten die Keratin-Gene beispielsweise die Bezeichnungen KRT1 sowie KRT2 und die entsprechenden Keratin-Proteine K1 und K2 (Kurokawa et al. 2011; Schweizer et al. 2006).

Tabelle 2: Klassifikation der funktionalen Gene der menschlichen Keratine nach folgender Quelle: (Schweizer et al. 2006)

Funktionale Ke- ratin Gene	Anzahl (gesamt) 54	Kategorie	Anzahl (pro Gruppe)	Keratinbezeichnung
Typ I (sauer)	28	Menschliche Epithelke- ratine	17	K9, K10, K12 - K20, K23 - K28
		menschliche Haarkera- tine	11	K31, K32, K33a, 33b, K34 – K40
Typ II (neutral-ba- sisch)	26	Menschliche Epithelke- ratine	20	K1 - K5, K6a, K6b, K6c, K7, K8, K71 - K80
		menschliche Haarkera- tine	6	K81 - K86

Die menschlichen Typ-I Keratin-Gene befinden sich alle (ausgenommen K18) auf Chromo-
som 17q21.2. Die menschlichen Typ-II Keratin-Gene sind alle (zuzüglich K18) auf Chromo-
som 12q13.13 lokalisiert (Kurokawa et al. 2011) (Abbildung 3).

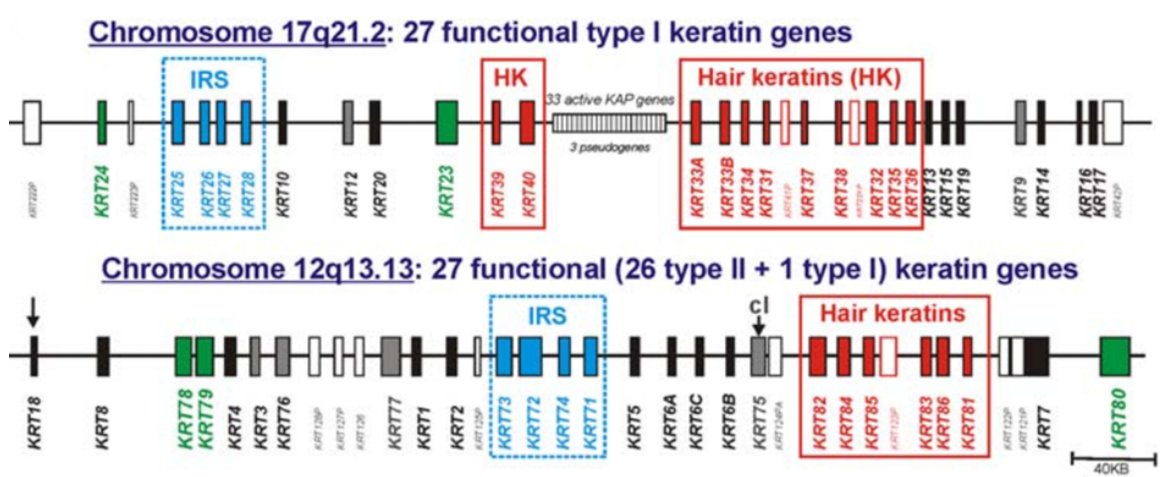


Abbildung 3: Organisation der menschlichen Keratin-Gene im Genom. (Moll et al. 2008)

Sämtliche Keratine (mit einem Molekulargewicht von 40 bis 70 kDa) weisen die gleiche, für Intermediärfilamente typische konservierte dreiteilige Domänenstruktur auf (Gu und Coulombe 2007). Diese besteht aus einer zentralen α -helikalen Stabdomäne, welche aus

310 Aminosäuren gebildet wird. Eine Ausnahme bilden die Lamine (IF-Typ V), diese bestehen aus 352 Aminosäuren. Die α -helikale Stabdomäne wird in vier Teile unterteilt (1A, 1B, 2A, 2B), welche mittels nicht-helikaler Segmente, sogenannte Linker (L1, L1-L2, L2), miteinander verbunden sind und von nicht-helikalen Domänen mit unterschiedlichen Primärstrukturen und Größen flankiert werden (Jacques et al. 2005) (Abbildung 4).

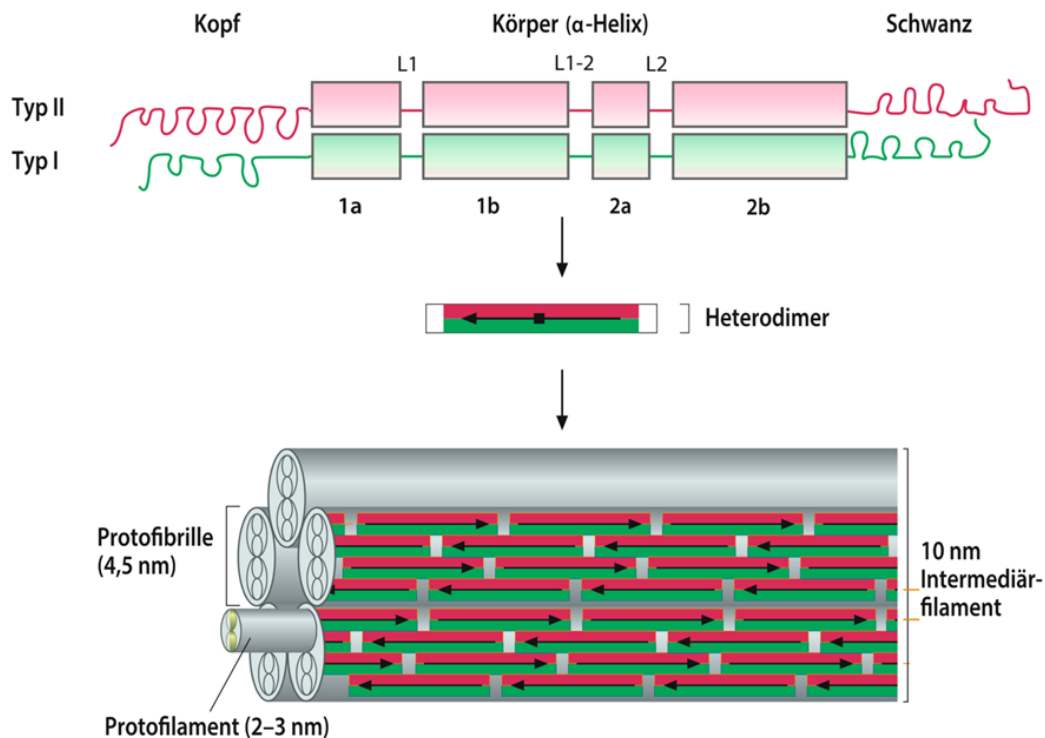


Abbildung 4: Schematische Darstellung der typischen dreiteiligen Domänenstruktur von Typ-I und Typ-II Keratinen. Zentral eine α -helikale Stabdomäne, welche flankiert wird von einer nicht helikalen Schwanz- und Kopfdomäne an den C- und N-termini (1a, 1b, 2a, 2b helikale Abschnitte; L1, L1-2, L2 nicht-helikale Abschnitte, parallele Anordnung zum Heterodimer, anti-parallele Anordnung zum Protofilament). Supramolekulare Assoziation zur Protofibrille und zum Intermediärfilament). Quelle: Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie 2014

Ein Charakteristikum bei der Bildung von Keratinen ist die obligatorische Kombination von einem Typ-I Keratin mit einem Typ-II Keratin (Abbildung 4). Hierbei assoziieren die entsprechenden Stäbchendomänen in einer „coiled-coil“-Konformation, also einer gewundenen Helix und formieren sich zu Heterodimeren und Tetrameren (Abbildung 2), welche die Basiseinheiten für die Entstehung von Intermediärfilamenten darstellen (Moll et al. 2008; Yu 2002).

Keratine weisen ein sehr spezifisches Regulations- und Expressionsmuster auf, welches mit dem Zelltyp und dem Differenzierungsstadium verknüpft ist (Coulombe und Omary 2002;

Moll et al. 2008; Rothnagel et al. 1992). Dabei werden die Keratinpaare an ihren spezifischen Expressionsregionen durchgehend gemeinsam exprimiert. Beispielsweise werden bestimmte Keratinpaare (K18 + K19 (Typ 1) und K8 (Typ 2)) nur in einfachen Epithelien exprimiert. Während andere (K14 (Typ 1) und K4 (Typ 2)) beispielsweise nur in geschichteten Epithelien vorkommen (Chu und Weiss 2002).

Im Folgenden (Tabelle 3), wurden die allgemeinen Grundsätze der Keratinexpression mit einer spezifischen Zuordnung bezüglich der einfachen und geschichteten Epithelien beschrieben.

Tabelle 3: Keratinexpression in einfachen und geschichteten Epithelien, Die allgemeinen Grundsätze der Keratinexpression mit einer spezifischen Zuordnung bezüglich der einfachen und geschichteten Epithelien. Entnommen und modifiziert aus: Chu und Weiss 2002

Epitheltyp	Keratine Typ 2	Typ 1	Verteilung
Einfaches Epithel	8	18	In sekretorischen und parenchymatösen Zellen
	7	19	Gallen- und Bauchspeicheldrüßengang, Nierensammelkanäle, gastrointestinale Epithelien
	/	20	Gastrointestinales Epithelgewebe, Merkelzellen der Haut und Geschmacksknospen der Mundschleimhaut
Mehrschichtiges Plattenepithel	5	14	Basalzellen von Platten- und Drüsenepithel, Myoepithel, Mesothel
	/	15	Plattenepithel
	8	18, 19	Nicht-verhornendes, mehrschichtiges Plattenepithel
Suprabasale Zellen	1	10, 11	Epidermis (gesamte suprabasale Schicht)
	/	9	Epidermis der Hand- und Fußinnenflächen
	2e		Epidermis (obere Schichten)
	2q		Zahnfleisch (Gingiva), harter Gaumen
	3	12	Hornhautepithel
	4	13	Nicht-keratinisierendes mehrschichtiges Plattenepithel der inneren Organe
	6	16, 17	Hyperproliferative Plattenepithelien

Der Umstand der stark regulierten Expression von Keratinen, welche gebunden sind an die Differenzierungsstadien der Keratinozyten, ermöglicht es diese als Marker für spezielle diagnostische Untersuchungen heranzuziehen (Moll et al. 2008).

1.4. Cytokeratin 10

1.4.1. Allgemeines

Cytokeratin 10 (CK10), alternativ auch Keratin 10 (K10) genannt, zählt zur Kategorie der sauren Keratine vom Typ-I (Schweizer et al. 2006). Es hat ein Molekulargewicht von 56.5 kDa, einen pH-Wert von 5,3 (Moll et al. 1982a) und wird vom KRT10-Gen kodiert, welches auf dem Chromosom 17q21.2 lokalisiert ist (Schweizer et al. 2006).

CK10 formt als saures Keratin des Typ-I, mit dem basischen Typ-II Keratin CK1 ein heterodimer und wird postmitotisch in der suprabasalen Schicht der Epidermis von Keratinozyten exprimiert (Koch und Roop 2004; Korge et al. 1992; Reichelt et al. 2004).

Die Differenzierung von Keratinozyten von der Basalzellschicht bis hin zur Hornschicht, geht postmitotisch mit der Veränderung der Keratin Expression einher, so werden die Basalzellkeratine CK5, CK14 und CK15 herunterreguliert und die Expression der suprabasalen, epidermalen Keratine CK10 und CK1 induziert (Kurokawa et al. 2011; Moll et al. 2008). Mit einem Anteil von ca. 60 – 85 % des Gesamtproteinanteils der Epidermis, sind CK10 und CK1 die am häufigsten vorkommenden Proteine der Epidermis (Fuchs et al. 1992; Herrmann et al. 2003). Sie bilden, die für die suprabasalen Zellen besonders charakteristischen, dichten Bündel des epidermalen Cytoskeletts (Moll et al. 2008). Durch die daraus resultierenden Eigenschaften auf die mechanische Integrität der suprabasalen Epidermis, nämlich die Fähigkeit mechanischen Belastungen widerstehen zu können, werden CK10 und CK1 als die wichtigsten Strukturproteine der Epidermis bezeichnet (Moll et al. 2008; Reichelt et al. 2004).

Die Keratinexpression wird jedoch nicht nur von dem Differenzierungsprozess der Keratinozyten beeinflusst, auch Faktoren wie Gewebsverletzungen und Metastasierungsprozesse können diese beeinflussen. Im Zuge hyperproliferativer Stimuli, wie zum Beispiel während des Wundheilungsprozesses, kommt es zu einer starken Reduktion der Expression von CK10/CK1 und zur Induktion der Expression der Keratine CK6, CK16 und CK17 (Magin et al. 2007; Müller et al. 2006; Santos et al. 2002).

Bei einigen dermatologischen Erkrankungen liegen Punktmutationen im KRT10-Gen zugrunde, welche zu einer wesentlichen Reduktion oder einem gänzlichen Fehlen der CK10 Expression führen. Die Auswirkungen auf die epidermale Integrität, welche durch die

Mutationen im KRT10-Gen entstehen, zeigen sich klinisch vor allem durch eine starke Blasenbildung, dem Abschilfern der Haut und einer ausgeprägten Keratinisierungsstörung (Moll et al. 2008; Omary et al. 2004). Zum Spektrum dieser Erkrankungen gehören die epidermolytische Hyperkeratose (Synonym: Bullöse kongenitale ichthyosiforme Erythrodermie Brocq, Epidermolytische Ichthyose) (Cheng et al. 1992; Chipev et al. 1994; Covaciu et al. 2010; Müller et al. 2006; Oji 2017; Rothnagel et al. 1992; Terheyden et al. 2009) und die kongenitale retikuläre ichthyosiforme Erythrodermie (Englisch: „Ichthyosis with confetti“) (Choate et al. 2010; Lim et al. 2016; Oji 2017; Renz et al. 2019; Spoerri et al. 2015). Zu den weiteren Erkrankungen, bei denen eine CK10 Reduktion festgestellt wurde, gehören die Psoriasis (Körver et al. 2006) und die Tinea corporis (Jensen et al. 2007). Eine abweichende CK10 Expression wurde beim oralen Lichen Planus festgestellt (Jacques et al. 2009).

1.4.2. Cytokeratin 10 in Normalgeweben

Die Daten des Human Protein Atlas (HPA) des Genotype-Tissue Expression Projekts (GTEx) (Lonsdale et al. 2013) und des FANTOM5-Datensatzes (Lizio et al. 2018; Lizio et al. 2016) zeigen, dass sich die Expression von CK10 weitgehend auf die Haut beschränkt und das andere Organe, welche von nicht-keratinisierendem Plattenepithel bedeckt sind, in der Regel CK10-RNA-negativ sind.

Entsprechend der vom Human Protein Atlas bereitgestellten Informationen kann in absteigender Reihenfolge und gemessen an dem RNA-Expressionsniveau von CK10 in Normalgeweben, eine Auflistung dieser vorgenommen werden. Die Haut ist demnach das Hauptexpressionsorgan von CK10 (15436,3 nTPM), danach folgen mit großem Abstand Normalgeweben, die aus der Vagina, Zervix oder Brust stammen (Abbildung 5).

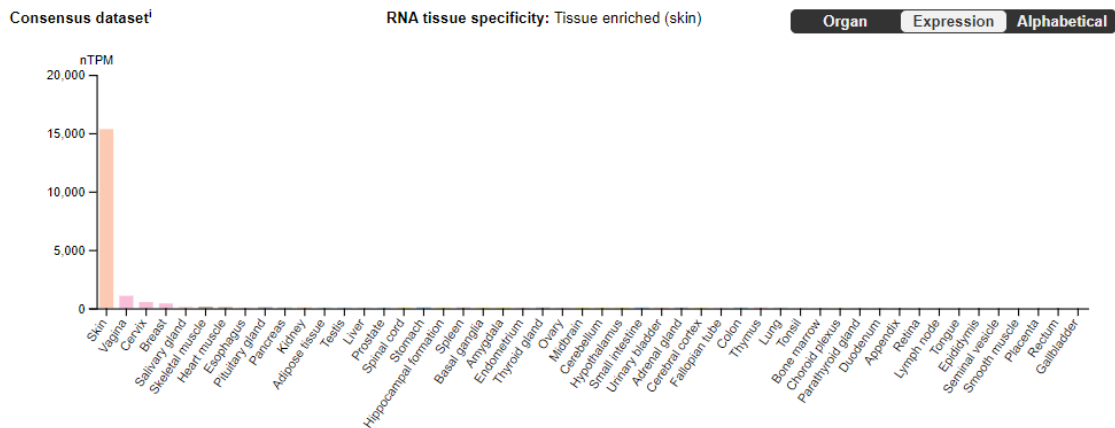


Abbildung 5: RNA-Expression in Normalgeweben. Quelle: (Tissue expression of KRT10 - Summary - The Human Protein Atlas 2024)

1.4.3. Cytokeratin 10 in Tumoren

Die meisten Studien, welche CK10 im Zusammenhang mit Tumoren untersucht haben, befassten sich hauptsächlich mit Plattenepithelkarzinomen. In Plattenepithelkarzinomen der Haut konnte CK10 in allen Schichten der suprabasalen Epidermis, im Stratum corneum (Hornschicht), im Stratum granulosum (Körnerschicht) und im Stratum spinosum (Stachelzellschicht), gleichermaßen stark nachgewiesen werden. Ein Nachweis in Basalzellkarzinomen gelang jedoch nicht, so wie es für die Expressionsweise von CK10 in Normalgeweben typisch ist (Moll et al. 1982a; Moll et al. 1982b; Zhou et al. 2019).

In gut differenzierten und keratinisierenden Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, sowie des Larynx und des Pharynx, wurde eine gesteigerte CK10 Expression beobachtet. Aus diesem Grund wurde CK10 als geeigneter Marker für die Diagnostik von Karzinomen dieser Art empfohlen (Park et al. 2010).

In anderen Untersuchungen, zur Rolle von Cytokeratinen bei oralen Plattenepithelkarzinomen, ist aufgefallen, dass mit der Progression des malignen Verlaufs, also einer immer schlechteren Differenzierung der Tumoren, das Expressionslevel von CK10 kontinuierlich abnahm (Ali et al. 2018). Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Zunge konnte zudem auch eine Korrelation zwischen dem invasiveren Wachstum und der Metastasierungseigenschaft des Tumors und der Abwesenheit von CK10 festgestellt werden (Silveira et al. 2007).

Bei Plattenepithelkarzinomen der Lippe verhält es sich ähnlich, wie bei den anderen Plattenepithelkarzinomen. Hier ist ebenfalls eine aberrante CK10 Expression beobachtet worden. Eine Präkanzerose des Plattenepithels der Lippe ist die aktinische Cheilitis. Dabei soll CK10 als prädiktiver Biomarker zur Erkennung von malignen Transformationen der Epithelzellen dienen, da mit der Zunahme dieser strukturellen Veränderungen, eine gleichzeitige Reduktion der CK10 Expression einhergeht (Garcia et al. 2016).

Während CK10 in normaler Bronchialschleimhaut nicht nachgewiesen werden konnte, ließ sich CK10 in den Frühstadien des Plattenepithelkarzinoms der Bronchien nachweisen. Außerdem konnte eine Assoziation von CK10 und der Verhornung von Plattenepithel in den Bronchien festgestellt werden (Fisseler-Eckhoff et al. 1996; Pendleton et al. 1996).

In Plattenepithelkarzinomen der Lunge und des Ösophagus konnte CK10 ebenfalls nachgewiesen werden. Zusätzlich war es möglich, CK10 in geringem Maße auch in Haarfolikeltumoren und Schweißdrüsentumoren nachzuweisen. Auch hier stand die Expression von CK10 in Karzinomen im Zusammenhang mit einem hohen Differenzierungsgrad (Lam et al. 1995; Zhou et al. 2019).

Weitaus seltener wurde CK10 in nicht-plattenepithelialen Tumoren untersucht und gefunden. Zu den untersuchten Neoplasien, in denen eine CK10 Expression nachgewiesen werden konnte, gehören, hepatozelluläre Karzinome (Yang et al. 2008), Mammakarzinome (Kim und Villadsen 2020) und Prostatakarzinome (Sakr et al. 2014). In den CK10 positiven Fällen korrelierte die Expression von CK10 mit einem schlechteren Krankheitsverlauf, einer höheren Invasivität der Tumoren und gilt aus diesem Grund als Marker für eine ungünstige Prognose (Sakr et al. 2014; Yang et al. 2008; Kim und Villadsen 2020).

1.5. Zielsetzung dieser Studie

Ziel der hier vorliegenden Studie ist es, die Datenlage bezüglich der CK-10-Immunhistochemie zu erweitern. Es gibt bisher nur wenige Studien, die die Expression von CK-10 in nicht plattenepithelialen Tumoren untersucht haben. Ein anderes Problem ist, dass die immunhistochemischen Untersuchungen mit verschiedenen Antikörpern unter unterschiedlichen Bedingungen stattgefunden haben, was die Einordnung und Vergleichbarkeit der Färberegebnisse zwischen den Studien stark einschränkt.

Im Rahmen dieser Arbeit wird eine nie dagewesene Anzahl an Tumoren sowie Tumorentitäten unter standardisierten Bedingungen hinsichtlich ihrer CK-10 Expression untersucht. Zudem soll in ausgewählten Entitäten nach möglichen Assoziationen zwischen der Expression von CK-10 und klinisch-histopathologischen Parametern gesucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Tissue Microarray Technik

Die Tissue Microarray-(TMA) Methode ist ein Hochdurchsatzverfahren zur Analyse von hundert von Geweben auf einem einzigen Objektträger. Das Verfahren wurde 1998 erstmals von Kononen et al. beschrieben (Kononen et al. 1998).

Die Grundlage für das TMA-Verfahren sind TMA-Blöcke, welche auf der gleichen Fläche, wie sie normalerweise für konventionelle histologische Schnittpräparate benötigt wird, bis zu 600 zylindrische Gewebefragmente enthält, welche an genau definierter Position senkrecht im Paraffinblock stehen. Mit einem Mikrotom können von TMA-Blöcken TMA-Schnitte hergestellt werden, wobei jeder dieser Schnitte einen 0,6 Millimeter messendes Gewebefragment pro Zylinder im TMA-Block, das heißt pro Patienten oder pro Tumor, enthält.

Das Prinzip des TMA-Verfahrens ist in Abbildung 6 dargestellt.

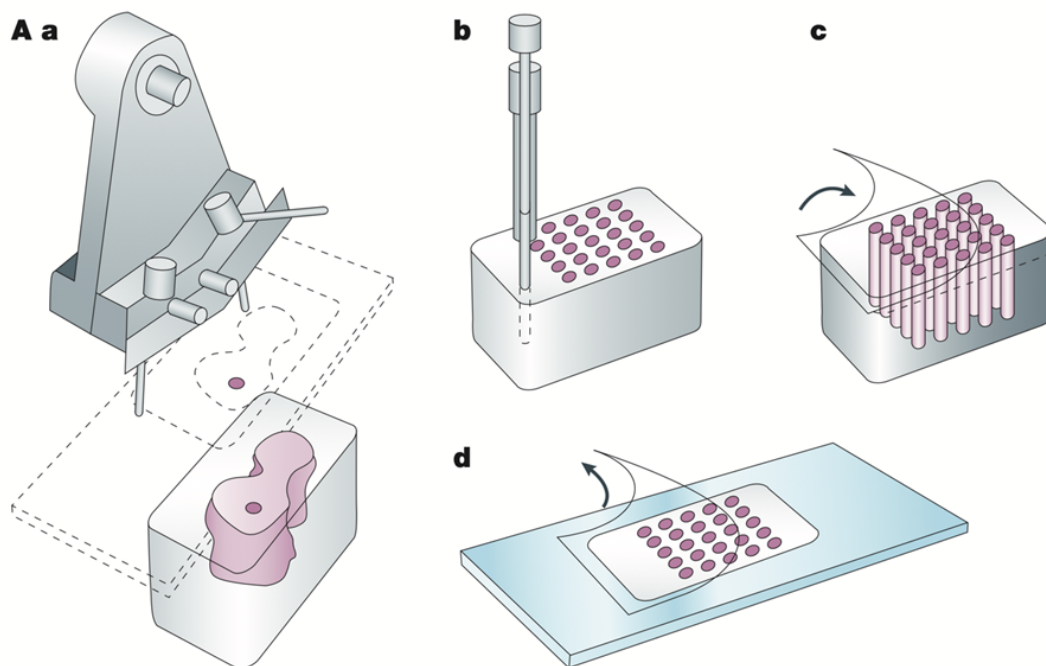


Abbildung 6: Prinzip der TMAs. A: Von einem Empfängerblock wird eine Probe entnommen. b: Probe(-n) wird in einen Spenderblock implantiert. Dieser Spenderblock wird der sogenannte TMA-Block. c: Vom TMA-Block werden mithilfe eines Mikrotoms TMA-Schnitte angefertigt. d: TMA-Schnitte werden dann gefärbt und eingedeckt. Quelle der Abbildung: Sauter et al. 2003

Der größte Vorteil der TMA-Methode ist die massive Beschleunigung von Studien an Gewebeschnitten. Da aus einem einzigen Schnitt 600 verschiedene Gewebeproben analysiert werden

können, wird sowohl die Arbeitszeit für die Herstellung der benötigten Schnitte um einen Faktor von 600 beschleunigt als auch die Reagenzienkosten um einen Faktor 600 reduziert, da nur einer anstelle von 600 Schnitten gefärbt werden muss.

Der wesentlichste Nachteil der TMA-Methode ist der sehr hohe Arbeitsaufwand für die Herstellung eines TMA-Blockes. Die TMA-Herstellung beginnt mit der Identifikation potentiell geeigneter Fälle, wofür ein gut organisiertes Gewearchiv von Vorteil ist. Am UKE beginnt die TMA-Herstellung mit der Suche nach einem bestimmten Gewebetyp bzw. Tumortyp durch eine Volltextsuche am UKE-Pathologie-Informationssystem. Die identifizierten Kandidaten für ein Projekt werden danach zunächst manuell anhand ihrer ursprünglichen Diagnosetexte evaluiert. Dabei sollen auch mit hoher Wahrscheinlichkeit ungeeignete Tumoren identifiziert und bereits ausgeschieden werden.

Ungeeignet sind Tumoren, die entweder sehr klein sind wie zum Beispiel Tumoren, welche aus Biopsien (Zangenbiopsie, Stanzbiopsie) gewonnen wurden oder jene, die bereits in der mikroskopischen Beschreibung als besonders klein beschrieben wurden oder aber auch Tumoren, die durch ausgedehnte Nekrosen oder regressive Veränderungen charakterisiert sind. Ebenso werden Tumoren eliminiert, bei denen aus dem Diagnosetext hervorgeht, dass Unsicherheiten bei der Tumorklassifikation bestanden haben. Von den potentiell geeigneten Fällen werden dann alle Schnitte aus dem Archiv geholt und durch einen Pathologen beurteilt. Findet sich eine ausreichend große Tumormenge in einem Schnitt (Minimalanforderung: 1 cm²) wird das Tumorareal auf dem HE-gefärbten Schnitt mit einem Filzstift umfahren und so markiert, dass darauf geachtet wird, dass die markierten Gewebeareale aus einer zusammenhängenden Zone bestehen und nicht aus vielen kleinen voneinander entfernten Bereichen, da letztere schwieriger am korrespondierenden Block zu identifizieren sind. Von allen potentiell geeigneten Schnitten werden danach die korrespondierenden Paraffinblöcke herausgesucht und auf ihre Eignung für die TMA-Herstellung getestet.

Das wichtigste Kriterium für die Blockeignung ist die Dicke/Tiefe des im Block befindlichen Gewebes. Die Blockdicke definiert die aus dem Gewebe entnehmbare Länge des Gewebezylinders, welche darüber entscheidet, wie viele Schnitte von einer aus dem Tumor entnommenen Stanze angefertigt werden können. Gefordert wird am UKE eine Mindestdicke von 2 mm.

Sobald alle für ein Projekt zur Verfügung stehenden Tumorblöcke identifiziert werden, kann die Struktur des zu bauenden TMA-Blockes definiert werden. Die am UKE verwendete TMA-

Block Grundstruktur ist immer gleich. Ein UKE-TMA besteht aus 6 Sektoren. Diese sind unterschiedlich groß und asymmetrisch angeordnet, um eine Orientierung auch dann zu ermöglichen, wenn ein entnommener Schnitt aus Versehen „kopfüber“ auf einen Objektträger gebracht wird. Die 6 Sektoren werden mit Großbuchstaben von A-F bezeichnet. In jedem Sektor werden die Zeilen mit Zahlen von 1-9 und die Spalten mit Kleinbuchstaben von a bis maximal r bezeichnet. Die Struktur eines UKE TMA-Blockes ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

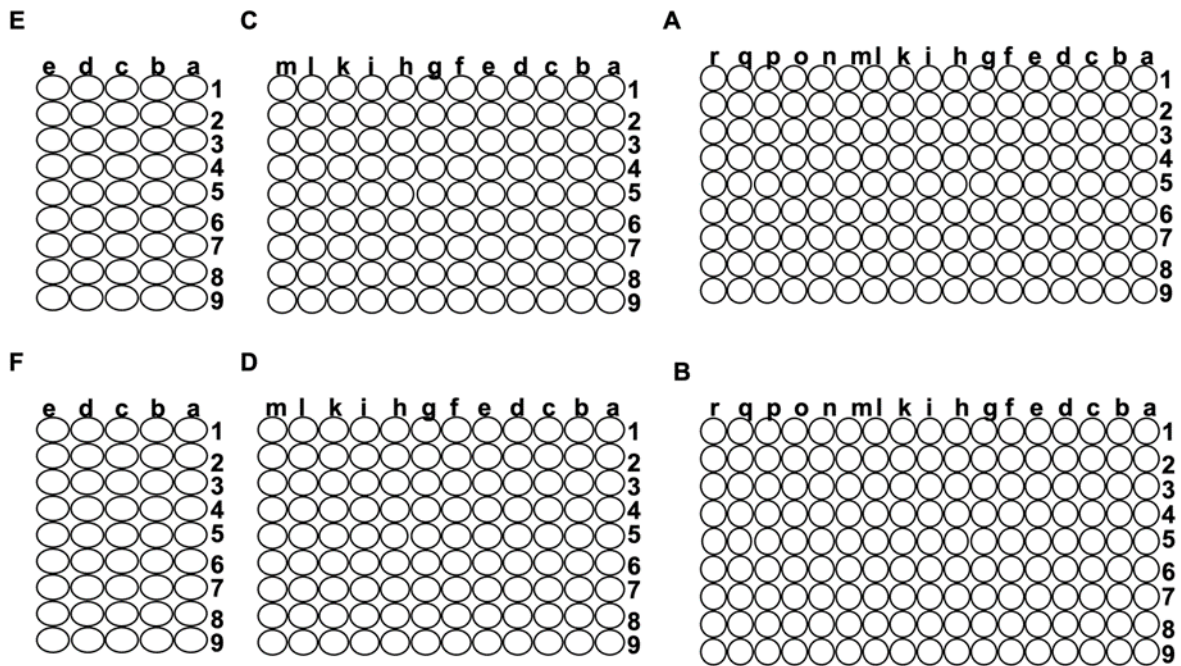


Abbildung 7: Standardaufbau eines UKE-TMA

Die für einen neu zu erstellenden TMA ausgesuchten Tumor-/Schnittpräparate werden dann in der Reihenfolge ihrer Einbringung in den geplanten TMA in der Umgebung des Tissue-Microarrays zusammen sortiert.

Für die Herstellung der TMAs wird ein von Mitarbeitern des UKE hergestellter, semiautomatischer TMA (Abbildung 8) verwendet, der die folgenden Hauptkomponenten aufweist:

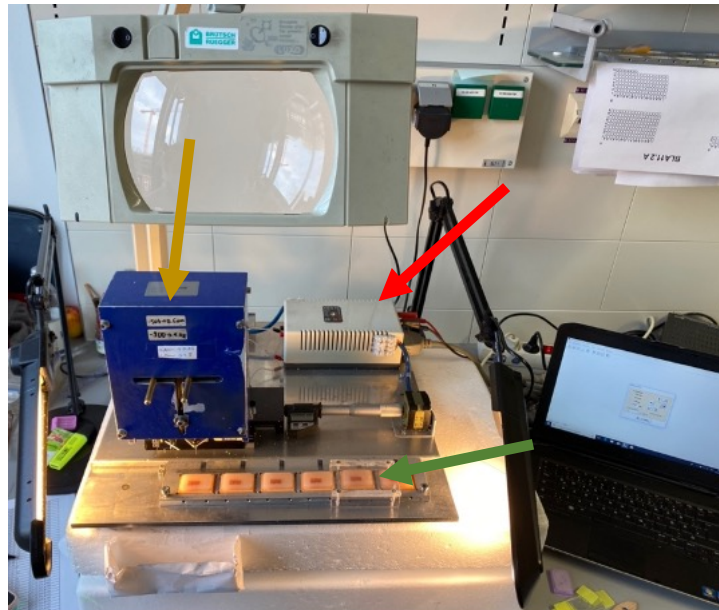


Abbildung 8: Übersichtsaufnahme vom Arrayergerät. Gelber Pfeil: Arrayergerät mit Umschaltvorrichtung. Roter Pfeil: Elektrischer Schrittmotor. Grüner Pfeil: Mehrfachblockhalter

- A. Eine Umschaltvorrichtung, welche an einer definierten Position des TMA-Blockes wahlweise einen elektrischen Bohrer oder eine Hohnadel zur Anwendung bringt. Dabei entspricht der äußere Durchmesser des Bohrers dem inneren Durchmesser des Hohlzylinders. Je nach geplante Stanzendurchmesser können Bohrer-/Nadelkombinationen von 0,6 mm – 4 mm verwendet werden.
- B. Ein Mehrfachblockhalter, der die simultane Herstellung von bis zu 6 weitgehend identischen Replikaten eines TMA-Blockes erlaubt.
- C. Ein Podest, mit dem die Empfängerblöcke während der Entnahme von Zylindern aus Spenderblöcken abgedeckt und geschützt werden können.
- D. Ein elektrischer Schrittmotor welcher die Stanz-/Bohrvorrichtung automatisch von einer Position zur nächsten transportiert.

Der TMA-Herstellungsprozess beginnt mit der Befüllung des Mehrfachblockhalters mit 6 leeren Empfänger-TMA-Blöcken, welche aus Paraffin gegossen werden (Abbildung 9).

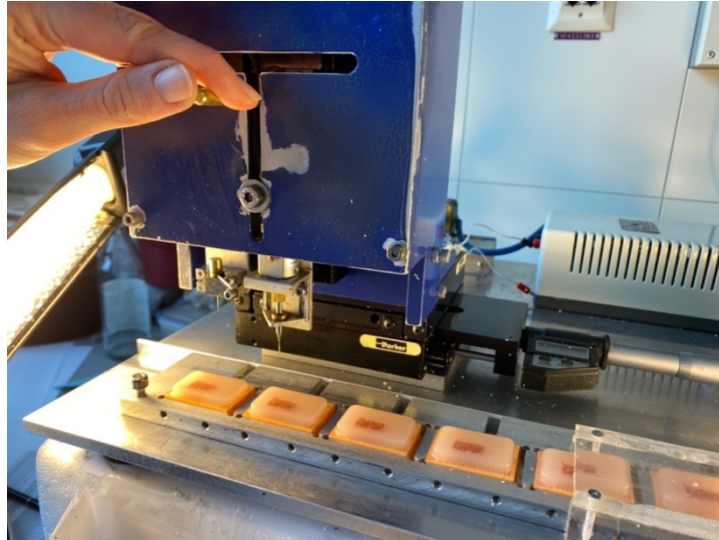


Abbildung 9: Mehrfachblockhalter mit 6 Empfänger-TMA-Blöcken.

An Position A1a des ersten Replikatblockes wird dann mit der Bohrvorrichtung ein Loch hergestellt. Hierfür wird meistens ein 0,6 mm dicker Bohrer verwendet (Abbildung 10). Danach wird der angebohrte Empfängerblock vom Podest bedeckt und der erste Spenderblock (für Position A1a) darauf platziert. Die Umschaltvorrichtung wird betätigt, sodass das Gerät von Bohren auf Stanzen umgeschaltet wird. Danach wird mit der Hohnadel ein 0,6 mm messender Gewebezylinder aus dem Spenderblock entnommen (Abbildung 11).

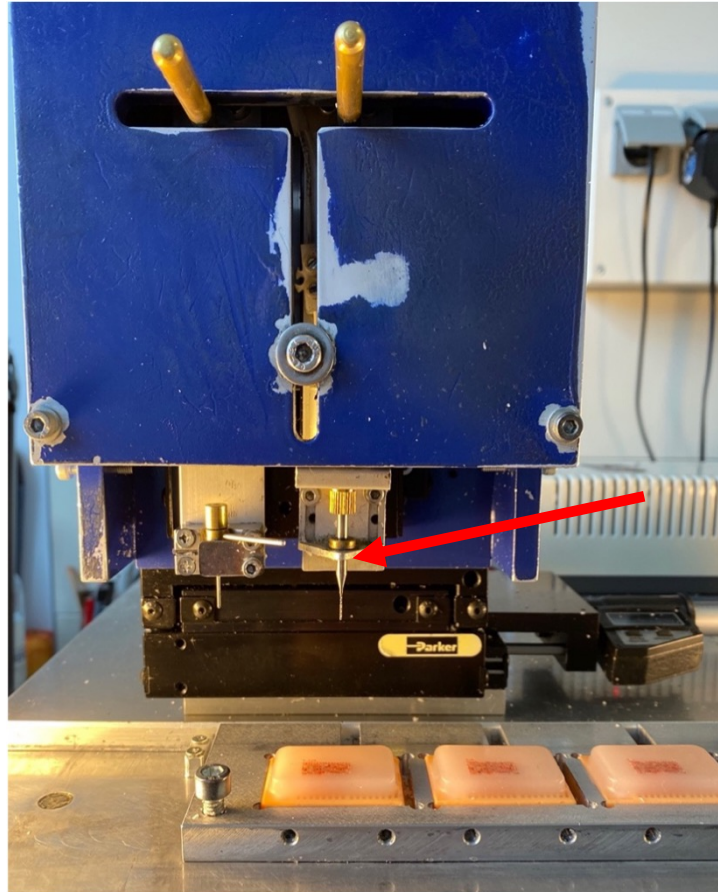


Abbildung 10: Bohrer, mit dem ein Loch in den Empfängerblock gebohrt wird.

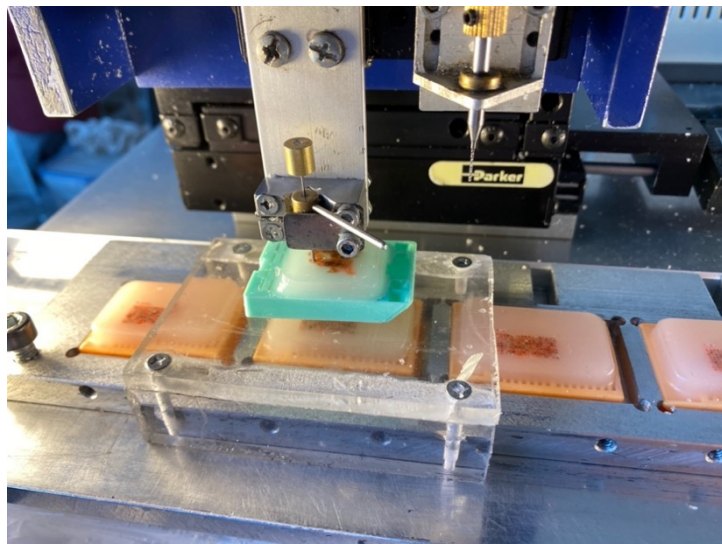


Abbildung 11: Entnahme von Gewebe aus dem Spenderblock. Dieser befindet sich auf einem Minipodest, der die Empfängerblöcke abdeckt.

Nach Wegnahme des Podestes wird der Zylinder in das unmittelbar darunter liegende vorgefertigte Loch deponiert (Abbildung 12). Zum Ausstoßen des Zylinders wird ein Stahldraht verwendet. Es wird dabei darauf geachtet, dass das obere Ende des Zylinders so genau wie

möglich auf dem Niveau der Empfängerblock Oberfläche zu liegen kommt. Danach wird der Replikatblockhalter auf Position 2 gesetzt und der Vorgang an Position A1a des zweiten Replikates wiederholt. Bei der Entnahme der zweiten tumorhaltigen Stanze aus dem Spendertumorblock wird dabei darauf geachtet, dass die Stanze aus der unmittelbaren Nähe der Entnahmestelle der ersten Stanze entnommen wird.

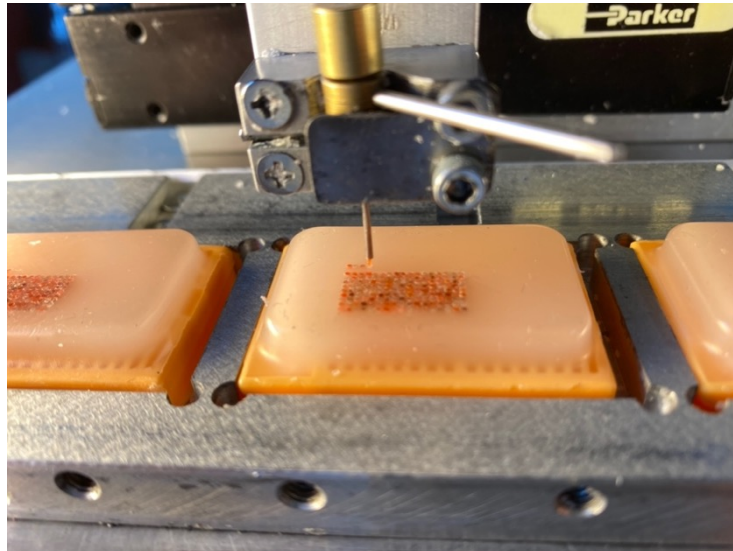


Abbildung 12: Gewebeprobe wird im Empfängerblock deponiert.

Der Grund hierfür liegt darin, dass wegen der möglichen intratumorösen Heterogenität des zu stanzenden Tumors darauf geachtet werden muss, dass alle Stenzen für eine Serie von Replikaten aus einem möglichst kleinem Tumolvolumen entnommen werden, um das Risiko von heterogenitätsbedingten Unterschieden zwischen den Replikaten zu minimieren. Analog werden danach die Replikate 3-6 an Position A1a mit Stenzen des ersten Tumors des neu zu bauenden TMA-Blockes gefüllt.

Im Anschluss wird der Schrittmotor betätigt und die Stanz-/Bohrvorrichtung an Position A1b verlegt. An dieser Position werden dann Stenzen aus dem zweiten Tumor des TMAs in die einzelnen Replikatblöcke eingebaut. Falls mehr als 6 Replikate eines neu zu erstellenden TMA-Blockes gebaut werden sollen, ist es möglich, zwei oder mehr Mehrfachblockhalter für ein Projekt einzusetzen und so gleichzeitig 12, 18 oder 24 Replikate eines TMAs herzustellen. Die Prozedur wird nun wiederholt, bis entweder alle Tumoren eines Projektes in das TMA-Format eingebracht wurden oder aber bis der TMA-Block an Position F9e vollständig aufgefüllt wurde.

Nach Abschluss der TMA-Herstellung werden die für die Zuordnung von Schnitten und Blöcken benötigten Biopsie Nummern nicht mehr gebraucht. Dies ist für die Datensicherheit ein

wichtiger Umstand, denn über die Biopsie Nummern könnte ein Hacker, wenn es ihm denn gelänge in das Pathologieinformationssystem der Pathologie einzudringen, Einsicht in die Klarnamen der beteiligten Patienten gewinnen. Da sämtliche histopathologischen, klinischen oder anderen Informationen, welche mit einem Gewebeblock assoziiert sind, nun auch durch die entsprechende Koordinate auf dem TMA eindeutig zuzuordnen sind, können die Biopsie Nummern entweder dauerhaft gelöscht (Anonymisierung) oder aber ausgeblendet werden (Pseudonymisierung). Tabelle 4 zeigt ein Beispiel einer zu einem TMA gehörigen Datei mit klinisch-pathologischen Informationen.

Tabelle 4: Ein beispielhafter Auszug aus der Datenbank des Blasenarray-TMA BLA 11.2. Alle patientenbezogenen Daten wurden bereits anonymisiert

Array Name	Koordinate	Tumorentität	Geschlecht	Alter zum Zeitpunkt der Diagnose	Tumorstatus	Morphologie	Grading
...
BLA 11.2	B3a	Urothelkarzinom	männlich	83	pTa G2 high-grade	nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom	G2
BLA 11.2	B3b	Urothelkarzinom	männlich	89	pTa G2 high-grade	nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom	G2
BLA 11.2	B3c	Urothelkarzinom	männlich	56	pTa G2 high-grade	nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom	G2
BLA 11.2	B3d	Urothelkarzinom	weiblich	79	pTa G2 high-grade	nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom	G2
BLA 11.2	B3e	Urothelkarzinom	männlich	64	pTa G2 high-grade	nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom	G2
BLA 11.2	B3f	Urothelkarzinom	weiblich	67	pTa G2 high-grade	nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom	G2
...

2.2. TMA für das CK10-Projekt

Für das Cytokeratin-10-Projekt wurden ein Normalgewebe-TMA und ein Multitumorarray kollektiv untersucht. Der Normalgewebe-TMA beinhaltete jeweils 8 Gewebeproben von 8 verschiedenen Patienten von 76 verschiedenen Normalgewebeskategorien (Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammensetzung des TMAs für Normalgewebe

1	Endothel der Aorta
2	Media der Aorta
3	Herzgewebe
4	Quergestreiftes Muskelgewebe
5	Zungenmuskulatur
6	Uterusgewebe (Myometrium)
7	Appendixgewebe (Muskulatur)
8	Ösophagusgewebe (Muskulatur)
9	Magengewebe (Muskulatur)
10	Ileumgewebe (Muskulatur)
11	Colon descendens-Gewebe (Muskulatur)
12	Nierenbeckengewebe (Muskulatur)
13	Harnblasengewebe (Muskulatur)
14	Corpus spongiosum (Penis)
15	Ovargewebe (Stroma)
16	Fettgewebe
17	Hautgewebe
18	Haarfollikel und Talgdrüsen
19	Lippengewebe
20	Mundhöhlengewebe
21	Oberflächenepithel der Tonsille.
22	Hautgewebe (Analkanal)
23	Übergangsschleimhaut (Analkanal)
24	Ektozervix
25	Plattenepithelgewebe (Ösophagus)
26	Urothel (Nierenbecken)
27	Urothel (Harnblase)
28	reife Plazenta, Amnion
29	Lymphknotengewebe
30	Milzgewebe
31	Thymusgewebe
32	Tonsillengewebe
33	Magengewebe (Antrum)
34	Magengewebe (Corpus)
35	Duodenumschleimhaut
36	Ileumschleimhaut
37	Appendixschleimhaut
38	Colon-Descendenschleimhaut

39	Rektumschleimhaut
40	Gallenblasenepithel
41	Lebergewebe
42	Pankreasgewebe
43	Parotisgewebe
44	Gewebe von der Submandiularisdrüse
45	Gewebe von der Sublingualisdrüse
46	Knochenmarksgewebe
47	Gewebe von den Duodenaldrüsen
48	Nierenrinde
49	Nierenmark
50	Prostatagewebe
51	Gewebe von der Bläschendrüse
52	Nebenhodengewebe
53	Hodengewebe
54	Schleimhaut (Bronchus)
55	Drüsen (Bronchus)
56	Nasennebenhöhlengewebe
57	Lungengewebe
58	Brustgewebe
59	Endozervix
60	Endometriumgewebe im Proliferationszustand
61	Endometriumgewebe im Sekretionszustand
62	Schleimhautgewebe (Eileiter)
63	Frühe Plazenta (Dezidua)
64	Corpus luteum (Ovar)
65	Follikuläre Zyste (Ovar)
66	Frühe Plazenta
67	Reife Plazenta
68	Nebenniere
69	Nebenschilddrüse
70	Schilddrüse
71	Kleinhirnrindengewebe aus dem Stratum moleculare
72	Kleinhirngewebe aus der Substantia nigra
73	Gehirngewebe (graue Substanz)
74	Gehirngewebe (weiße Substanz)
75	Hypophysenhinterlappen/Infundibulum-Gewebe
76	Hypophysenvorderlappengewebe

Der Multitumor-TMA beinhaltete insgesamt 11,021 Tumoren von 131 verschiedenen Tumorkategorien und Unterkategorien. Detaillierte histopathologische Daten zum Grad, pT-Stadium und dem Lymphknotenstatus waren von Unterkollektiven von 1195 Urothelkarzinomen und 176 Plattenepithelkarzinomen der Cervix uteri sowie von einer Sammlung von 906 Plattenepithelkarzinomen von 11 verschiedenen Ursprungsorganen vorhanden, wobei für die letztere Gruppe auch der HPV-Status zur Verfügung stand. Klinische Verlaufsdaten waren von 157 Patientinnen mit Plattenepithelkarzinomen der Cervix uteri vorhanden. Hier war die mittlere Nachbeobachtungszeit 46 Monate (Bereich 0-181 Monate). Als klinische Endpunkte standen das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben zur Verfügung. Alle Gewebeproben stammten aus den Archiven der Institute für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, dem Institut für Pathologie am Klinikum Osnabrück und des Instituts für Pathologie des akademischen Lehrkrankenhauses Fürth. Alle Gewebe waren in 4%-gepuffertem Formalin fixiert und dann in Paraffin eingebettet worden. Die Verwendung von archiviertem Restmaterial für diagnostische Zwecke für die Herstellung von TMAs und deren Analyse für wissenschaftliche Zwecke wurde in Übereinstimmung mit dem Hamburger Krankenhausgesetz (§12) durchgeführt und von der lokalen Ethikkommission, Ethikkommission Hamburg (WF-049/09) bewilligt worden. Alle Arbeiten wurden durchgeführt unter Beachtung der Anforderungen der Helsinki Deklaration. Die Zusammensetzung des Tumor TMAs ist in Tabelle 10 dargestellt.

2.3. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine vom Prinzip her einfache Methode, die aber in der Realität mit substanziellen Problemen behaftet ist. Die Immunhistochemie ist das wichtigste molekulardiagnostische Verfahren in der Pathologie welches allein am Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf täglich mindestens 800-mal zur Anwendung kommt. Das Verfahren ermöglicht die Visualisierung von spezifischen, diagnostisch relevanten oder wissenschaftlich interessanten Proteinen auf Paraffin-Schnitten. Hierfür werden spezifische Antikörper verwendet, welche Epitope an den interessierenden Proteinen erkennen. Diese binden sich, nachdem sie auf Schnitte aufgebracht werden, mit den entsprechenden Proteinen (falls diese im Präparat vorhanden sind).

Da die Antikörper selbst farblos sind, benötigt es für die Visualisierung der Bindung der Antikörper an ihre Zielproteine einen zweiten Schritt. Hierbei wird die Tatsache ausgenutzt, dass alle diagnostischen Antikörper durch Beimpfung eines Labortiers entwickelt wurden und somit Immunglobulinen der entsprechenden Tierspezies entsprechen. Die meisten Antikörper stammen aus Mäusen, Kaninchen, Hamster oder Ratten. Sogenannte Sekundärantikörper, welche aus einer anderen Spezies stammen als der Primärantikörper und sich gegen den Tier-spezifischen F_c -Teil der Primärantikörper richten, können mit einem Detektionssystem versehen werden und solche Detektionssysteme sind für alle Spezies kommerziell erhältlich.

Die Prinzipien, die in Kombination mit Sekundärantikörpern verwendet werden, um Signale zu verstärken, sind in Tabelle 6 dargestellt. Die mit einem Detektionssystem kombinierten Sekundärantikörper werden auf die bereits mit dem Primärantikörper beschichteten Schnitte gegeben, sodass eine erfolgreiche Antigen-Antikörperbindung visualisiert werden kann.

Tabelle 6: Verschiedene Visualisierungssysteme im Überblick. Quelle der Information: Hantschke und Palmedo 2015

Konventionelle indirekte Methode	Ein Sekundärantikörper, der gegen den F_c -Teil von einem Primärantikörper aus einer anderen Spezies gerichtet ist, ist mit Enzymen konjugiert, welche die Reaktion eines farblichen Substrats katalysieren, sodass eine erfolgreiche Antikörper-Antigenbindung visualisiert werden kann. Als Enzyme können entweder alkalische Phosphatase oder Peroxidase verwendet werden.
Doppelt indirekte Methode	Zusätzlich zu einem konjugierten Sekundärantikörper wird ein weiterer tertiärer Antikörper, der aus einer anderen Spezies als der Sekundärantikörper stammt, zur Signalverstärkung hinzugegeben.
APAAP/PAP-Methode	Bei dieser Methode wird mit einem Brückenantikörper gearbeitet, der sowohl gegen den F_c -Teil vom Primärantikörper als auch den F_c -Teil von einem Komplex bestehend aus entweder alkalischer Phosphatase oder Peroxidase und einem Antikörper aus derselben Spezies wie der Primärantikörper gerichtet ist.
EnVision-Polymer-Konjugat-Methode	Bei dieser Methode wird zur Visualisierung ein Dextranpolymer verwendet, der mit zahlreichen Sekundärantikörpern und Enzymen beschichtet ist.

Das Prinzip der Immunhistochemie ist in Abbildung 13 dargestellt.

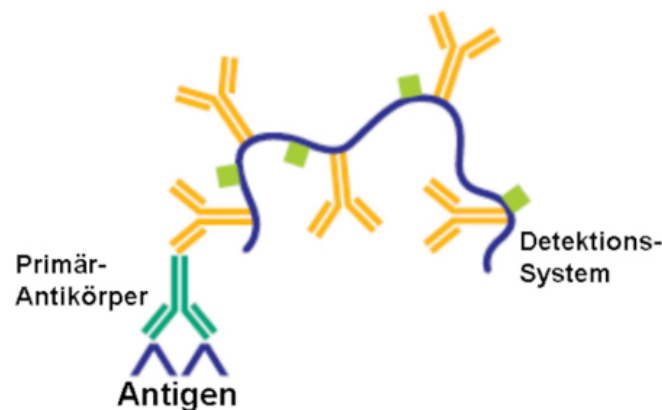


Abbildung 13: Prinzip der Immunhistochemie: Primärantikörper bindet das Antigen auf dem Schnitt. Der FC-Teil vom Primärantikörper wird von einem dahintergeschalteten Detektionssystem erkannt, welches das Signal visualisiert und ggf. verstärkt. Quelle der Abbildung: (Immunhistochemie 2024)

Die größten praktischen Probleme der Immunhistochemie sind die Variabilität von Antikörpern und die durch die Formalin-fixierte Modifikation der Zielproteine. Die Variabilität der kommerziell erhältlichen Antikörper spiegelt die Breite einer physiologischen Immunantwort wider. Im Rahmen der Antikörperherstellung wird zwar versucht, aus den tausenden verschiedenen entstandenen Antikörpern, „die besten“ zu identifizieren, doch ist dies angesichts der Fülle der zu testenden Antikörper und der großen Zahl der theoretisch zu überprüfenden Gewebe nicht möglich. Praktisch bedeutet dies, dass sich alle verschiedenen Antikörper, die gegen ein bestimmtes Zielprotein gerichtet sind, sich stets in ihrer Bindungsstärke, Spezifität und zur erwarteten Signal-to-Noise-Ratio unterscheiden werden. Zudem gibt es für viele interessante Proteine eine sehr große Zahl verschiedener Antikörper. Daraus ergibt sich, dass erstens die Auswahl des bestmöglichen Antikörpers schwierig ist und dass zweitens die Ergebnisse von Studien, welche mit unterschiedlichen Antikörpern erzielt wurden, nur bedingt miteinander vergleichbar sind.

Das zweite Problem ist die Fixation von Geweben, welche meistens mittels Formalin erfolgt. Formalin führt zu einer Vernetzung (sogenanntes „Cross-linking“) von Proteinen, wodurch Proteinstrukturen verkleben (Helander 1994). Die Fixation verändert so die Struktur von Proteinen, wodurch Antikörperbindungsstellen bedeckt und für Antikörper nicht mehr zugänglich

sein können (Werner et al. 2000). Gleichzeitig können durch die veränderte Tertiärstruktur auch neue Epitope entstehen (Helander 1994; Werner et al. 2000).

Die Effekte der Formalinfixierung können durch die sogenannte hitzeinduzierte-Epitopdemaskierung (Heat-Induced-Epitope-Retrieval, HIER) teilweise rückgängig gemacht werden. Die Prozedur der HIER besteht aus einem Kochen von Gewebeschnitten bei sehr hoher Temperatur, wobei durch die Verwendung eines Autoklavs die Kochtemperatur von 100° Celsius auf 121°Celsius (unter Überdruck) erhöht werden kann.

Je nach Antikörper und/oder Epitop ist ein saurer (pH 6,0) oder ein basischer (pH 9,0) pH geeigneter. Die Verwendung eines neutralen pHs (7,8) ist meistens besonders günstig, da hierbei die Morphologie der Gewebe besonders gut erhalten bleibt. Da auch die beste HIER das Protein nicht komplett und optimal wiederherstellt, sind Antikörpervalidierungen, welche auf die Untersuchung von unfixierten Geweben oder Proteinen basieren für Antikörper zur Immunhistochemie an formalinfixiertem Geweben unzulänglich. Allerdings sind die meisten kommerziell erhältlichen Antikörper an Frischmaterial validiert wie ELISA, Western Blot oder Protein-Arrays. Die Internationale Arbeitsgruppe für die Validierung von Antikörpern (International Working Group for Antibody Validation, IWGAV) hat deswegen vorgeschlagen, dass für die Validierung von Antikörpern zur Verwendung an formalinfixierten Gewebe nur eine von zwei Möglichkeiten akzeptabel sind (Uhlen et al. 2016). Möglichkeit 1 ist der Vergleich der mit einem Antikörper erzielten Färbeergebnissen mit Expressionsdaten, welche mit einer zweiten unabhängigen Methode erzielt wurden (zum Beispiel RNA-Analyse) (Uhlen et al. 2016). Methode 2 wäre der Vergleich der Immunhistochemischen Daten mit Färbeergebnissen, welche mit einem zweiten unabhängigen Antikörper erzielt wurden (Uhlen et al. 2016).

2.4 Immunhistochemische Cytokeratin 10 Untersuchung in unserer Studie

Alle TMA-Schnitte, welche für dieses Projekt benötigt wurden, wurden an einem Tag durch Schneiden von 2,5 µm dicken Schnitten mittels eines Mikrotoms von einer MTA hergestellt. Alle Schnitte wurden innerhalb von weniger als einer Woche nach ihrer Herstellung für die Färbung verwendet. Hierzu wurden die Schnitte zunächst mittels Xylol deparaffiniert, dann durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert und dann für 5 Minuten in einem Autoklav

einer HIER-Prozedur unterzogen bei 121°Celsius unter Verwendung eines pH 7,8 Puffers (DAKO-Target-Retrieval-Solution™, Agilent, CA, USA).

Die endogene Peroxidase Aktivität wurde danach mit der DAKO-Peroxidase-Blocking Solution™ (Agilent, CA, USA; #52023) für 10 Minuten geblockt. Der Primärantikörper, spezifisch für Cytokeratin-10 (monoklonaler Mausantikörper, MSVA-610M, MS Validated Antibodies GmbH, Hamburg, Deutschland), wurde bei 37° Celsius für 60 Minuten bei einer Verdünnung von 1:150 appliziert. Der gebundene Antikörper wurde dann mit dem EnVision Kit™ (Agilent, CA, USA; #K5007) nach den Anweisungen des Herstellers visualisiert. Die Schnitte wurden danach mit Hämalaun gegengefärbt.

Eine detaillierte Aufzählung der Schritte und der hierbei verwendeten Reagenzien ist auch in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Detaillierte Aufzählung der Färbeschritte.

Schritt 1	Behandlung mit Xylol zur Deparaffinierung
Schritt 2	Rehydrierung mit absteigender Alkoholreihe bis zu destilliertem Wasser
Schritt 3	Vorbehandlung im Autoklav bei 121° Celcius unter Verwendung eines Puffers mit einem pH von 7,8
Schritt 4	Spülvorgang mit destilliertem Wasser
Schritt 5	Spülvorgang mit TBST-Puffer
Schritt 6	Blockierung der endogenen Peroxidase mit DAKO-Peroxidase-Blocking Solution™
Schritt 7	Zweimaliger Spülvorgang mit TBST-Puffer
Schritt 8	Antikörperinkubation mit Primärantikörper MSVA-610M bei einer Verdünnung von 1:150 bei 37° Celcius für 60 Minuten
Schritt 9	Dreimaliger Spülvorgang mit TBST-Puffer
Schritt 10	Gabe des Sekundärantikörpers nach Herstelleranweisung
Schritt 11	Dreimaliger Spülvorgang mit TBST-Puffer
Schritt 12	Visualisierung durch Gabe von Chromogen bei Raumtemperatur für 10 Minuten
Schritt 13	Spülvorgang mit destilliertem Wasser
Schritt 14	Gegenfärbung mit Hämalaun
Schritt 15	Bläuvorgang
Schritt 16	Dehydration in aufsteigender Alkoholreihe bis Xylol

Alle Schnitte wurden von einer erfahrenen Pathologin (Dr. Natalia Gorbokon) evaluiert und von jedem Tumor wurde der prozentuale Anteil gefärbter Tumorzellen und die Färbeintensität auf einer Skala von 1-3 durch Schätzung ermittelt. Durch eine Kombination der prozentualen Anteile gefärbter Zellen und der Färbeintensität wurde schließlich eine Klassifikation der Tumoren in die Kategorien negativ, schwach positiv, mäßig stark positiv und stark positiv vorgenommen. Die hierfür verwendeten Kriterien sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Beurteilungskriterien

Kategorie	Anteil gefärbter Tumorzellen	Färbeintensität
Negativ	0 %	0
Schwach positiv	≤70 %	1
	≤30 %	2+
mäßig stark positiv	>70 %	1+
	>30 % - 70 %	2+
	≤30 %	3+
stark positiv	>70 %	2+
	>30 %	3+

2.5. Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mittels der Software JMP 16 (SAS Institute Inc., NC, USA) durchgeführt. Mit Hilfe von Kontingenztabellen und dem Chi²-Test wurde nach Korrelationen zwischen der CK10-Immunfärbung und dem Tumorphänotyp bei Urothelkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen von verschiedenen Organen gesucht. Die Überlebenskurven wurden unter Anwendung des Kaplan-Meier-Verfahrens berechnet. Der Log-Rank-Test wurde angewandt, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu ermitteln. Ein p-Wert von ≤0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Technische Aspekte

Von jedem der 76 untersuchten normalgewebs-Kategorien auf dem Normalgewebe-TMA waren mindestens 4 Proben auswertbar, sodass alle relevanten Zelltypen diese Gewebe repräsentativ zur Untersuchung gelangten. Von den 11.021 auf dem Array befindlichen Tumorgewebsproben erwiesen sich 9462 (85,9 %) als auswertbar. Gründe für die Nichtauswertbarkeit waren entweder das Fehlen von Gewebe auf einem Teil der Gewebespots oder aber das Fehlen eindeutiger Tumorzellen auf einem Teil der auf dem Array befindlichen Gewebefragmente. Das Fehlen von einzelnen Gewebespots auf einem TMA ist ein unvermeidbares Problem (siehe Abbildung 14). Auf den ersten Schnitten eines TMAs fehlen Elemente von Zylindern, welche bei der TMA-Herstellung zu tief in den Empfängerblock eingebracht worden waren. Diese Zylinder werden auf den ersten Schnitten noch nicht erfasst. Auf den tieferen Schnitten durch einen TMA-Block nimmt die Zahl der auf dem TMA-Schnitt enthaltenen Gewebespots zunehmend ab, da die kürzeren Gewebezyylinder zunehmend aufgebraucht sind.

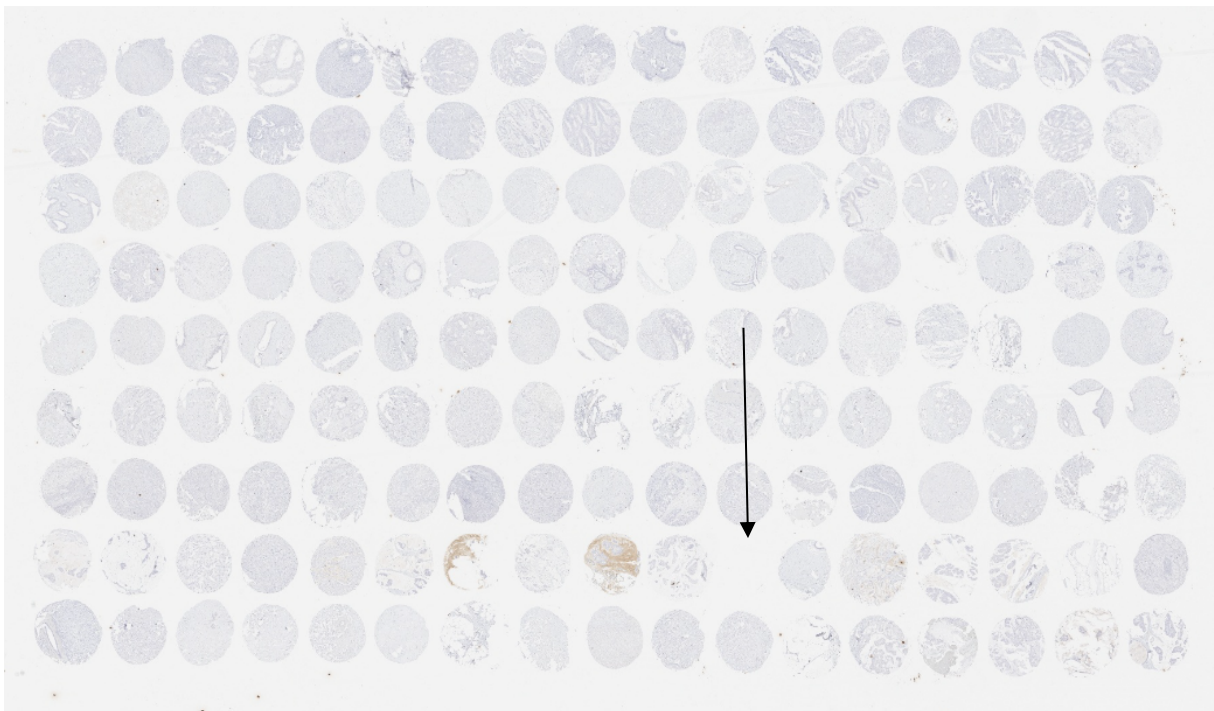


Abbildung 14: Ausschnitt eines TMA-Schnittsektors: Pfeil zeigt einen fehlenden Gewebespot.

3.2. Cytokeratin-10 Expression in Normalgeweben

Eine Cytokeratin-10-Immunfärbung fand sich in den suprabasalen Zellschichten von verhornendem Plattenepithel der Haut und in assoziierten Schweißdrüsen und Haarfollikeln. Die basale Zellschicht war hingegen strikt CK10 negativ.

Eine starke Cytokeratin-10-Anfärbung fand sich regelmäßig auch in keratinisierenden Zellfraktionen des Plattenepithels von Tonsillenkrypten sowie in zentralen Arealen von Hassall-Körperchen im Thymus.

In den allermeisten Geweben und Zellen war keine Cytokeratin-10-Färbung nachweisbar, wie beispielsweise in nicht-verhornendem Plattenepithel von Ektozervix, Tonsillenoberflächen, Ösophagus, Mundhöhle oder der Lippe. Nur in einzelnen Fällen fand sich aber auch in diesen Geweben eine schwache bis teilweise starke Anfärbung von Zellfraktionen von der suprabasalen Zellschicht, welche von variabler Größe waren. Eine Cytokeratin-10-Anfärbung war nie nachweisbar im Urothel, Übergangsepithel der analen Schleimhaut, gastrointestinalen Epithel, Gallenblase, Speicheldrüsen, Leber, Pankreas, Lunge, respiratorischem Epithel, Eileiter, endozervikalen und endometrialen Drüsen des Uterus, Ovar, Plazenta, Hypophyse, Nebenniere, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, lymphatischen, hämatopoetischen und mesenchymalen Geweben sowie dem Gehirn. Repräsentative Bilder von Normalgeweben sind in den Abbildungen 15-20 dargestellt.

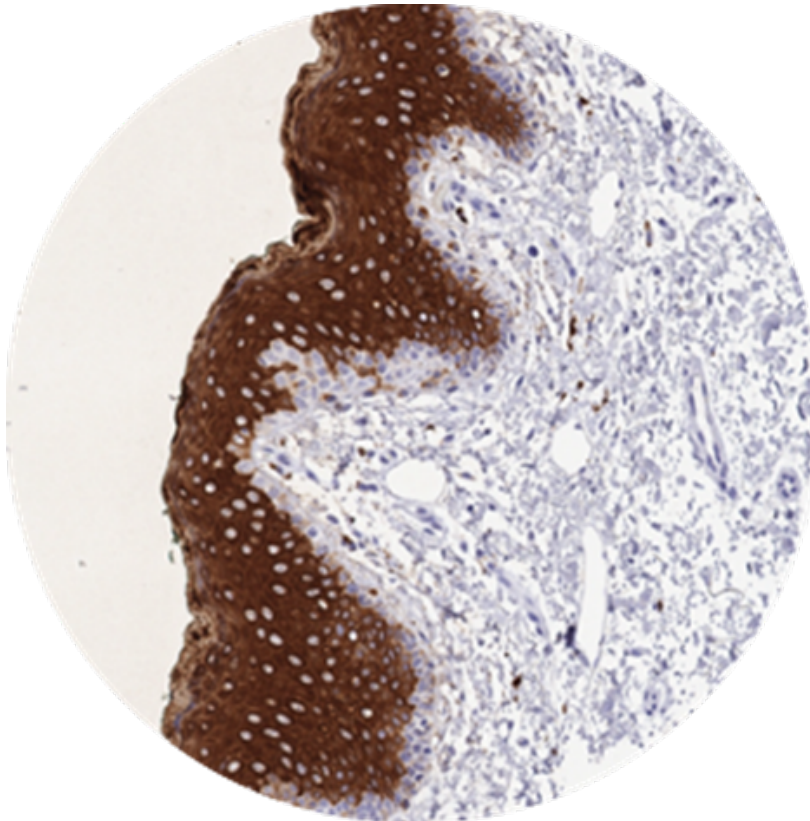


Abbildung 15: Starke CK-10-Anfärbung von suprabasalen Plattenepithelzellen der Haut

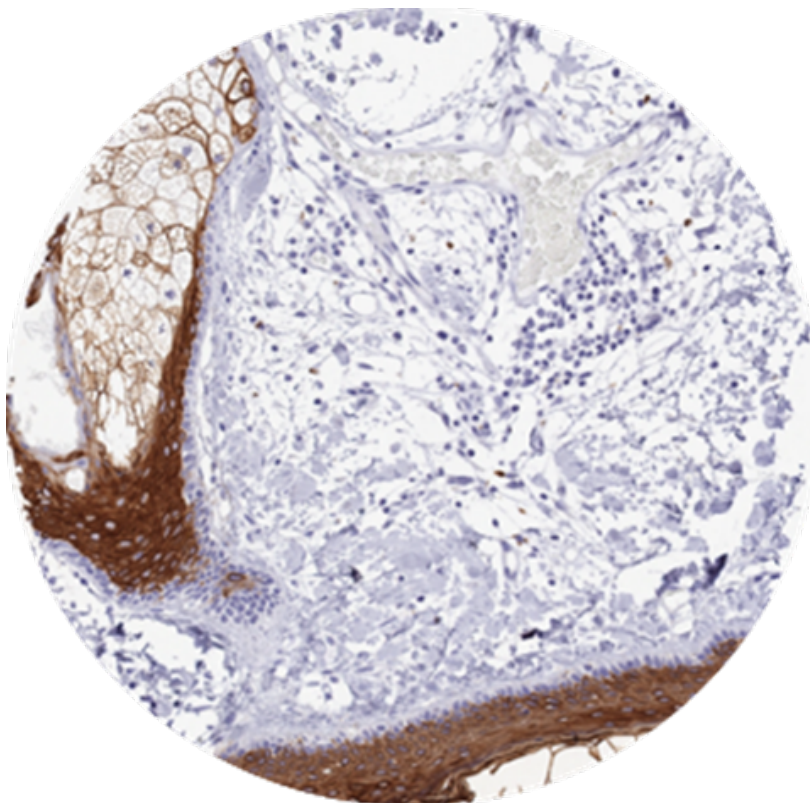


Abbildung 16: Starke CK-10-Anfärbung von Haarfollikeln und Talgdrüsen

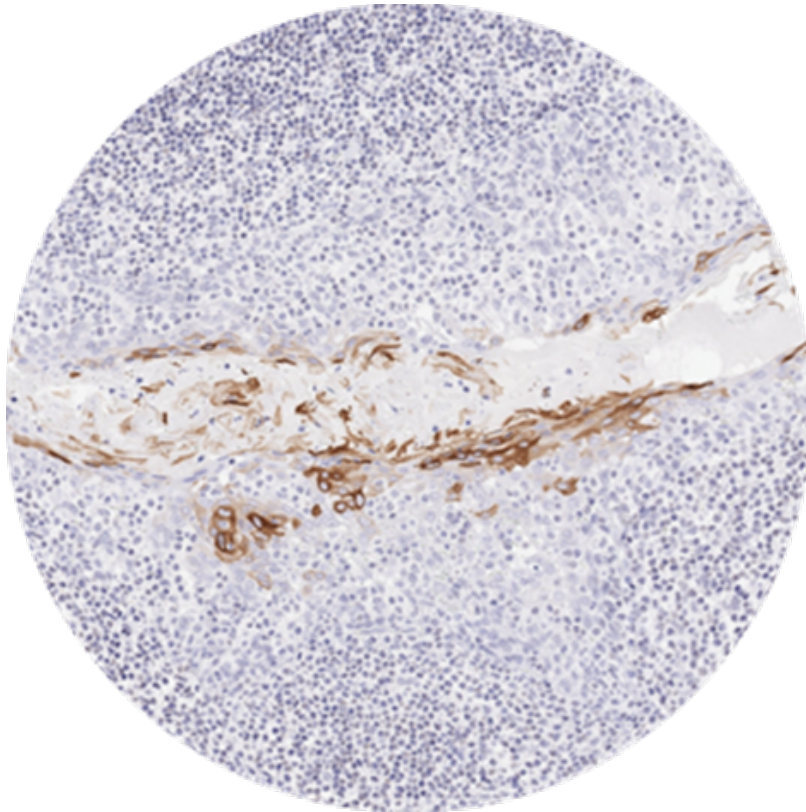


Abbildung 17: Mäßig starke CK-10-Anfärbung von keratinisierten plattenepithelialen Zellfraktionen in der Tonsille.

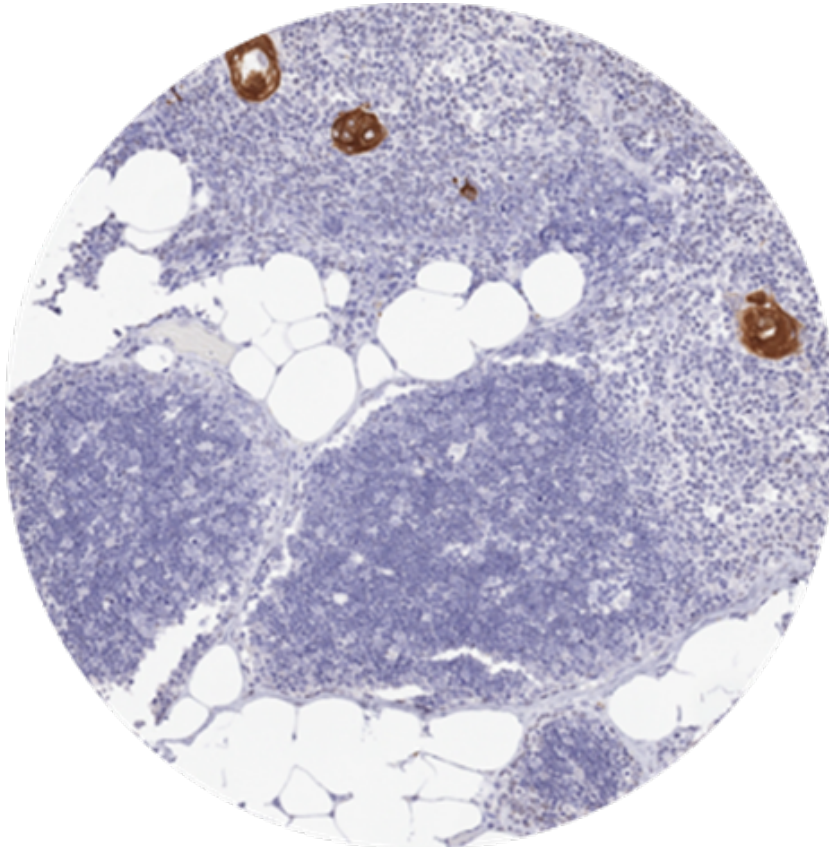


Abbildung 18: Kräftige Cytokeratin 10 Positivität von keratinisierenden Zellen von Hassall-Körperchen.

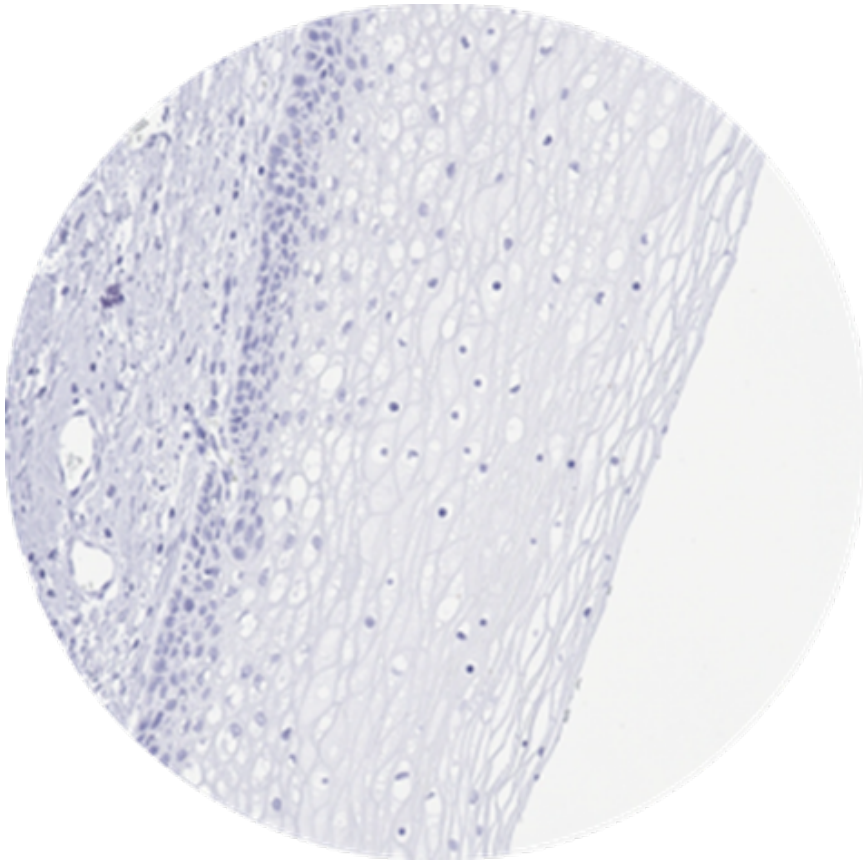


Abbildung 19: Keine CK-10-Anfärbung in nicht-keratinisierten Plattenepithelzellen der Cervix uterine.

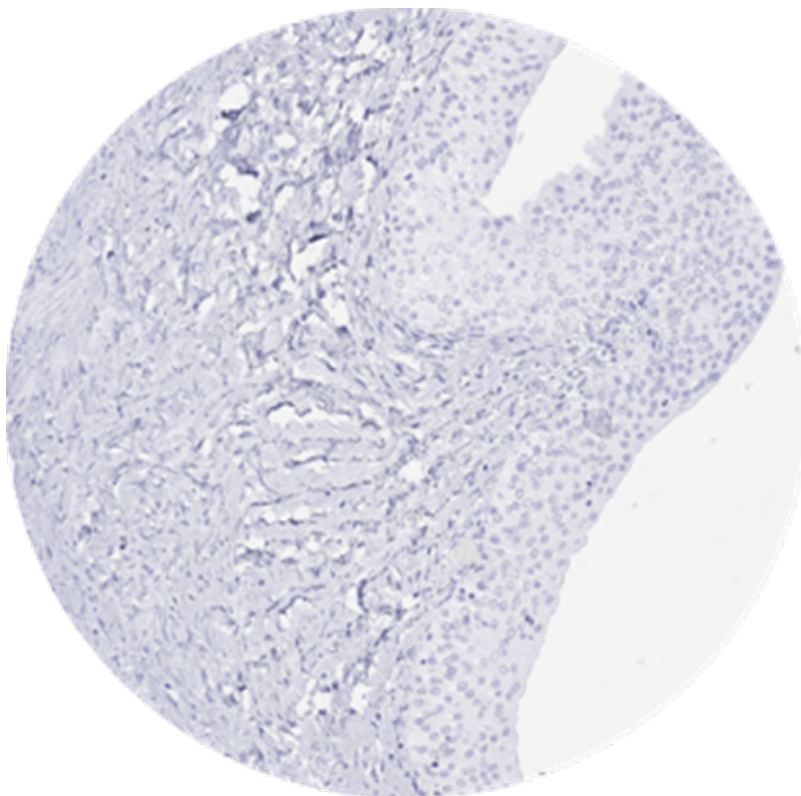


Abbildung 20: Keine CK-10-Anfärbung im Urothel der Harnblase

3.3. Cytokeratin 10 in Tumorgeweben

Eine Cytokeratin 10 Immunfärbung fand sich in 8,3% (790) der insgesamt 9462 auswertbaren Tumoren, wobei 5,2% (495) eine schwache, 1,9% (181) eine mäßig und 1,2% (114) eine starke Immunfärbung zeigten. Mindestens einen Fall mit zumindest schwacher Cytokeratin 10 Anfärbung fand sich in 41 der analysierten Tumortypen. In 18 der Tumorkategorien fand sich mindestens ein Fall mit einer starken Cytokeratin 10 Positivität. Eine vollständige Auflistung der CK-10-Färbeergebnisse ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: CK10-IHC-Ergebnisse

CK10 IHC							
	Tumorentität	auf TMA (n)	auswertbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	kräftig (%)
Tumoren der Haut	Pilomatrixom	35	34	88,2	2,9	8,8	0,0
	Basalzellkarzinom	88	63	85,7	14,3	0,0	0,0
	Benigner Naevus	29	28	100,0	0,0	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom der Haut	90	86	34,9	39,5	8,1	17,4
	Malignes Melanom	46	44	100,0	0,0	0,0	0,0
	Malignes Melanom (Lymphknoten metasta- siert)	86	72	93,1	6,9	0,0	0,0
	Merkelzellkarzinom	46	46	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren aus dem Kopf/Hals-Bereich	Plattenepithelkarzinom des Larynx	109	96	52,1	35,4	5,2	7,3
	Plattenepithelkarzinom des Pharynx	60	50	68,0	24,0	6,0	2,0
	Orales Plattenepithelkar- zinom des Mundbodens	130	117	55,6	28,2	11,1	5,1
	Pleomorphes Adenom der Glandula parotis	50	48	95,8	2,1	2,1	0,0
	Warthin Tumor der Glandula parotis	49	46	52,2	47,8	0,0	0,0
	Basalzelladenom der Speicheldrüse	15	14	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren der Lunge, der Pleura und des Thymus	Adenokarzinom der Lunge	196	183	99,5	0,0	0,0	0,5
	Plattenepithelkarzinom der Lunge	80	70	81,4	12,9	5,7	0,0
	Kleinzelliges Karzinom der Lunge	16	16	100,0	0,0	0,0	0,0
	Mesothelium, epitheloid	39	34	100,0	0,0	0,0	0,0
	Mesothelium, anderer Typ	76	71	100,0	0,0	0,0	0,0
	Thymom	29	29	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren des weibli- chen Geschlechts	Plattenepithelkarzinom der Vagina	78	71	64,8	26,8	5,6	2,8
	Plattenepithelkarzinom der Vulva	130	118	33,9	39,0	12,7	14,4
	Plattenepithelkarzinom der Zervix	307	299	60,2	30,1	4,7	5,0
	Tumorentität	auf TMA (n)	auswertbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	kräftig (%)
	Adenosquamoses Karzi- nom der Zervix	19	18	88,9	11,1	0,0	0,0
	Adenokarzinom der Zer- vix	54	52	96,2	3,8	0,0	0,0
	Endometrioides Endo- metriumkarzinom	50	50	98,0	2,0	0,0	0,0
	Seröses Endometriumkar- zinom	50	47	100,0	0,0	0,0	0,0
	Karzinoid des Endo- metriums	20	20	100,0	0,0	0,0	0,0

	Endometrioides Ovarialkarzinom	69	64	96,9	0,0	1,6	1,6
	Seröses Ovarialkarzinom	130	126	98,4	0,8	0,8	0,0
	Muzinöses Ovarialkarzinom	52	51	100,0	0,0	0,0	0,0
	Klarzelliges Ovarialkarzinom	22	22	100,0	0,0	0,0	0,0
	Karzinom des Ovars	17	16	93,8	0,0	6,3	0,0
	Granulosazelltumor des Ovars	37	35	97,1	2,9	0,0	0,0
	Leydigzelltumor des Ovars	4	4	100,0	0,0	0,0	0,0
	Sertolizelltumoren 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
	Brennertumor	41	40	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren der Brust	Invasives Mammakarzinom, nicht spezifischer Typ (NST)	1764	1389	96,8	1,0	1,9	0,2
	Lobuläres Mammakarzinom	363	273	98,9	0,7	0,4	0,0
	Medulläres Mammakarzinom	34	29	100,0	0,0	0,0	0,0
	Tubuläres Mammakarzinom	29	25	100,0	0,0	0,0	0,0
	Muzinöses Mammakarzinom	65	46	100,0	0,0	0,0	0,0
	Phylloider Tumor der Brust	50	50	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren des Verdauungssystems	Adenomatöser Polyp, low-grade Dysplasie	50	50	98,0	2,0	0,0	0,0
	Adenomatöser Polyp, high-grade Dysplasie	50	50	100,0	0,0	0,0	0,0
	Tumorentität	auf TMA (n)	auswertbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	kräftig (%)
	Adenokarzinom des Kolons	81	80	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenokarzinom des Magens, diffuser Typ	80	75	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenokarzinom des Magens, intestinaler Typ	80	71	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenokarzinom des Ösophagus	83	71	98,6	1,4	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	76	57	78,9	21,1	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom des Analkanals	89	82	53,7	32,9	7,3	6,1
	Cholangiozelluläres Karzinom	50	50	100,0	0,0	0,0	0,0
	Hepatozelluläres Karzinom	50	50	100,0	0,0	0,0	0,0
	Duktales Adenokarzinom des Pankreas	81	78	97,4	2,6	0,0	0,0
	Ampulläres Adenokarzinom des Pankreas	28	27	100,0	0,0	0,0	0,0

	Azinuszellkarzinom des Pankreas	10	9	100,0	0,0	0,0	0,0
	Gastrointestinaler Stroma-Tumor (GIST)	50	48	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren des harnbildenden und harnableitenden Systems	Nicht invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2 low grade	177	160	96,9	2,5	0,6	0,0
	Nicht invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2 high grade	141	133	94,0	5,3	0,8	0,0
	Nicht invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G3	219	199	96,0	2,5	1,0	0,5
	Urothelkarzinom, pT2-4 G3	1318	758	83,2	9,4	6,9	0,5
	Plattenepithelkarzinom der Blase	22	20	35,0	15,0	30,0	20,0
	Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom der Blase	22	21	100,0	0,0	0,0	0,0
	Sarkomatoides Urothelkarzinom	25	24	95,8	0,0	0,0	4,2
	Urothelkarzinom des Nierenbeckens	62	57	86,0	10,5	3,5	0,0
	Nierenzellkarzinom, klarzellig	50	50	100,0	0,0	0,0	0,0
	Nierenzellkarzinom, papillär	50	46	100,0	0,0	0,0	0,0
	Nierenzellkarzinom, chromophob	50	49	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren des harnbildenden und harnableitenden Systems	Tumorentität	auf TMA (n)	auswertbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	kräftig (%)
	Onkozytom	50	50	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren der männlichen Geschlechtsorgane	Adenokarzinom der Prostata Gleason 3+3	83	83	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenokarzinom der Prostata Gleason 4+4	80	77	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenokarzinom der Prostata Gleason 5+5	85	84	100,0	0,0	0,0	0,0
	Kleinzelliges Prostatakarzinom	17	16	100,0	0,0	0,0	0,0
	Seminom des Hoden	50	50	100,0	0,0	0,0	0,0
	Embryonales Karzinom (Hoden)	50	44	100,0	0,0	0,0	0,0
	Leydigzelltumor des Hoden	30	28	100,0	0,0	0,0	0,0
	Sertolizelltumor des Hoden	2	1	100,0	0,0	0,0	0,0
	Keimstrangtumor des Hoden	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	48	100,0	0,0	0,0	0,0
	Teratom des Hoden	50	39	66,7	2,6	2,6	28,2
	Plattenepithelkarzinom des Penis	80	69	39,1	21,7	11,6	27,5

Tumoren der endokrinen Organe	Schilddrüsenadenom	113	112	100,0	0,0	0,0	0,0
	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	391	370	99,7	0,0	0,3	0,0
	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	154	148	98,6	1,4	0,0	0,0
	Medulläres Schilddrüsenkarzinom	111	110	100,0	0,0	0,0	0,0
	Nebenschilddrüsenadenom	43	30	100,0	0,0	0,0	0,0
	Schilddrüsenkarzinom, anaplastisch	45	44	100,0	0,0	0,0	0,0
	Nebennieren-Adenom	50	49	100,0	0,0	0,0	0,0
	Nebennieren-Karzinom	26	26	100,0	0,0	0,0	0,0
	Phäochromozytom	50	50	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokriner Tumor (NET) des Appendix	22	17	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren der endokrinen Organe	Tumorentität	auf TMA (n)	auswertbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	kräftig (%)
	Neuroendokriner Tumor (NET) des Kolons/Rektums	11	11	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokriner Tumor (NET) des Ileum	49	49	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokriner Tumor (NET) der Lunge	19	18	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokriner Tumor (NET) des Pankreas	97	95	98,9	0,0	0,0	1,1
	Neuroendokrines Karzinom (NEC), kolorektal	12	11	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokrines Karzinom (NEC) der Gallenblase	4	4	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokrines Karzinom (NEC) des Pankreas	13	13	92,3	0,0	7,7	0,0
Tumoren hämatopoetischen und lymphatischen Ursprungs	Hodgkin-Lymphom	103	86	100,0	0,0	0,0	0,0
	Kleines lymphozytisches Lymphom, B-Zell typ (B-SLL/B-CLL)	50	38	100,0	0,0	0,0	0,0
	Diffuses großes B-Zell-Lymphom (DLBCL)	113	103	100,0	0,0	0,0	0,0
	Follikuläres Lymphom	88	75	100,0	0,0	0,0	0,0
	T-Zell Non-Hodgkin-Lymphom	25	20	100,0	0,0	0,0	0,0
	Mantelzelllymphom	18	15	100,0	0,0	0,0	0,0
	Marginalzonen-Lymphom	16	12	100,0	0,0	0,0	0,0
	Diffuser Groß-B-Zell-Lymphom des Hodens (DLBCL)	16	14	100,0	0,0	0,0	0,0
	Burkitt-Lymphom	5	2	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren des Weichteil- und Knochengewebes	Tenosynovialer Riesenzelltumor	45	45	100,0	0,0	0,0	0,0
	Granularzelltumor	53	49	100,0	0,0	0,0	0,0

	Leiomyom	50	46	100,0	0,0	0,0	0,0
	Leiomyosarkom	87	87	100,0	0,0	0,0	0,0
	Liposarkoma	132	130	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren des Weichteil- und Knochengewebes	Tumorentität	auf TMA (n)	auswertbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	kräftig (%)
	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	70	100,0	0,0	0,0	0,0
	Angiomyolipom	91	91	100,0	0,0	0,0	0,0
	Dermatofibrosarkom protuberans	21	18	100,0	0,0	0,0	0,0
	Ganglioneurom	14	13	100,0	0,0	0,0	0,0
	Kaposi-Sarkom	8	7	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neurofibrom	117	104	100,0	0,0	0,0	0,0
	Sarkom, nicht weiter spezifiziert (NOS)	74	72	100,0	0,0	0,0	0,0
	Paragangliom	41	40	100,0	0,0	0,0	0,0
	Ewing-Sarkom	23	20	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
	Synovialsarkom	12	11	100,0	0,0	0,0	0,0
	Osteosarkom	43	41	100,0	0,0	0,0	0,0
	Chondrosarkom	38	27	100,0	0,0	0,0	0,0
	Rhabdoider Tumor	5	5	100,0	0,0	0,0	0,0

Repräsentative Bilder von Cytokeratin 10 positiven und negativen Tumoren sind in Abbildung 21-28 dargestellt. Eine Rangliste der untersuchten Tumorkategorien nach ihrer Cytokeratin 10 Positivitätsrate und der Fraktionen von Tumoren mit starker Positivität sind in Abbildung 29 und Tabelle 10 dargestellt.

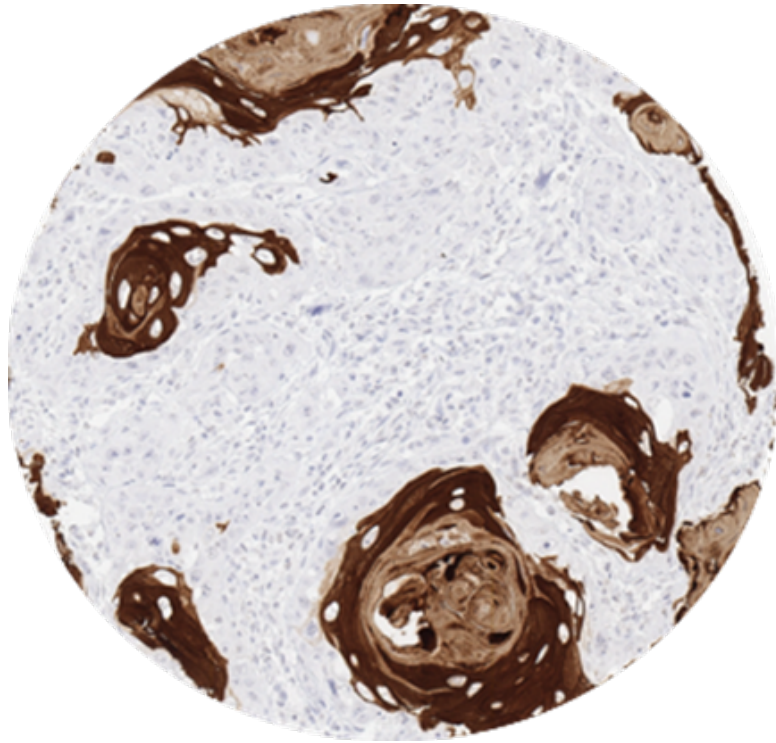


Abbildung 21: Fokal starke Cytokeratin 10 Anfärbung in keratinisierten Bereichen von Plattenepithelkarzinomen der Vulva.

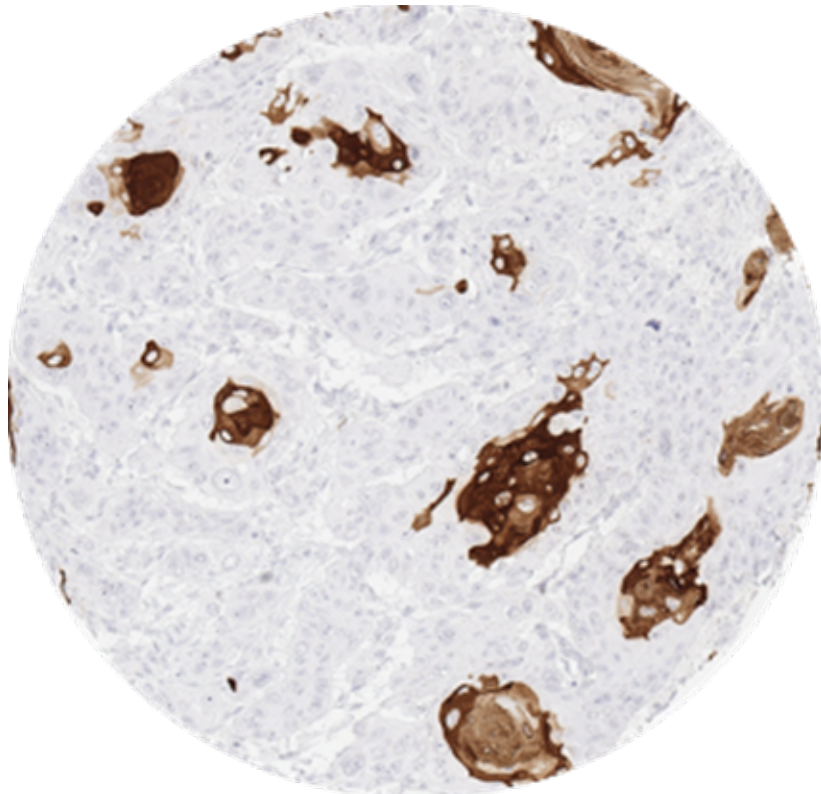


Abbildung 22: Fokal starke Cytokeratin 10 Anfärbung in keratinisierten Bereichen von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle

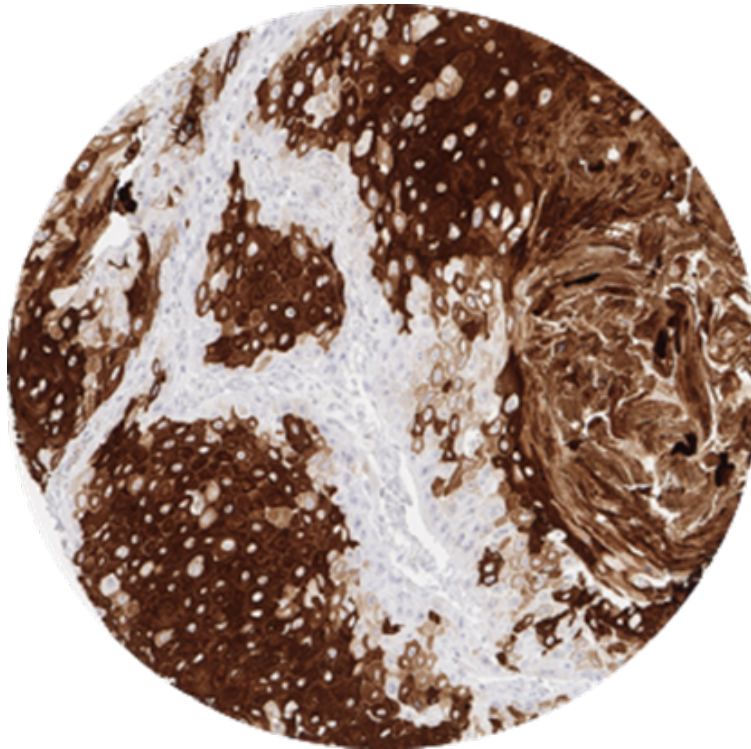


Abbildung 23: Kräftige Cytokeratin 10 in keratinisierten Arealen eines Plattenepithelkarzinoms des Penis.

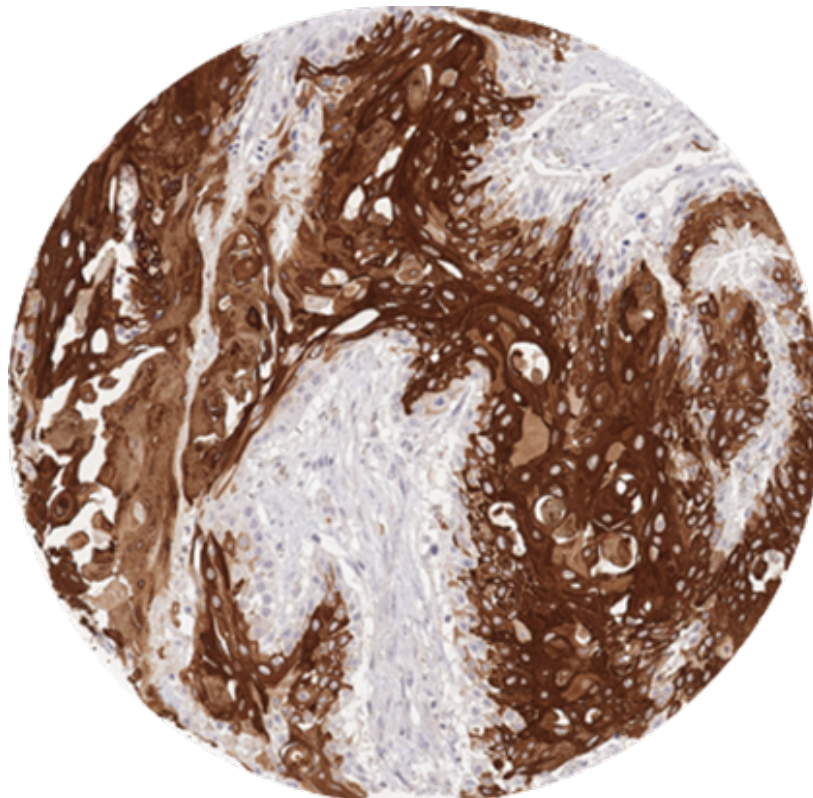


Abbildung 24: Kräftige Cytokeratin 10 im Urothelkarzinom der Blase sowie in Arealen keratinisierter plattenepithelialer Karzinomzellen.

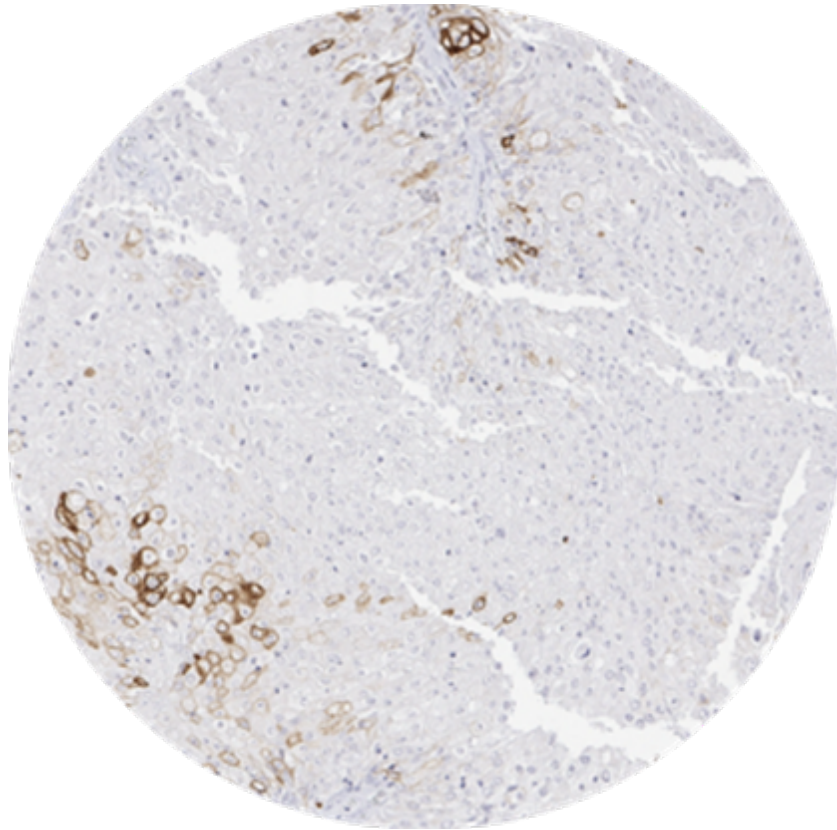


Abbildung 25: Fokale Cytokeratin 10 Positivität in nicht invasivem Harnblasenkarzinom (pTa G2, low grade).

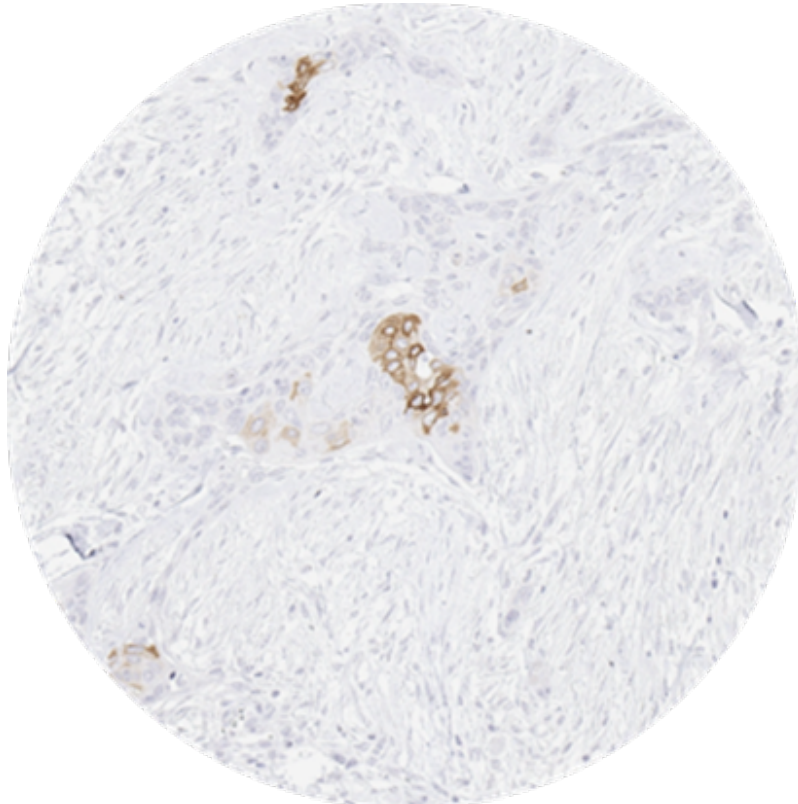


Abbildung 26: Fokale Cytokeratin 10 Positivität in Arealen mit keratinisierter plattenepithelialer Differenzierung von duktalem Adenokarzinomen des Pankreas.

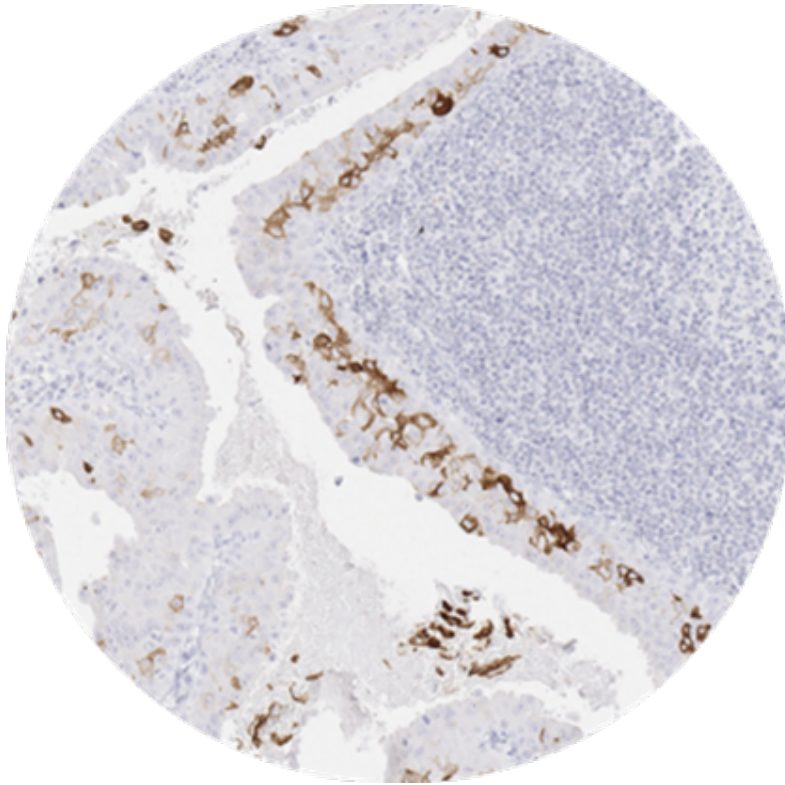


Abbildung 27: Cytokeratin 10 Positivität in der Mehrzahl der basalen epithelialen Zellen eines Warthin Tumors einer Speicheldrüse.

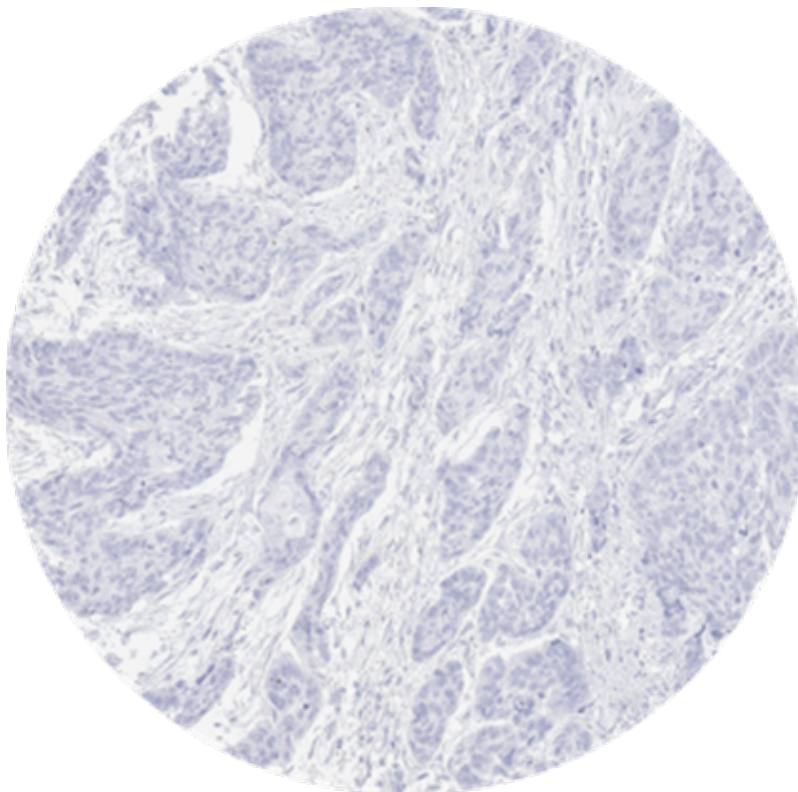


Abbildung 28: Fehlende Cytokeratin 10 Positivität in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus

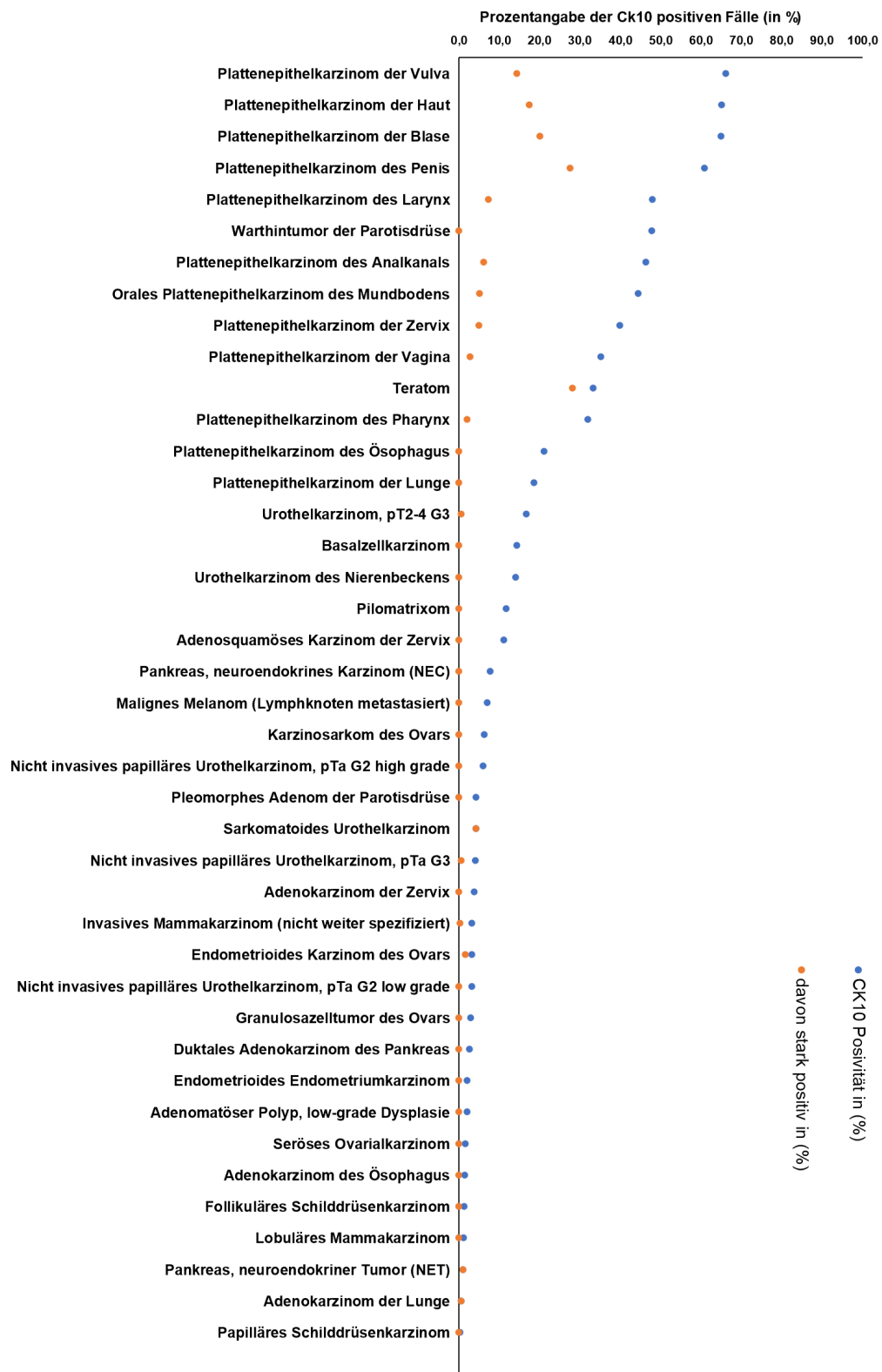


Abbildung 29: Rangliste der Cytokeratin 10 (CK10) positiven Tumorkategorien (grafische Darstellung)

Tabelle 10: Rangliste der Cytokeratin 10 positiven Tumorkategorien mit genauen Prozentangaben

Ranking	Cytokeratin 10 Positivität in (%)	davon stark positiv in (%)
Plattenepithelkarzinom der Vulva	66,1	14,4
Plattenepithelkarzinom der Haut	65,1	17,4
Plattenepithelkarzinom der Blase	65,0	20,0
Plattenepithelkarzinom des Penis	60,9	27,5
Plattenepithelkarzinom des Larynx	47,9	7,3
Warthintumor der Parotisdrüse	47,8	0,0
Plattenepithelkarzinom des Analkanals	46,3	6,1
Orales Plattenepithelkarzinom des Mundbodens	44,4	5,1
Plattenepithelkarzinom der Zervix	39,8	5,0
Plattenepithelkarzinom der Vagina	35,2	2,8
Teratom	33,3	28,2
Plattenepithelkarzinom des Pharynx	32,0	2,0
Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	21,1	0,0
Plattenepithelkarzinom der Lunge	18,6	0,0
Urothelkarzinom, pT2-4 G3	16,8	0,5
Basalzellkarzinom	14,3	0,0
Urothelkarzinom des Nierenbeckens	14,0	0,0
Pilomatrixom	11,8	0,0
Adenosquamöses Karzinom der Zervix	11,1	0,0
Pankreas, neuroendokrines Karzinom (NEC)	7,7	0,0
Malignes Melanom (Lymphknoten metastasiert)	6,9	0,0
Karzinom des Ovars	6,3	0,0
Nicht invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2 high-grade	6,0	0,0
Pleomorphes Adenom der Parotisdrüse	4,2	0,0
Sarkomatoides Urothelkarzinom	4,2	4,2
Nicht invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G3	4,0	0,5
Adenokarzinom der Zervix	3,8	0,0
Invasives Mammakarzinom, nicht spezifischer Typ (NST)	3,2	0,2
Endometrioides Karzinom des Ovars	3,1	1,6
Nicht invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2 low-grade	3,1	0,0
Granulosazelltumor des Ovars	2,9	0,0
Duktales Adenokarzinom des Pankreas	2,6	0,0
Endometrioides Endometriumkarzinom	2,0	0,0
Adenomatöser Polyp, low-grade Dysplasie	2,0	0,0
Seröses Ovarialkarzinom	1,6	0,0
Adenokarzinom des Ösophagus	1,4	0,0
Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	1,4	0,0

Lobuläres Mammakarzinom	1,1	0,0
Pankreas, neuroendokriner Tumor (NET)	1,1	1,1
Adenokarzinom der Lunge	0,5	0,5
Papilläres Schilddrüsenkarzinom	0,3	0,0

Die höchsten Cytokeratin 10 Positivitätsraten fanden sich in Plattenepithelkarzinomen von unterschiedlichen Ursprungsorten (positiv in 18,6-66,1%) und in Warthin-Tumoren von Speicheldrüsen (47,8 positiv) gefolgt von verschiedenen Tumorentitäten welche bekannt dafür sind eine fokale plattenepitheliale Differenzierung aufzuweisen wie beispielsweise Teratome des Hodens (33,3%), Basalzellkarzinome der Haut (14,3%), Adenosquamöse Karzinome der Cervix uteri (11,1%) und verschiedene Kategorien von Urothelneoplasien (3,1-16,8%).

In Cytokeratin 10 positiven Tumoren war die Cytokeratin 10 Anfärbung oft fokal und auf Areale mit ausreichendem Plattenepithel mit beginnender Verhornung beschränkt.

Da aus diesem Grund der prozentuale Anteil der Cytokeratin 10 positiven Tumorzellen auch bei sehr starker Expression von Cytokeratin 10 in den positiven Zellen häufig gering war, resultierte die Klassifikation der Cytokeratin 10 Färbung nach den vordefinierten Kriterien meistens in einer Klassifikation der Tumoren als geringgradig oder mäßig stark Cytokeratin 10 positiv.

Nur in einer kleinen Menge von Tumoren fand sich eine Cytokeratin 10 Positivität in Tumoralen, welche eindeutig keine Zeichen einer plattenepithelialen Differenzierung aufwiesen. Hierzu gehörten beispielsweise Cytokeratin 10 positive neuroendokrine Tumoren des Pankreas (Abbildung 30).

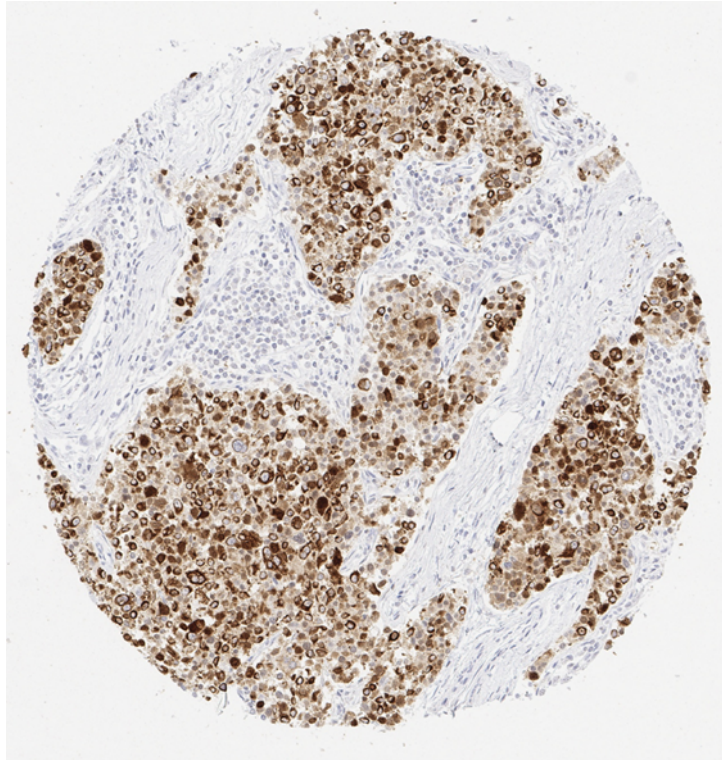


Abbildung 30: Cytokeratin 10 positiver neuroendokriner Tumor des Pankreas.

3.4 Cytokeratin 10 Immunfärbung und Tumorphänotyp/Prognose

Die Beziehung zwischen Cytokeratin 10 Immunfärbung und histopathologischen Tumorparametern konnte bei urothelialen und plattenepithelialen Neoplasien verglichen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Cytokeratin 10 (CK10)-Färbung und histopatologische Tumorparameter bei urothelialen Neoplasien versus plattenepithelialen Neoplasien.

		CK10 IHC					p
		n	negativ (%)	schwach (%)	mäßig (%)	kräftig (%)	
Urothelkarzinome der Harnblase	Alle Tumoren	1195	89,1	6,4	4,1	0,4	
	pTa G2 low	160	96,9	2,5	0,6	0,0	<0.0001
	pTa G2 high	133	94,0	5,3	0,8	0,0	
	pTa G3	177	96,0	2,8	0,6	0,6	
	pT2-4	617	82,3	9,6	7,5	0,6	
	pTa G2 low	160	96,9	2,5	0,6	0,0	0,7003
	pTa G2 high	133	94,0	5,3	0,8	0,0	
	pTa G3	177	96,0	2,8	0,6	0,6	
	pT2**	113	79,6	10,6	8,0	1,8	0,2150
	pT3**	210	76,7	11,4	11,9	0,0	
	pT4**	99	77,8	15,2	6,1	1,0	
	G2**	22	81,8	18,2	0,0	0,0	0,1523
	G3**	399	77,4	11,8	10,0	0,8	
	pN0**	242	77,3	12,4	9,5	0,8	0,9880
	pN+**	170	78,3	11,5	9,6	0,6	
Plattenepithelkarzinome der Zervix uteri	Alle Tumoren	176	57,4	33,5	4,5	4,5	
	pT1	113	55,8	37,2	3,5	3,5	0,1470
	pT2	52	67,3	23,1	5,8	3,8	
	pT3-4	11	27,3	45,5	9,1	18,2	
	pN0	129	57,4	34,9	4,7	3,1	0,4757
	pN1	45	57,8	28,9	4,4	8,9	
	G1	1	100,0	0,0	0,0	0,0	0,1509
	G2	80	47,5	43,8	5,0	3,8	
	G3	93	66,7	23,7	4,3	5,4	
Plattenepithelkarzinom unterschiedlichen Ursprungs*	Alle Tumoren	906	82,3	8,3	4,2	5,3	
	pT1	378	50,3	35,7	7,7	6,3	0,0032
	pT2	313	57,5	26,2	8,0	8,3	
	pT3	136	64,7	25,0	2,2	8,1	
	pT4	129	64,3	23,3	8,5	3,9	
	pN0	446	57,4	30,5	6,5	5,6	0,6002
	pN+	339	61,4	26,3	6,2	6,2	
	G1	35	45,7	25,7	8,6	20,0	<0.0001
	G2	469	44,8	38,2	8,7	8,3	
	G3	350	67,7	22,0	5,1	5,1	

*Oral, Pharynx, Larynx, Ösophagus, Lunge, Zervix, Vagina, Vulva, Penis, Haut, und Analkanal;

**nur in der Untergruppe der pT2-pT4 Tumoren, Abkürzung: pT: pathologisches Tumorstadium, G: Grade, pN: pathologischer Lymphknotenstatus

Für urotheliale Neoplasien ergab sich eine signifikant häufige Cytokeratin 10 Anfärbung im muskelinvasiven (pT2 mindestens) also nicht invasiven urothelialen Tumoren (pTa, p<0,0001).

Eine kombinierte Analyse von 906 Plattenepithelkarzinomen von 11 unterschiedlichen Ursprungsorten ergaben einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer verminderten Cytokeratin 10 Färbung und einem hohen Malignitätsgrad ($p < 0,0001$) bzw. einem fortgeschrittenen Tumorstadium ($p = 0,0032$). Es fand sich in diesem Kollektiv aber weder bei gemeinsamer Untersuchung aller Tumoren noch in den einzelnen organdefinierten Subgruppen eine signifikante Beziehung zum Humanen Papillomavirus (HPV) Infektion ($p > 0,05$, Tabelle 12).

Tabelle 12: Cytokeratin 10 (CK10)- IHC versus HPV-Status.

	HPV- Status	n	CK10 IHC (%)				p
			negativ (%)	schwach (%)	mäßig (%)	kräftig (%)	
Alle Plattenepithelkarzinome	negativ	262	50,0	33,2	7,3	9,5	0,0833
	positiv	218	51,4	24,3	11,0	13,3	
Orale Plattenepithelkarzinome	negativ	56	60,7	26,8	8,9	3,6	0,3817
	positiv	13	53,8	15,4	15,4	15,4	
Plattenepithelkarzinome des Pharynx	negativ	19	73,7	26,3	0,0	0,0	0,2325
	positiv	29	62,1	24,1	10,3	3,4	
Plattenepithelkarzinome des Larynx	negativ	42	42,9	42,9	7,1	7,1	0,7099
	positiv	8	50,0	37,5	0,0	12,5	
Plattenepithelkarzinome der Zervix	negativ	10	80,0	20,0	0,0	0,0	0,3146
	positiv	64	59,4	25,0	7,8	7,8	
Plattenepithelkarzinome der Vagina	negativ	15	53,3	40,0	6,7	0,0	0,2570
	positiv	15	66,7	13,3	13,3	6,7	
Plattenepithelkarzinome der Vulva	negativ	51	35,3	37,3	11,8	15,7	0,6501
	positiv	24	25,0	33,3	16,7	25,0	
Plattenepithelkarzinome des Penis	negativ	30	73,3	10,0	3,3	13,3	0,1862
	positiv	45	62,2	2,2	6,7	28,9	
Plattenepithelkarzinome der Haut	negativ	35	42,9	42,9	5,7	8,6	0,2001
	positiv	1	0,0	0,0	0,0	100,0	
Plattenepithelkarzinome des Analkanals	negativ	5	80,0	20,0	0,0	0,0	0,6517
	positiv	26	61,5	23,1	7,7	7,7	

In einer separaten Kohorte von 176 Plattenepithelkarzinomen der Cervix uteri fand sich allerdings keine signifikante Korrelation zu einem fortgeschrittenen Tumorstadium ($p = 0,15$) und auch kein signifikanter Einfluss der Cytokeratin 10 Färbung auf das rezidivfreie Überleben ($p = 0,52$, Abbildung 31-A) oder Gesamtüberleben ($p = 0,51$, Abbildung 31-B) der Patientinnen.

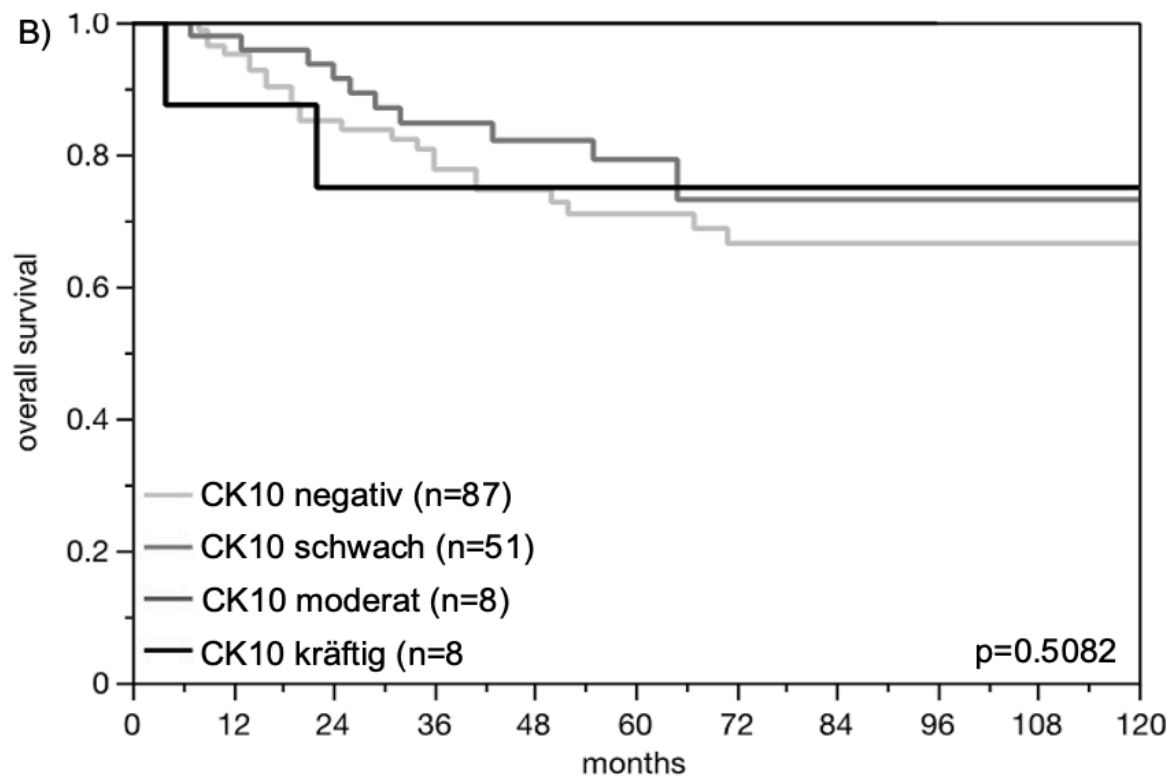
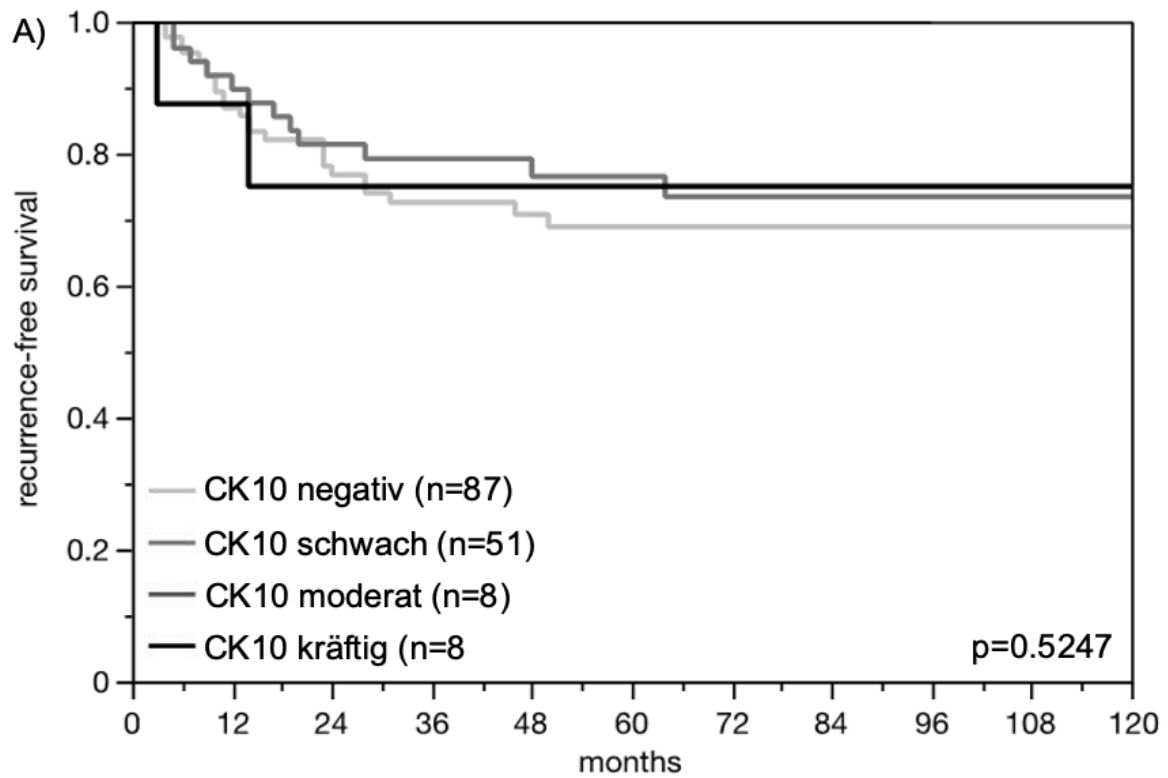


Abbildung 31: Zusammenhang zwischen Cytokeratin 10 (CK10)- IHC und rezidivfreiem Überleben (A) bzw. Gesamtüberleben(B).

4. Diskussion

In dieser Studie wurden 9462 Tumoren von 131 verschiedenen Tumortypen untersucht. Die große Zahl der untersuchten Tumoren wurde durch die Verwendung der TMA-Technik ermöglicht, wobei auch durch die jahrelange Vorarbeit einer großen Zahl von Personen am UKE eine einzigartige Sammlung von TMAs erstellt worden war. Das TMA-Verfahren weist verschiedene Vorzüge auf, so erlaubt die Methode eine massive Beschleunigung von Studien an histologischen Schnittpräparaten bei gleichzeitiger massiver Reduzierung der Kosten (Simon et al. 2004). Bezüglich der Qualität von Untersuchungen liegt der größte methodische Vorteil der TMA-Methode in der maximalen Standardisierung der angewendeten Verfahren und Prozesse (Simon et al. 2004). Die Standardisierung betrifft zunächst die Färbungen. Alle Schnitte für eine TMA-Studie können an einem Tag hergestellt werden, dann unter identischen Bedingungen gelagert und an einem anderen Tag von einer Person mit absolut identischen Reagenzien, bei identischen Bedingungen, identischer Raumtemperatur, identischer Luftfeuchtigkeit und identischen Färbezeiten verarbeitet werden. Die für alle Tumoren einer Studie identische Zeit zwischen dem Herstellen der Schnittpräparate und der immunhistochemischen Färbung verhindert einen variablen Einfluss der Schnittlagerungszeit auf die Färbeergebnisse. Studien haben nämlich gezeigt, dass eine erhöhte Dauer der Schnittlagerungszeit für viele Antikörper zu einer signifikanten Verringerung der Färbeintensität führt (Mirlacher et al. 2004; Jacobs et al. 1996; DiVito et al. 2004). Weitere Vorteile liegen in der Standardisierung der pro Tumor untersuchten Gewebemenge und der Auswertung. Durch das gleichzeitige Vorliegen von hundert von Tumoren auf einem Objektträger kann der auswertende Pathologe jede Färbung immer mit einer sehr großen Zahl von anderen Färbungen vergleichen, sodass es ihm leichter fällt, die Kriterien für +, ++, +++ konstant zu halten (G.Sauter, persönliche Mitteilung). Nach der Erstbeschreibung der TMA-Methode 1998 durch Kononen et al (Kononen et al. 1998) wurde darüber diskutiert, ob die kleine Gewebemenge pro Tumor (0,6mm Durchmesser) eine repräsentative Beurteilung eines Tumors zulässt (Sauter 2010). Studien haben aber gezeigt, dass alle etablierten molekularen Prognosefaktoren an großen TMAs sehr gut reproduziert werden konnten. Dies betrifft beispielsweise die prognostische Bedeutung von p53-Färbungen (Vallmanya Llena et al. 2006) und Ki-67-Labeling-Index beim Harnblasenkarzinom (Nocito et al. 2001), von HER2-Amplifikationen (Al-Kuraya et al. 2004) Östrogen-, Progesteron- und

p53-Immunhistochemie beim Mammakarzinom (Torhorst et al. 2001) oder die PTEN-Deletion beim Prostatakarzinom (Krohn et al. 2012).

Dass die zwar kleine, aber für alle Tumoren identische untersuchte Gewebemenge nicht nur kein Nachteil, sondern geradezu ein Vorteil sein könnte, ergab sich aus den Daten einer Studie von Torhorst et al., der 2001 mehr als 500 Mammakarzinome an Großschnitten aber auch an 4 verschiedenen TMAs, gebaut aus dem gleichen Block, von dem der Großschnitt untersucht worden war, immunhistochemisch auf Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor und p53 untersuchte (Torhorst et al. 2001). Während die Daten für Progesteronrezeptor und Östrogenrezeptor an TMAs und Großschnitten sich in ihrer Größenordnung nur minimal unterschieden, ergab sich für p53 an den TMAs eine Positivität von zirka 15-20%, während die Positivität an Großschnitten fast doppelt so groß war mit zirka 43% (Torhorst et al. 2001). Wenn von einem Patientenkollektiv keine klinischen Verlaufsdaten vorgelegen hätte, wäre dieser Befund unweigerlich so interpretiert worden, dass ca. die Hälfte der p53 positiven Fälle wegen Tumorheterogenität am TMA verpasst würden (Torhorst et al. 2001). Da aber nur die an TMAs ermittelten, aber nicht die an Großschnitten erzielten p53 Daten mit der Prognose korrelierten, kamen die Autoren zum Schluss, dass an Großschnitten entweder biologisch irrelevante Befunde oder aber Färbeartefakte fälschlicherweise als positiv interpretiert worden waren (Torhorst et al. 2001). Insgesamt spricht alles dafür, dass die TMA-Methode für den Vergleich von unterschiedlichen Tumorkategorien wie beispielsweise unterschiedliche Entitäten oder Tumoren mit unterschiedlichem klinischem Verlauf geradezu optimal geeignet ist.

Angesichts der großen Zahl von in dieser Studie untersuchten Tumoren wurde ein spezielles Augenmerk auf die Etablierung eines angemessenen immunhistochemischen Färbeprotokolls gelegt. Entsprechend der Empfehlungen der International Working Group for Antibody Validation (IWGAV) verglichen wir die an 76 verschiedenen Normalgewebeskategorien erzielten Cytokeratin 10 Färbeergebnisse mit RNA-Expressionsdaten von Normalgeweben (Uhlen et al. 2016), welche aus drei unterschiedlichen öffentlich zugänglichen Datenbanken gewonnen wurden. Die Verwendung von 76 verschiedenen Normalgewebeskategorien für diese Vergleichsuntersuchung verfolgt das Ziel unseren Antikörper eine möglichst breite Palette von Proteinen „vorzulegen“, um mögliche Kreuzreaktionen des Antikörpers zu erkennen. Die von uns verwendete Normalgewebssammlung beinhaltet praktisch alle möglichen Zelltypen eines adulten Menschen, sodass die Wahrscheinlichkeit sehr groß ist, für die diagnostische oder

wissenschaftlichen Aussagen relevanten Kreuzreaktionen an dem Gewebekollektiv zu erkennen. Für die Validität unseres Assays spricht die völlige Limitierung der CK10-Immunfärbung auf die Haut, welches das einzige Organ mit dokumentierter hochgradiger RNA-Expression ist. Die einzige Diskrepanz zu den publizierten RNA-Daten lag darin, dass nachgewiesene RNA-Expressionen in Mamma und Vagina in unserer Untersuchung nicht bestätigt werden konnten. Möglicherweise sind diese RNA-Befunde in der Mamma und der Vagina durch Kontaminationen benachbarter Haut bedingt. Zumindest für die Mamma wird diese Interpretation dadurch unterstützt, dass zumindest zwei der drei Datenbanken die RNA-Expression von CK10 in Brustgewebe nicht bestätigen konnten. Cytokeratin-10-RNA fand sich nämlich für Mamma Gewebe nur im HPA-Datensatz (Karlsson et al. 2021), aber nicht im GTEx- (Lonsdale et al. 2013) oder dem FANTOM5-Datensatz (Lizio et al. 2018; Lizio et al. 2016). Dass eine Cytokeratin 10 Expression immunhistochemisch in verhornenden Plattenepithelien, in Tonsillenkrypten und in Hassall-Körperchen des Thymus nachweisbar war, ist angesichts der Hautbefunde plausibel. Dass in keiner der drei genutzten RNA-Datenbanken zu Normalgewebsebefunden Cytokeratin 10 RNA in Tonsille oder Thymus beschrieben worden ist, dürfte durch den geringen prozentualen Anteil dieser Zelltypen in den genannten Organen bedingt sein. Die Verwendung einer RNA-Mixtur aus allen Zellen dieser Organe dürfte nur so wenig Cytokeratin-10-RNA enthalten, dass diese nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

Die ausgedehnte Untersuchung von Normalgeweben dient nicht nur der Validierung unseres Assays, sondern auch einer Charakterisierung des Expressionsverhaltens von Cytokeratin 10 in Normalgeweben, wobei die praktisch vollständige Limitierung auf keratinisierende Plattenepithelien und die Epidermis einerseits für Cytokeratine nur ein schmales Spektrum von Geweben mit einer physiologischen Bedeutung von Cytokeratin 10 ergibt.

Verschiedene Studien haben auf eine potenzielle Assoziation zwischen der Expression von Cytokeratin 10 in nicht-verhornenden Plattenepithelzellen und der malignen Transformation oder der Entwicklung von Dysplasien hingewiesen. Beispielsweise identifizierten Shirakawa et al. in einer ihrer Untersuchungen eine abnorme Expression von Cytokeratin 10 in 12 von 48 Fällen (Shirakawa et al. 2000), die eine Dysplasie des Ösophagusepithels aufwiesen. Garcia et al. berichteten über eine positive Immunreaktivität für Cytokeratin 10 (CK10) in 25 von 33 Fällen von aktinischer Cheilitis mit Dysplasien (Garcia et al. 2016). In einer separaten Studie

stellten Pendleton et al. fest, dass in 5 von 39 Fällen von dysplastischem Bronchialepithel eine Positivität für CK10 nachweisbar war (Pendleton et al. 1996).

Diese Berichte sind insbesondere auch deswegen plausibel, da eine Verhornung von normalerweise nicht-verhornenden Plattenepithelien (sogenannte Leukoplakien) in der Mundhöhle (Kramer et al. 1978), im oberen Aerodigestivtrakt (van Harten und Brakenhoff 2021), der Harnblase (Khan et al. 2002) und der Speiseröhre (Taggart et al. 2013) als fakultative Präkanzerose gelten. Darüber hinaus gilt im Urothel eine verhornende, nicht aber eine nicht-verhornende Plattenepithelmetaplasie als Risikofaktor für die spätere Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms (Lopez-Beltran et al. 2002).

Unsere erfolgreiche Untersuchung von 9462 Tumoren von 131 Entitäten identifizierte eine Cytokeratin 10 Expression in 41 der analysierten Tumorkategorien und ermöglichte uns die Definition einer Rangliste der untersuchten Tumorkategorien nach ihrer Cytokeratin 10 Positivitätsrate. Die Beobachtung, dass eine Immunfärbung für Cytokeratin 10 vorrangig in verschiedenen Kategorien von Plattenepithelkarzinomen auftritt, spiegelt die Verhältnisse in Normalgeweben wider. Alle 11 analysierten Plattenepithelkarzinom-Typen von verschiedenen Ausgangsorganen fanden sich in den Top 13 Positionen unserer Cytokeratin 10 Rangliste wieder. Interessanterweise blieb der prozentuale Anteil von Cytokeratin 10 positiven Plattenepithelkarzinomen in allen Tumorkategorien unter 67% und die von der Haut- dem einzigen physiologischerweise Cytokeratin 10 positiven Plattenepithel- ausgehenden Plattenepithelkarzinome waren nicht die am häufigsten Cytokeratin positiven Plattenepithelkarzinome. Für beide Befunde scheint die Prädilektion der Cytokeratin 10 Expression mit der unmittelbar mit der Verhornung zusammenhängenden Reifungsstadien der Plattenepithelzellen zusammenzuhängen. Auch in den Plattenepithelkarzinomen der Haut kommt es nicht in allen Fällen zu einer Verhornung. Zudem ist die Verhornung gerade in den weniger gut differenzierten Plattenepithelkarzinomen häufig nur fokal nachweisbar und könnte dementsprechend im TMA-Spots unterrepräsentiert sein.

Auch bei den Cytokeratin positiven Nicht-Plattenepithelkarzinomen dürfte der Nachweis einer Cytokeratin 10 Expression in den meisten Fällen mit einer plattenepithelialen Differenzierung zusammenhängen. Dies gilt beispielsweise für den Warthin Tumor, den am häufigsten Cytokeratin 10 positiven nicht-plattenepithelialen Tumor. Die epitheliale Komponente von Warthin Tumoren besteht aus einem zweireihigen Epithel, welches aus einer inneren

zylinderzelligen eosinophilen oder onkozytischen luminalwärts gerichteten Zellkomponente besteht und von einer basal orientierten Schicht von basalzellartigen Zellen umgeben wird (Kuzenko et al. 2016). Die Verbindung dieser epithelialen Zellen zur Plattenepithel-Differenzierung wird durch das regelmäßige Vorkommen von plattenepithelialen Zellen in Feinnadelaspiraten dieser Tumoren (Köybaşıoğlu et al. 2020) und weiterhin durch die gelegentlich auftretende Entstehung von Plattenepithelmetaplasien (Webb und Eveson 2002), sowie Plattenepithelkarzinomen in besagten Tumoren (Gunduz et al. 1999) unterstrichen. Plattenepitheliale Tumoranteile, häufig auch keratinisierend sind für die meisten der häufiger Cytokeratin 10 positiven Nicht-Plattenepithelkarzinom-Tumorentitäten bekannt. So enthalten Teratome, Pilomatrixome, Basalzellkarzinome der Haut, adenosquamöse Karzinome, Urothelkarzinome und endometrioide Karzinome oft plattenepitheliale Komponenten, die Keratinisierung einschließen können (Boecker et al. 2021; Iwasa et al. 2007; Malpica 2016; Sjö Dahl et al. 2012; Yoshikawa et al. 1998).

Die große Zahl von Tumoren, welche in dieser Studie erfolgreich untersucht werden konnten, erlaubte auch eine Evaluation der klinischen Bedeutung der Cytokeratin 10 Expression in plattenepithelialen und urothelialen Karzinomen. Die signifikante Beziehung zwischen einer nur geringen oder fehlenden Cytokeratin 10 Immunfärbung und einem hohen Malignitätsgrad in einer Sammlung von 906 Plattenepithelkarzinomen von 11 verschiedenen Organen passt zu den Daten mehrerer früherer Studien. Eine signifikante Beziehung zwischen geringer Cytokeratin 10 Expression bzw. geringer oder fehlender Cytokeratin 10 Immunfärbung und ungünstiger Prognose oder mit prognostisch ungünstigen histopathologischen Tumorparametern wurden in früheren Studien in Ösophaguskarzinomen (Ohkawa et al. 2004), Mundhöhlen-Karzinomen (Silveira et al. 2007; Ali et al. 2018; Bloor et al. 2001; Garcia et al. 2016) und Zervix-Karzinomen gefunden (Lindström und Hellberg 2014).

Wu et al. hatten vorgeschlagen, dass der Nachweis einer Cytokeratin 10 Expression in urothelialen Neoplasien als Anhaltspunkt auf eine plattenepitheliale Differenzierung gewertet werden sollte (Wu et al. 1998).

Dieses Konzept wird durch unsere Befunde unterstützt, denn viele unserer Cytokeratin 10 positiven Urothelneoplasien zeigten auch morphologische Hinweise auf eine plattenepitheliale Differenzierung. Auch die wesentlich höhere Rate der Cytokeratin 10 Positivität in invasiven als in nicht-invasiven Urothelneoplasien passt zu dieser Annahme, da

Plattenepithelmetaplasien oder plattenepithel-differenzierte Tumoranteile häufiger in fortgeschrittenen muskelinvasiven Karzinomen als in nicht-invasiven papillären Tumoren auftreten (Lin et al. 2020; Liu et al. 2017; Makise et al. 2015). Eine fokale plattenepitheliale Differenzierung ist bei invasiven Urothelkarzinomen ein häufig anzutreffendes Phänomen. Allerdings divergieren die Angaben zur Häufigkeit erheblich. Studien, in denen muskelinvasive Urothelkarzinome untersucht worden sind, haben eine fokale plattenepitheliale Differenzierung in 6 bis 40 % der Fälle gefunden (Erdemir et al. 2007; Liu et al. 2017; Lobo et al. 2020; Mitra et al. 2014). Verschiedene Studien legen nahe, dass die plattenepitheliale Differenzierung bei Urothelkarzinomen von klinischer Bedeutung ist, da sie möglicherweise mit spezifischen therapeutischen Ansprechmustern und Prognosen assoziiert sein könnte (Liu et al. 2017; Lobo et al. 2020; Erdemir et al. 2007). So haben Logothetis et al. eine signifikante Beziehung zwischen dem Vorhandensein einer plattenepithelialen Differenzierung bei Urothelkarzinomen und einem verminderten Ansprechen auf eine Chemotherapie gefunden (Logothetis et al. 1988; Logothetis et al. 1985). Martin et al. fanden an 46 Tumoren ein vermindertes Ansprechen von teils plattenepithelial differenzierten Urothelkarzinomen auf eine Radiotherapie (Martin et al. 1989).

Die teilweise widersprüchlichen Daten der Literatur zur prognostischen Bedeutung der plattenepithelialen Metaplasien in Urothelkarzinomen (Mitra et al. 2014; Bellmunt et al. 2002; Scosyrev et al. 2011; Vale et al. 1993; Izard et al. 2015; Erdemir et al. 2007; Liu et al. 2017; Lobo et al. 2020; Logothetis et al. 1985; Martin et al. 1989) (Zitate) könnten damit zusammenhängen, dass das Erkennen einer fokalen plattenepithelialen Differenzierung in der technischen Praxis schwierig sein kann (G.Sauter, persönliche Mitteilung). Die Verwendung der Cytokeratin 10 Immunhistochemie könnte möglicherweise dabei helfen eine objektivere Identifikation von plattenepithelialen Differenzierung zu gewährleisten und so dabei helfen, die klinische Bedeutung dieses Phänomens besser einzuschätzen.

Hervorzuheben ist, dass eine fokale plattenepitheliale Differenzierung nicht nur in Urothelkarzinomen, sondern in einer Vielzahl von anderen Tumoren vorkommen kann wie beispielsweise endometroiden Karzinomen, Mammakarzinomen, Adenokarzinomen des Magens oder des Pankreas sowie auch in anderen Tumoren. Für mehrere dieser Tumorarten wurde zumindest in einzelnen Studien eine klinische Bedeutung der plattenepithelialen Differenzierung postuliert. So fanden beispielsweise Yamaguchi & Enjoji eine Beziehung der plattenepithelialen

Differenzierung zu einer schlechteren Überlebensrate beim pankreatischen Adenokarzinom (Yamaguchi und Enjoji 1991).

Eine fokale Plattenepitheldifferenzierung tritt ebenfalls in Adenokarzinomen des Endometriums, der Brust, des Magens und des Pankreas sowie in anderen Tumoren auf (Andrade et al. 2019; Beninato et al. 2018; Ozuner et al. 2015; Raman et al. 2018; Tejera Hernández et al. 2022; Akce et al. 2018). Bei mehreren dieser Tumortypen wurde eine klinische Bedeutung der Plattenepitheldifferenzierung vorgeschlagen. Beispielsweise wurde die Plattenepitheldifferenzierung mit einem früheren Krankheitsrezidiv bei endometrioiden Endometriumkarzinomen (Andrade et al. 2019) in Verbindung gebracht, mit Lymphknotenmetastasen und extranodaler Ausbreitung bei papillären Schilddrüsenkarzinomen (Beninato et al. 2018), mit einem schnelleren Wachstum, axillärer Infiltration, Triple-Negativität und Fernmetastasen bei metastatischen Karzinomen der Brust (Tejera Hernández et al. 2022), einem fortgeschrittenen Stadium und schlechter Prognose bei kolorektalen Adenokarzinomen (Ozuner et al. 2015), vasculärer Invasion bei duktalem Pankreasadenokarzinomen (Raman et al. 2018) und einem reduzierten Gesamtüberleben bei adenosquamosen Magenkarzinomen (Akce et al. 2018).

Allerdings schwankte der Anteil der Tumoren mit identifizierbaren Plattenepithelkarzinomen in den verschiedenen Studien zu diesen Tumorentitäten. Beispielsweise reichte der Prozentsatz der Tumoren mit plattenepithelialer Differenzierung von 6%–40% beim Urothelkarzinom (Erdemir et al. 2007; Liu et al. 2017; Lobo et al. 2020), bei endometrioiden Endometriumkarzinomen reichte es von 13%–50% (Abeler und Kjørstad 1992; Azueta et al. 2010; Zaino und Kurman 1988; Zaino et al. 1991) und bei Basalzellkarzinomen von 5%–18% (Gualdi et al. 2021; Laga et al. 2019).

Auch bei diesen Tumorarten könnte die Anwendung der Cytokeratin 10 Immunhistochemie eine Hilfe zur objektiveren Quantifizierung von plattenepithelial differenzierten Anteilen darstellen und dabei helfen die klinische Relevanz dieses Phänomens besser zu erforschen. Der Nachteil, dass Cytokeratin 10 nur die ausreifenden Anteile der plattenepithelialen Tumorkomponenten erkennt könnte durch die Kombination von Cytokeratin 10 mit anderen Plattenepithel Markern mit bevorzugtem Erkennen von basaloiden Strukturen kompensiert werden.

Zusammengefasst zeigen die Daten unserer Studien, dass Cytokeratin 10 ein nützlicher Marker ist für die Identifikation von ausreifendem, keratinisierendem Plattenepithel. Die Cytokeratin 10 Immunhistochemie könnte deswegen nützlich sein für eine objektive Evaluation der klinischen Bedeutung einer fokalen plattenepithelialen Differenzierung. Darüber hinaus könnte der Nachweis einer Cytokeratin 10 Expression in nicht verhornendem Plattenepithelien ein früher Hinweis auf die beginnende Keratinisierung und damit möglicherweise einen Übergang in eine Präkanzerose anzeigen. Für die Klärung der klinischen Relevanz der Cytokeratin 10 Immunhistochemie erscheinen somit weitere Studien angebracht zu sein.

5. Zusammenfassung

Cytokeratin 10 (CK10) ist ein saures Cytokeratin vom Typ I mit niedrigem Molekulargewicht, das hauptsächlich im keratinisierenden Plattenepithel der Haut vorkommt. Bei Plattenepithelkarzinomen verschiedener Lokalisationen und bei einigen anderen epithelialen Neoplasien wurden unterschiedliche Konzentrationen von CK10 festgestellt. Um die Prävalenz der CK10-Expression in normalem und neoplastischem Gewebe umfassend zu bestimmen, wurde ein Tissue Microarray mit 11 021 Proben von 131 verschiedenen Tumortypen und -subtypen immunhistochemisch analysiert. Eine CK10-Immunfärbung war in 41 von 131 Tumorkategorien nachweisbar, darunter 18 (13,7%) Tumorarten mit mindestens einem stark positiven Fall. Die höchste Rate positiver Färbungen wurde bei Plattenepithelkarzinomen unterschiedlicher Herkunft (positiv in 18,6%-66,1%) und bei Warthin-Tumoren der Speicheldrüsen (47,8 %) festgestellt, gefolgt von verschiedenen Tumorentitäten, von denen bekannt ist, dass sie potenziell Bereiche mit Plattenepithelzelldifferenzierung aufweisen, wie Teratome (33,3 %), Basalzellkarzinome der Haut (14,3 %), adenosquamöse Karzinome des Gebärmutterhalses (11,1 %) und verschiedene Kategorien urothelialer Neoplasien (3,1 %-16,8 %). In einer kombinierten Analyse von 906 Plattenepithelkarzinomen aus 11 verschiedenen Ursprungsorten, wurde eine reduzierte CK10-Färbung mit einem hohen Grad ($p < 0,0001$) und einem fortgeschrittenen pT-Stadium ($p = 0,0015$) beobachtet, diese standen jedoch nicht mit einer HPV-Infektion in Verbindung. Bei 176 Plattenepithelkarzinomen des Gebärmutterhalses stand die CK10-Färbung in keinem statistischen Zusammenhang mit dem Grad ($p = 0,1509$), dem rezidiv freien ($p = 0,5247$) oder dem Gesamtüberleben ($p = 0,5082$). In der Harnblase trat die CK10-Färbung häufiger bei muskelinvasiven Urothelkarzinomen (17,7%), als bei nicht-invasiven Urothelkarzinomen (4,0%-6,0%; $p < 0,0001$) auf. Zusammenfassend unterstreichen unsere Daten eine Rolle von CK10 als Marker für die reife, keratinisierende Plattenepithelzelldifferenzierung in Epithelgeweben. Die CK10-Immunhistochemie kann daher für eine objektivere Bewertung der klinischen Bedeutung der fokalen Plattenepithelzelldifferenzierung bei Krebs hilfreich sein.

6. English Summary

Cytokeratin 10 (CK10) is a type I acidic low molecular weight cytokeratin which is mainly expressed in keratinizing squamous epithelium of the skin. Variable levels of CK10 protein have been described in squamous carcinomas of different sites and in some other epithelial neoplasms. To comprehensively determine the prevalence of CK10 expression in normal and neoplastic tissues, a tissue microarray containing 11,021 samples from 131 different tumor types and subtypes was analyzed by immunohistochemistry. CK10 immunostaining was detectable in 41 (31.3 %) of 131 tumor categories, including 18 (13.7 %) tumor types with at least one strongly positive case. The highest rate of positive staining was found in squamous cell carcinomas from various sites of origin (positive in 18.6 %–66.1 %) and in Warthin tumors of salivary glands (47.8 %), followed by various tumor entities known to potentially exhibit areas with squamous cell differentiation such as teratomas (33.3 %), basal cell carcinomas of the skin (14.3 %), adenosquamous carcinomas of the cervix (11.1 %), and several categories of urothelial neoplasms (3.1 %–16.8 %). In a combined analysis of 906 squamous cell carcinomas from 11 different sites of origin, reduced CK10 staining was linked to high grade ($p < 0.0001$) and advanced stage ($p = 0.0015$) but unrelated to HPV infection. However, CK10 staining was not statistically related to grade ($p = 0.1509$) and recurrence-free ($p = 0.5247$) or overall survival ($p = 0.5082$) in 176 cervical squamous cell carcinomas. In the urinary bladder, CK10 staining occurred more commonly in muscle-invasive (17.7 %) than in non-invasive urothelial carcinomas (4.0 %–6.0 %; $p < 0.0001$). In summary, our data corroborate a role of CK10 as a suitable marker for mature, keratinizing squamous cell differentiation in epithelial tissues. CK10 immunohistochemistry may thus be instrumental for a more objective evaluation of the clinical significance of focal squamous differentiation in cancer.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung

CK

HPA

HPV

IF

K

KRT

mm

NF

pH

TMA

UKE

Bedeutung

Cytokeratin

Human-Protein-Atlas

Humanes Papillomvirus

Intermediärfilamente

Keratin

Keratin

Millimeter

Neurofilamente

Potential des Wasserstoffs

Tissue-Micro-Array

Universitätsklinikum Eppendorf

8. Literaturverzeichnis

Abeler, Vera M.; Kjørstad, Kjell E. (1992): Endometrial adenocarcinoma with squamous cell differentiation. In: *Cancer* 69 (2), S. 488–495. DOI: 10.1002/1097-0142(19920115)69:2<488::aid-cncr2820690236>3.0.co;2-o.

Akce, Mehmet; Jiang, Renjian; Alese, Olatunji B.; Shaib, Walid L.; Wu, Christina; Behera, Madhusmita; El-Rayes, Bassel F. (2018): Gastric squamous cell carcinoma and gastric adenosquamous carcinoma, clinical features and outcomes of rare clinical entities: a National Cancer Database (NCDB) analysis. In: *Journal of Gastrointestinal Oncology* 10 (1), S. 85–94.

Ali, A. A.; Al-Jandan, B. A.; Suresh, C. S. (2018): The importance of ckeratins in the early detection of oral squamous cell carcinoma. In: *J Oral Maxillofac Pathol* 22 (3), S. 441. DOI: 10.4103/jomfp.JOMFP_238_17.

Al-Kuraya, K., Schraml, P., Torhorst, J., Tapia, C., Zaharieva, B., Novotny, H., Spichtin, H., Maurer, R., Mirlacher, M., Köchli, O., Zuber, M., Dieterich, H., Mross, F., Wilber, K., Simon, R., & Sauter, G. (2004). Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res*, 64(23), 8534-8540. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-04-1945>

Andrade, Diocesio Alves Pinto de; da Silva, Vinicius Duval; Matsushita, Graziela de Macedo; Lima, Marcos Alves de; Vieira, Marcelo de Andrade; Andrade, Carlos Eduardo Mattos Cunha et al. (2019): Squamous differentiation portends poor prognosis in low and intermediate-risk endometrioid endometrial cancer. In: *PloS one* 14 (10), e0220086. DOI: 10.1371/journal.pone.0220086.

Azueta, Ainara; Gatus, Sonia; Matias-Guiu, Xavier (2010): Endometrioid carcinoma of the endometrium: pathologic and molecular features. In: *Seminars in diagnostic pathology* 27 (4), S. 226–240. DOI: 10.1053/j.semdp.2010.09.001.

Bellmunt, Joaquim; Albanell, Joan; Paz-Ares, Luis; Climent, Miguel A.; González-Larriba, Jose L.; Carles, Joan et al. (2002): Pretreatment prognostic factors for survival in patients with advanced urothelial tumors treated in a phase I/II trial with paclitaxel, cisplatin, and gemcitabine. In: *Cancer* 95 (4), S. 751–757. DOI: 10.1002/cncr.10762.

Beninato, Toni; Kluijfhout, Wouter P.; Drake, Frederick Thurston; Khanafshar, Elham; Gonnell, Jessica E.; Shen, Wen T. et al. (2018): Squamous differentiation in papillary thyroid carcinoma: a rare feature of aggressive disease. In: *The Journal of surgical research* 223, S. 39–45. DOI: 10.1016/j.jss.2017.10.023.

Bloor, B. K.; Seddon, S. V.; Morgan, P. R. (2001): Gene expression of differentiation-specific keratins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. In: *Oral Oncol* 37 (3), S. 251–261. DOI: 10.1016/s1368-8375(00)00094-4.

Boecker, Werner; Reusch, Michael; Mielke, Volker; Reusch, Ursula; Hallermann, Christian; Loening, Thomas et al. (2021): Twenty-Eight Cases of Extraocular Sebaceous Carcinoma: A Correlative Clinicopathological and Immunohistochemical Analysis of Extraocular Sebaceous Carcinomas and Benign Sebaceous Gland Tumors. In: *The American Journal of dermatopathology* 43 (2), S. 93–102. DOI: 10.1097/DAD.0000000000001667.

Briot, J.; Simon, M.; Méchin, M. C. (2020): Deimination, Intermediate Filaments and Associated Proteins. In: *Int J Mol Sci* 21 (22). DOI: 10.3390/ijms21228746.

Cheng, J.; Syder, A. J.; Yu, Q. C.; Letai, A.; Paller, A. S.; Fuchs, E. (1992): The genetic basis of epidermolytic hyperkeratosis: a disorder of differentiation-specific epidermal keratin genes. In: *Cell* 70 (5), S. 811–819. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90314-3.

Chipev, C. C.; Yang, J. M.; DiGiovanna, J. J.; Steinert, P. M.; Marekov, L.; Compton, J. G.; Bale, S. J. (1994): Preferential sites in keratin 10 that are mutated in epidermolytic hyperkeratosis. In: *Am J Hum Genet* 54 (2), S. 179–190.

Choate, K. A.; Lu, Y.; Zhou, J.; Choi, M.; Elias, P. M.; Farhi, A. et al. (2010): Mitotic recombination in patients with ichthyosis causes reversion of dominant mutations in KRT10. In: *Science* 330 (6000), S. 94–97. DOI: 10.1126/science.1192280.

Chu, P. G.; Weiss, L. M. (2002): Keratin expression in human tissues and neoplasms. In: *Histopathology* 40 (5), S. 403–439. DOI: 10.1046/j.1365-2559.2002.01387.x.

Coulombe, P. A.; Omary, M. B. (2002): 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. In: *Curr Opin Cell Biol* 14 (1), S. 110–122. DOI: 10.1016/s0955-0674(01)00301-5.

Covaciu, C.; Castori, M.; Luca, N. de; Ghirri, P.; Nannipieri, A.; Ragone, G. et al. (2010): Lethal autosomal recessive epidermolytic ichthyosis due to a novel donor splice-site mutation in KRT10. In: *Br J Dermatol* 162 (6), S. 1384–1387. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2010.09665.x.

DiVito, Kyle A.; Charette, Lori A.; Rimm, David L.; Camp, Robert L. (2004): Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 84 (8), S. 1071–1078. DOI: 10.1038/labinvest.3700131.

Erdemir, Fikret; Tunc, Murat; Ozcan, Faruk; Parlaktas, Bekir S.; Uluocak, Nihat; Kilicaslan, Isin; Gokce, Ozgur (2007): The effect of squamous and/or glandular differentiation on recurrence, progression and survival in urothelial carcinoma of bladder. In: *Int Urol Nephrol* 39 (3), S. 803–807. DOI: 10.1007/s11255-006-9151-0.

Etienne-Manneville, S. (2018): Cytoplasmic Intermediate Filaments in Cell Biology. In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 34, S. 1–28. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100617-062534.

Fischer, R. S.; Fowler, V. M. (2015): Thematic Minireview Series: The State of the Cytoskeleton in 2015. In: *J Biol Chem* 290 (28), S. 17133–17136. DOI: 10.1074/jbc.R115.663716.

Fisseler-Eckhoff, A.; Erfkamp, S.; Müller, K. M. (1996): Cytokeratin expression in preneoplastic lesions and early squamous cell carcinoma of the bronchi. In: *Pathol Res Pract* 192 (6), S. 552–559. DOI: 10.1016/s0344-0338(96)80105-1.

Fletcher, D. A.; Mullins, R. D. (2010): Cell mechanics and the cytoskeleton. In: *Nature* 463 (7280), S. 485–492. DOI: 10.1038/nature08908.

Fuchs, E.; Esteves, R. A.; Coulombe, P. A. (1992): Transgenic mice expressing a mutant keratin 10 gene reveal the likely genetic basis for epidermolytic hyperkeratosis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (15), S. 6906–6910. DOI: 10.1073/pnas.89.15.6906.

Fuchs, E.; Weber, K. (1994): Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. In: *Annu Rev Biochem* 63, S. 345–382. DOI: 10.1146/annurev.bi.63.070194.002021.

Garcia, N. G.; Oliveira, D. T.; Lauris, J. R.; Domingues, M. A.; Minicucci, E. M.; Soares, C. T. (2016): Loss of cytokeratin 10 indicates malignant transformation in actinic cheilitis. In: *Clin Oral Investig* 20 (4), S. 745–752. DOI: 10.1007/s00784-015-1557-6.

Godsel, L. M.; Hobbs, R. P.; Green, K. J. (2008): Intermediate filament assembly: dynamics to disease. In: *Trends Cell Biol* 18 (1), S. 28–37. DOI: 10.1016/j.tcb.2007.11.004.

Gu, L. H.; Coulombe, P. A. (2007): Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. In: *Curr Opin Cell Biol* 19 (1), S. 13–23. DOI: 10.1016/j.ceb.2006.12.007.

Gualdi, Giulio; Soglia, Simone; Fusano, Marta; Monari, Paola; Giuliani, Federica; Porreca, Annamaria et al. (2021): Characterization of Basosquamous Cell Carcinoma: A Distinct Type of Keratinizing Tumour. In: *Acta dermato-venereologica* 101 (1), adv00353. DOI: 10.2340/00015555-3710.

Gunduz, M.; Yamanaka, N.; Hotomi, M.; Kuki, K.; Yokoyama, M.; Nakamine, H. (1999): Squamous cell carcinoma arising in a Warthin's tumor. In: *Auris Nasus Larynx* 26 (3), S. 355–360. DOI: 10.1016/s0385-8146(99)00008-5.

Hantschke, Markus; Palmedo, Gabriele (2015): Immunhistologische Techniken. In: Lorenzo Cerroni, Claus Garbe, Dieter Metze, Heinz Kutzner und Helmut Kerl (Hg.): *Histopathologie der Haut*. Living Reference Work, Continuously updated edition. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer Reference Medizin), S. 1–28.

Helander, K. G. (1994): Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. In: *Biotech Histochem* 69 (3), S. 177–179. DOI: 10.3109/10520299409106282.

Herrmann, H.; Hesse, M.; Reichenzeller, M.; Aebi, U.; Magin, T. M. (2003): Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. In: *Int Rev Cytol* 223, S. 83–175. DOI: 10.1016/s0074-7696(05)23003-6.

Horn, Florian (Hg.) (2020): *Biochemie des Menschen*. 8., überarbeitete und erweiterte Auflage: Georg Thieme Verlag.

Immunhistochemie (2024). Online verfügbar unter <https://pathologie.umg.eu/patienten/medizinische-versorgung/immunhistochemie/>, zuletzt aktualisiert am 06.03.2024, zuletzt geprüft am 06.03.2024.

Iwasa, A.; Oda, Y.; Kaneki, E.; Ohishi, Y.; Kurihara, S.; Yamada, T. et al. (2007): Squamous cell carcinoma arising in mature cystic teratoma of the ovary: an immunohistochemical analysis of its tumorigenesis. In: *Histopathology* 51 (1), S. 98–104. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2007.02727.x.

Izard, Jason P.; Siemens, D. Robert; Mackillop, William J.; Wei, Xuejiao; Leveridge, Michael J.; Berman, David M. et al. (2015): Outcomes of squamous histology in bladder cancer: a

population-based study. In: *Urologic oncology* 33 (10), 425.e7-13. DOI: 10.1016/j.urolonc.2015.06.011.

Jacobs, T. W.; Prioleau, J. E.; Stillman, I. E.; Schnitt, S. J. (1996): Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. In: *Journal of the National Cancer Institute* 88 (15), S. 1054–1059. DOI: 10.1093/jnci/88.15.1054.

Jacques, C.; Aquino, A. M. de; Ramos-e-Silva, M. (2005): Cytokeratins and dermatology. In: *Skinmed* 4 (6), 354-60; quiz 360-1. DOI: 10.1111/j.1540-9740.2005.03810.x.

Jacques, C. M.; Pereira, A. L.; Maia, V.; Cuzzi, T.; Ramos-e-Silva, M. (2009): Expression of cytokeratins 10, 13, 14 and 19 in oral lichen planus. In: *J Oral Sci* 51 (3), S. 355–365. DOI: 10.2334/josnusd.51.355.

Jensen, J. M.; Pfeiffer, S.; Akaki, T.; Schroder, J. M.; Kleine, M.; Neumann, C. et al. (2007): Barrier function, epidermal differentiation, and human beta-defensin 2 expression in tinea corporis. In: *J Invest Dermatol* 127 (7), S. 1720–1727. DOI: 10.1038/sj.jid.5700788.

Karlsson, Max; Zhang, Cheng; Méar, Loren; Zhong, Wen; Digre, Andreas; Katona, Borbala et al. (2021): A single-cell type transcriptomics map of human tissues. In: *Science Advances* 7 (31), eabh2169. DOI: 10.1126/sciadv.abh2169.

Khan, M. S.; Thornhill, J. A.; Gaffney, E.; Loftus, B.; Butler, M. R. (2002): Keratinising squamous metaplasia of the bladder: natural history and rationalization of management based on review of 54 years experience. In: *Eur Urol* 42 (5), S. 469–474. DOI: 10.1016/s0302-2838(02)00358-5.

Kim, J.; Villadsen, R. (2020): The Expression Pattern of Epidermal Differentiation Marker Keratin 10 in the Normal Human Breast and Breast Cancer Cells. In: *J Histochem Cytochem* 68 (8), S. 561–570. DOI: 10.1369/0022155420940220.

Koch, P. J.; Roop, D. R. (2004): The role of keratins in epidermal development and homeostasis--going beyond the obvious. In: *J Invest Dermatol* 123 (5), S. x–xi. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2004.23495.x.

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

- Korge, B. P.; Gan, S. Q.; McBride, O. W.; Mischke, D.; Steinert, P. M. (1992): Extensive size polymorphism of the human keratin 10 chain resides in the C-terminal V2 subdomain due to variable numbers and sizes of glycine loops. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (3), S. 910–914. DOI: 10.1073/pnas.89.3.910.
- Körver, J. E.; van Duijnhoven, M. W.; Pasch, M. C.; van Erp, P. E.; van de Kerkhof, P. C. (2006): Assessment of epidermal subpopulations and proliferation in healthy skin, symptomless and lesional skin of spreading psoriasis. In: *Br J Dermatol* 155 (4), S. 688–694. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2006.07403.x.
- Köybaşıoğlu, F. F.; Önal, B.; Han, Ü.; Adabağ, A.; Şahpaz, A. (2020): Cytomorphological findings in diagnosis of Warthin tumor. In: *Turk J Med Sci* 50 (1), S. 148–154. DOI: 10.3906/sag-1901-215.
- Kramer, I. R.; Lucas, R. B.; Pindborg, J. J.; Sobin, L. H. (1978): Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. In: *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 46 (4), S. 518–539.
- Krohn, Antje; Diedler, Tobias; Burkhardt, Lia; Mayer, Pascale-Sophie; Silva, Colin de; Meyer-Kornblum, Marie et al. (2012): Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. In: *The American journal of pathology* 181 (2), S. 401–412. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.04.026.
- Kurokawa, I.; Takahashi, K.; Moll, I.; Moll, R. (2011): Expression of keratins in cutaneous epithelial tumors and related disorders--distribution and clinical significance. In: *Exp Dermatol* 20 (3), S. 217–228. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2009.01006.x.
- Kuzenko, Y. V.; Romanuk, A. M.; Dyachenko, O. O.; Hudymenko, O. (2016): Pathogenesis of Warthin's tumors. In: *Interv Med Appl Sci* 8 (2), S. 41–48. DOI: 10.1556/1646.8.2016.2.2.
- Laga, Alvaro C.; Schaefer, Inga Marie; Sholl, Lynette M.; French, Christopher A.; Hanna, John (2019): Metastatic Basal Cell Carcinoma. In: *American journal of clinical pathology* 152 (6), S. 706–717. DOI: 10.1093/ajcp/aqz089.
- Lam, K. Y.; Loke, S. L.; Shen, X. C.; Ma, L. T. (1995): Cytokeratin expression in non-neoplastic oesophageal epithelium and squamous cell carcinoma of the oesophagus. In: *Virchows Arch* 426 (4), S. 345–349. DOI: 10.1007/bf00191342.

- Leduc, C.; Etienne-Manneville, S. (2015): Intermediate filaments in cell migration and invasion: the unusual suspects. In: *Curr Opin Cell Biol* 32, S. 102–112. DOI: 10.1016/j.ceb.2015.01.005.
- Lim, Y. H.; Qiu, J.; Saraceni, C.; Burrall, B. A.; Choate, K. A. (2016): Genetic Reversion via Mitotic Recombination in Ichthyosis with Confetti due to a KRT10 Polyalanine Frameshift Mutation. In: *J Invest Dermatol* 136 (8), S. 1725–1728. DOI: 10.1016/j.jid.2016.04.023.
- Lin, X.; Deng, T.; Wu, S.; Lin, S. X.; Wang, D.; Wu, C. L. (2020): The clinicopathological characteristics and prognostic value of squamous differentiation in patients with bladder urothelial carcinoma: a meta-analysis. In: *World J Urol* 38 (2), S. 323–333. DOI: 10.1007/s00345-019-02771-1.
- Lindström, A. K.; Hellberg, D. (2014): Immunohistochemical LRIG3 expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell cervical cancer: association with expression of tumor markers, hormones, high-risk HPV-infection, smoking and patient outcome. In: *Eur J Histochem* 58 (2), S. 2227. DOI: 10.4081/ejh.2014.2227.
- Liu, Y.; Bui, M. M.; Xu, B. (2017): Urothelial Carcinoma With Squamous Differentiation Is Associated With High Tumor Stage and Pelvic Lymph-Node Metastasis. In: *Cancer Control* 24 (1), S. 78–82. DOI: 10.1177/107327481702400113.
- Lizio, Marina; Abugessaisa, Imad; Noguchi, Shuhei; Kondo, Atsushi; Hasegawa, Akira; Hon, Chung Chau et al. (2018): Update of the FANTOM web resource: expansion to provide additional transcriptome atlases. In: *Nucleic Acids Research* 47 (D1), D752-D758. DOI: 10.1093/nar/gky1099.
- Lizio, Marina; Harshbarger, Jayson; Abugessaisa, Imad; Noguchi, Shuei; Kondo, Atsushi; Severin, Jessica et al. (2016): Update of the FANTOM web resource: high resolution transcriptome of diverse cell types in mammals. In: *Nucleic Acids Research* 45 (D1), D737-D743. DOI: 10.1093/nar/gkw995.
- Lobo, N.; Shariat, S. F.; Guo, C. C.; Fernandez, M. I.; Kassouf, W.; Choudhury, A. et al. (2020): What Is the Significance of Variant Histology in Urothelial Carcinoma? In: *Eur Urol Focus* 6 (4), S. 653–663. DOI: 10.1016/j.euf.2019.09.003.
- Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie (2014). 9., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer (SpringerLink : Bücher).

Logothetis, C. J.; Johnson, D. E.; Chong, C.; Dexeus, F. H.; Sella, A.; Ogden, S. et al. (1988): Adjuvant cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin chemotherapy for bladder cancer: an update. In: *J Clin Oncol* 6 (10), S. 1590–1596. DOI: 10.1200/jco.1988.6.10.1590.

Logothetis, C. J.; Samuels, M. L.; Ogden, S.; Dexeus, F. H.; Swanson, D.; Johnson, D. E.; Eschenbach, A. von (1985): Cyclophosphamide, doxorubicin and cisplatin chemotherapy for patients with locally advanced urothelial tumors with or without nodal metastases. In: *J Urol* 134 (3), S. 460–464. DOI: 10.1016/s0022-5347(17)47240-5.

Lonsdale, John; Thomas, Jeffrey; Salvatore, Mike; Phillips, Rebecca; Lo, Edmund; Shad, Saboor et al. (2013): The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. In: *Nature Genetics* 45 (6), S. 580–585. DOI: 10.1038/ng.2653.

Lopez-Beltran, A.; Cheng, L.; Andersson, L.; Brausi, M.; Matteis, A. de; Montironi, R. et al. (2002): Preneoplastic non-papillary lesions and conditions of the urinary bladder: an update based on the Ancona International Consultation. In: *Virchows Arch* 440 (1), S. 3–11. DOI: 10.1007/s00428-001-0577-6.

Magin, T. M.; Vijayaraj, P.; Leube, R. E. (2007): Structural and regulatory functions of keratins. In: *Exp Cell Res* 313 (10), S. 2021–2032. DOI: 10.1016/j.yexcr.2007.03.005.

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. In: *Int J Clin Exp Pathol* 8 (6), S. 7203–7209.

Malpica, Anais (2016): How to approach the many faces of endometrioid carcinoma. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 29 Suppl 1, S29-44. DOI: 10.1038/modpathol.2015.142.

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. In: *J Clin Pathol* 42 (3), S. 250–253. DOI: 10.1136/jcp.42.3.250.

Mirlacher, Martina; Kasper, Marlis; Storz, Martina; Knecht, Yvonne; Dürmüller, Ursula; Simon, Ronald et al. (2004): Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 17 (11), S. 1414–1420. DOI: 10.1038/modpathol.3800208.

- Mitra, A. P.; Bartsch, C. C.; Bartsch, G., Jr.; Miranda, G.; Skinner, E. C.; Daneshmand, S. (2014): Does presence of squamous and glandular differentiation in urothelial carcinoma of the bladder at cystectomy portend poor prognosis? An intensive case-control analysis. In: *Urol Oncol* 32 (2), S. 117–127. DOI: 10.1016/j.urolonc.2012.08.017.
- Moll, I. (2016): Duale Reihe Dermatologie. In: Ingrid Moll (Hg.): Duale Reihe Dermatologie. 8. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, zuletzt geprüft am 12.10.2022.
- Moll, R.; Divo, M.; Langbein, L. (2008): The human keratins: biology and pathology. In: *Histochem Cell Biol* 129 (6), S. 705–733. DOI: 10.1007/s00418-008-0435-6.
- Moll, R.; Franke, W. W.; Schiller, D. L.; Geiger, B.; Krepler, R. (1982a): The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. In: *Cell* 31 (1), S. 11–24. DOI: 10.1016/0092-8674(82)90400-7.
- Moll, Roland; Krepler, Reinhard; Franke, Werner W. (1982b): Complex Cytokeratin Polypeptide Patterns Observed in Certain Human Carcinomas. In: *Differentiation* 23 (1), S. 256–269. DOI: 10.1111/j.1432-0436.1982.tb01291.x.
- Müller, F. B.; Huber, M.; Kinaciyan, T.; Hausser, I.; Schaffrath, C.; Krieg, T. et al. (2006): A human keratin 10 knockout causes recessive epidermolytic hyperkeratosis. In: *Hum Mol Genet* 15 (7), S. 1133–1141. DOI: 10.1093/hmg/ddl028.
- Nath, Isabelle; Horn, Florian (2020): Intermediärfilamente. In: Florian Horn (Hg.): Biochemie des Menschen. 8., überarbeitete und erweiterte Auflage: Georg Thieme Verlag, S. 559–564, zuletzt geprüft am 23.05.2022.
- Nocito, Antonio; Bubendorf, Lukas; Tinner, Eva Maria; Süess, Katrin; Wagner, Urs; Forster, Thomas et al. (2001): Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. In: *J. Pathol.* 194 (3), S. 349–357. DOI: 10.1002/1096-9896(200107)194:3<349::AID-PATH887>3.0.CO;2-D.
- Ohkawa, T.; Naomoto, Y.; Takaoka, M.; Nobuhisa, T.; Noma, K.; Motoki, T. et al. (2004): Localization of heparanase in esophageal cancer cells: respective roles in prognosis and differentiation. In: *Lab Invest* 84 (10), S. 1289–1304. DOI: 10.1038/labinvest.3700159.

Oji, Vinzenz (2017): Ichthyosen. In: Gerd Plewig, Thomas Ruzicka, Roland Kaufmann und Michael Hertl (Hg.): Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 1–27.

Omary, M. B.; Coulombe, P. A.; McLean, W. H. (2004): Intermediate filament proteins and their associated diseases. In: *N Engl J Med* 351 (20), S. 2087–2100. DOI: 10.1056/NEJMra040319.

Ozuner, G.; Aytac, E.; Gorgun, E.; Bennett, A. (2015): Colorectal squamous cell carcinoma: a rare tumor with poor prognosis. In: *Int J Colorectal Dis* 30 (1), S. 127–130. DOI: 10.1007/s00384-014-2058-9.

Park, J. M.; Jung, C. K.; Choi, Y. J.; Lee, K. Y.; Kang, J. H.; Kim, M. S.; Hu, H. J. (2010): The use of an immunohistochemical diagnostic panel to determine the primary site of cervical lymph node metastases of occult squamous cell carcinoma. In: *Hum Pathol* 41 (3), S. 431–437. DOI: 10.1016/j.humpath.2009.09.001.

Pendleton, N.; Dixon, G. R.; Green, J. A.; Myskow, M. W. (1996): Expression of markers of differentiation in normal bronchial epithelium and bronchial dysplasia. In: *J Pathol* 178 (2), S. 146–150. DOI: 10.1002/(sici)1096-9896(199602)178:2<146::Aid-path431>3.0.Co;2-n.

Poeggel, Gerd (2013): Intermediärfilamente. In: Gerd Poeggel (Hg.): Kurzlehrbuch Biologie. 3. überarbeitete Auflage: Georg Thieme Verlag, zuletzt geprüft am 27.05.2022.

Raman, Pichai; Maddipati, Ravikanth; Lim, Kian Huat; Tozeren, Aydin (2018): Pancreatic cancer survival analysis defines a signature that predicts outcome. In: *PloS one* 13 (8), e0201751. DOI: 10.1371/journal.pone.0201751.

Reichelt, J.; Furstenberger, G.; Magin, T. M. (2004): Loss of keratin 10 leads to mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation, increased keratinocyte turnover, and decreased tumor formation in mice. In: *J Invest Dermatol* 123 (5), S. 973–981. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2004.23426.x.

Renz, P.; Imahorn, E.; Spoerri, I.; Aushev, M.; March, O. P.; Wariwoda, H. et al. (2019): Arginine- but not alanine-rich carboxy-termini trigger nuclear translocation of mutant keratin 10 in ichthyosis with confetti. In: *J Cell Mol Med* 23 (12), S. 8442–8452. DOI: 10.1111/jcmm.14727.

Robert, A.; Hookway, C.; Gelfand, V. I. (2016): Intermediate filament dynamics: What we can see now and why it matters. In: *Bioessays* 38 (3), S. 232–243. DOI: 10.1002/bies.201500142.

Rothnagel, J. A.; Dominey, A. M.; Dempsey, L. D.; Longley, M. A.; Greenhalgh, D. A.; Gagne, T. A. et al. (1992): Mutations in the rod domains of keratins 1 and 10 in epidermolytic hyperkeratosis. In: *Science* 257 (5073), S. 1128–1130. DOI: 10.1126/science.257.5073.1128.

Sakr, S. A.; Abdel-Wahed, M. M.; El-Sahra, D. G. (2014): Immunohistochemical differential diagnosis between urothelial carcinoma and prostate adenocarcinoma among Egyptian patients. In: *Biomed Pharmacother* 68 (6), S. 685–692. DOI: 10.1016/j.biopha.2014.08.003.

Santos, M.; Paramio, J. M.; Bravo, A.; Ramirez, A.; Jorcano, J. L. (2002): The expression of keratin k10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis. In: *J Biol Chem* 277 (21), S. 19122–19130. DOI: 10.1074/jbc.M201001200.

Sauter, G.; Simon, R.; Hillan, K. (2003): Tissue microarrays in drug discovery. In: *Nat Rev Drug Discov* 2 (12), S. 962–972. DOI: 10.1038/nrd1254.

Sauter, Guido (2010): Representativity of TMA studies. In: *Tissue Microarrays* 664, S. 27–35. DOI: 10.1007/978-1-60761-806-5_3.

Schweizer, J.; Bowden, P. E.; Coulombe, P. A.; Langbein, L.; Lane, E. B.; Magin, T. M. et al. (2006): New consensus nomenclature for mammalian keratins. In: *J Cell Biol* 174 (2), S. 169–174. DOI: 10.1083/jcb.200603161.

Scosyrev, Emil; Ely, Benjamin W.; Messing, Edward M.; Speights, V. O.; Grossman, H. Barton; Wood, David P. et al. (2011): Do mixed histological features affect survival benefit from neoadjuvant platinum-based combination chemotherapy in patients with locally advanced bladder cancer? A secondary analysis of Southwest Oncology Group-Directed Intergroup Study (S8710). In: *BJU international* 108 (5), S. 693–699. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2010.09900.x.

Shirakawa, Yasuhiro; Naomoto, Yoshio; Kimura, Masashi; Kawashima, Ryuichi; Yamatsuji, Tomoki; Tamaki, Takahiko et al. (2000): Topological Analysis of p21WAF1/CIP1 Expression in Esophageal Squamous Dysplasia. In: *Clin Cancer Res* 6 (2), S. 541–550.

Silveira, E. J.; Godoy, G. P.; Lins, R. D.; Arruda Mde, L.; Ramos, C. C.; Freitas Rde, A.; Queiroz, L. M. (2007): Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. In: *Int J Surg Pathol* 15 (4), S. 376–383. DOI: 10.1177/1066896907304992.

Simon, Ronald; Mirlacher, Martina; Sauter, Guido (2004): Tissue microarrays. In: *BioTechniques* 36 (1), S. 98–105. DOI: 10.2144/04361RV01.

Sjödahl, Gottfrid; Lauss, Martin; Lövgren, Kristina; Chebil, Gunilla; Gudjonsson, Sigurdur; Veerla, Srinivas et al. (2012): A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18 (12), S. 3377–3386. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0077-T.

Spoerri, I.; Brena, M.; Mesmaeker, J. de; Schlipf, N.; Fischer, J.; Tadini, G. et al. (2015): The phenotypic and genotypic spectra of ichthyosis with confetti plus novel genetic variation in the 3' end of KRT10: from disease to a syndrome. In: *JAMA Dermatol* 151 (1), S. 64–69. DOI: 10.1001/jamadermatol.2014.2526.

Szeverenyi, I.; Cassidy, A. J.; Chung, C. W.; Lee, B. T.; Common, J. E.; Ogg, S. C. et al. (2008): The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. In: *Hum Mutat* 29 (3), S. 351–360. DOI: 10.1002/humu.20652.

Taggart, M. W.; Rashid, A.; Ross, W. A.; Abraham, S. C. (2013): Oesophageal hyperkeratosis: clinicopathological associations. In: *Histopathology* 63 (4), S. 463–473. DOI: 10.1111/his.12195.

Tejera Hernández, Ana Alicia; Vega Benítez, Víctor Manuel; Pavcovich Ruiz, Marta; Hernández Hernández, Juan Ramón (2022): Metaplastic carcinoma of the breast with squamous differentiation: prognostic factors and multidisciplinary treatment. In: *World journal of surgical oncology* 20 (1), S. 187. DOI: 10.1186/s12957-022-02656-5.

Terheyden, P.; Grimberg, G.; Hausser, I.; Rose, C.; Korge, B. P.; Krieg, T.; Arin, M. J. (2009): Recessive epidermolytic hyperkeratosis caused by a previously unreported termination codon mutation in the keratin 10 gene. In: *J Invest Dermatol* 129 (11), S. 2721–2723. DOI: 10.1038/jid.2009.131.

Tissue expression of KRT10 - Summary - The Human Protein Atlas (2024). Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000186395-KRT10/tissue>, zuletzt aktualisiert am 03.03.2024, zuletzt geprüft am 03.03.2024.

Torhorst, J.; Bucher, C.; Kononen, J.; Haas, P.; Zuber, M.; Köchli, O. R. et al. (2001): Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. In: *Am J Pathol* 159 (6), S. 2249–2256. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)63075-1.

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

Ulfig, Norbert (2019): Die Intermediärfilamente. In: Norbert Ulfig (Hg.): *Kurzlehrbuch Histologie*. 5., unveränderte Auflage: Georg Thieme Verlag, S. 30–32, zuletzt geprüft am 23.05.2022.

Vale, J. A.; A'Hern, R. P.; Liu, K.; Hendry, W. F.; Whitfield, H. N.; Plowman, P. N. et al. (1993): Predicting the outcome of radical radiotherapy for invasive bladder cancer. In: *European urology* 24 (1), S. 48–51. DOI: 10.1159/000474261.

Vallmanya Llena, F. R.; Laborda Rodríguez, A.; Lloreta Trull, J.; Cortadellas Angel, R.; Placer Santos, J.; Mas Gelabert, A. (2006): Expresión inmunohistoquímica de p53, p21, p16 y ciclina D1 en el cáncer de vejiga superficial. Estudio en un soporte de tissue microarray. In: *Actas urológicas españolas* 30 (8), S. 754–762. DOI: 10.1016/s0210-4806(06)73532-x.

van Harten, A. M.; Brakenhoff, R. H. (2021): Targeted Treatment of Head and Neck (Pre)Cancer: Preclinical Target Identification and Development of Novel Therapeutic Applications. In: *Cancers (Basel)* 13 (11). DOI: 10.3390/cancers13112774.

Webb, A. J.; Eveson, J. W. (2002): Parotid Warthin's tumour Bristol Royal Infirmary (1985-1995): a study of histopathology in 33 cases. In: *Oral Oncol* 38 (2), S. 163–171. DOI: 10.1016/s1368-8375(01)00040-9.

Werner, M.; Chott, A.; Fabiano, A.; Battifora, H. (2000): Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. In: *Am J Surg Pathol* 24 (7), S. 1016–1019. DOI: 10.1097/00000478-200007000-00014.

Wu, R. L.; Osman, I.; Wu, X. R.; Lu, M. L.; Zhang, Z. F.; Liang, F. X. et al. (1998): Uroplakin II gene is expressed in transitional cell carcinoma but not in bilharzial bladder squamous cell carcinoma: alternative pathways of bladder epithelial differentiation and tumor formation. In: *Cancer Res* 58 (6), S. 1291–1297.

Yamaguchi, K.; Enjoji, M. (1991): Adenosquamous carcinoma of the pancreas: a clinicopathologic study. In: *Journal of surgical oncology* 47 (2), S. 109–116. DOI: 10.1002/jso.2930470210.

Yang, X. R.; Xu, Y.; Shi, G. M.; Fan, J.; Zhou, J.; Ji, Y. et al. (2008): Cytokeratin 10 and cytokeratin 19: predictive markers for poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients after curative resection. In: *Clin Cancer Res* 14 (12), S. 3850–3859. DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-07-4338.

Yoshikawa, K.; Katagata, Y.; Kondo, S. (1998): Biochemical and immunohistochemical analyses of keratin expression in basal cell carcinoma. In: *J Dermatol Sci* 17 (1), S. 15–23. DOI: 10.1016/s0923-1811(97)00065-0.

Yu, Y. Bruce (2002): Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (8), S. 1113–1129. DOI: 10.1016/S0169-409X(02)00058-3.

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. In: *Cancer* 68 (10), S. 2293–2302. DOI: 10.1002/1097-0142(19911115)68:10<2293::aid-cnrcr2820681032>3.0.co;2-v.

Zaino, R. J.; Kurman, R. J. (1988): Squamous differentiation in carcinoma of the endometrium: a critical appraisal of adenoacanthoma and adenosquamous carcinoma. In: *Seminars in diagnostic pathology* 5 (2), S. 154–171.

Zhou, X.; Li, G.; Wang, D.; Sun, X.; Li, X. (2019): Cytokeratin expression in epidermal stem cells in skin adnexal tumors. In: *Oncol Lett* 17 (1), S. 927–932. DOI: 10.3892/ol.2018.9679.

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Hauptkomponenten des Zytoskeletts. Quelle der Abbildung: (Horn 2020).	5
Abbildung 2: Aufbau von Intermediärfilamenten. Quelle der Abbildung: (Poeggel 2013). 6
Abbildung 3: Organisation der menschlichen Keratin-Gene im Genom. (Moll et al. 2008) 8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der typischen dreiteiligen Domänenstruktur von Typ-I und Typ-II Keratinen. Zentral eine α -helikale Stabdomäne, welche flankiert wird von einer nicht helikalen Schwanz- und Kopfdomäne an den C- und N-termini (1a, 1b, 2a, 2b helicale Abschnitte; L1, L1–2, L2 nicht-helicale Abschnitte, parallele Anordnung zum Heterodimer, anti-parallele Anordnung zum Protofilament. Supramolekulare Assoziation zur Protofibrille und zum Intermediärfilament). Quelle: Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie 2014 9
Abbildung 5: RNA-Expression in Normalgeweben. Quelle: (Tissue expression of KRT10 - Summary - The Human Protein Atlas 2024) 13
Abbildung 6: Prinzip der TMAs. A: Von einem Empfängerblock wird eine Probe entnommen. b: Probe(-n) wird in einen Spenderblock implantiert Dieser Spenderblock wird der sogenannte TMA-Block. c: Vom TMA-Block werden mithilfe eines Mikrotoms TMA-Schnitte angefertigt. d: TMA-Schnitte werden dann gefärbt und eingedeckt. Quelle der Abbildung: Sauter et al. 2003 16
Abbildung 7: Standardaufbau eines UKE-TMAs 18
Abbildung 8: Übersichtsaufnahme vom Arrayergerät. Gelber Pfeil: Arrayergerät mit Umschaltvorrichtung. Roter Pfeil: Elektrischer Schrittmotor. Grüner Pfeil: Mehrfachblockhalter 19
Abbildung 9: Mehrfachblockhalter mit 6 Empfänger-TMA-Blöcken. 20
Abbildung 10: Bohrer, mit dem ein Loch in den Empfängerblock gebohrt wird. 21
Abbildung 11: Entnahme von Gewebe aus dem Spenderblock. Dieser befindet sich auf einem Minipodest, der die Empfängerblöcke abdeckt. 21
Abbildung 12: Gewebeprobe wird im Empfängerblock deponiert. 22
Abbildung 13: Prinzip der Immunhistochemie: Primärantikörper bindet das Antigen auf dem Schnitt. Der FC-Teil vom Primärantikörper wird von einem dahintergeschalteten Detektionssystem erkannt, welches das Signal visualisiert und ggf. verstärkt. Quelle der Abbildung: (Immunhistochemie 2024) 27

Abbildung 14: Ausschnitt eines TMA-Schnittsektors: Pfeil zeigt einen fehlenden Gewebespot.	31
Abbildung 15: Starke CK-10-Anfärbung von suprabasalen Plattenepithelzellen der Haut	33
Abbildung 16: Starke CK-10-Anfärbung von Haarfollikeln und Talgdrüsen.....	33
Abbildung 17: Mäßig starke CK-10-Anfärbung von keratinisierten plattenepithelialen Zellfraktionen in der Tonsille.	34
Abbildung 18: Kräftige Cytokeratin 10 Positivität von keratinisierenden Zellen von Hassall-Körperchen.	34
Abbildung 19: Keine CK-10-Anfärbung in nicht-keratinisierten Plattenepithelzellen der Cervix uterine.	35
Abbildung 20: Keine CK-10-Anfärbung im Urothel der Harnblase	35
Abbildung 21: Fokal starke Cytokeratin 10 Anfärbung in keratinisierten Bereichen von Plattenepithelkarzinomen der Vulva.	42
Abbildung 22: Fokal starke Cytokeratin 10 Anfärbung in keratinisierten Bereichen von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle	42
Abbildung 23: Kräftige Cytokeratin 10 in keratinisierten Arealen eines Plattenepithelkarzinoms des Penis.....	43
Abbildung 24: Kräftige Cytokeratin 10 im Urothelkarzinom der Blase sowie in Arealen keratinisierter plattenepithelialer Karzinomzellen.	43
Abbildung 25: Fokale Cytokeratin 10 Positivität in nicht invasivem Harnblasenkarzinom (pTa G2, low grade).....	44
Abbildung 26: Fokale Cytokeratin 10 Positivität in Arealen mit keratinisierter plattenepithelialer Differenzierung von dukalen Adenokarzinomen des Pankreas.	44
Abbildung 27: Cytokeratin 10 Positivität in der Mehrzahl der basalen epithelialen Zellen eines Warthin Tumors einer Speicheldrüse.....	45
Abbildung 28: Fehlende Cytokeratin 10 Positivität in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus	45
Abbildung 29: Rangliste der Cytokeratin 10 (CK10) positiven Tumorkategorien (grafische Darstellung).....	46
Abbildung 30: Cytokeratin 10 positiver neuroendokriner Tumor des Pankreas.	49
Abbildung 31: Zusammenhang zwischen Cytokeratin 10 (CK10)- IHC und rezidivfreiem Überleben (A) bzw. Gesamtüberleben(B).....	52

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Intermediärfilamenttypen. Quelle: (Briot et al. 2020)	7
Tabelle 2: Klassifikation der funktionalen Gene der menschlichen Keratine nach folgender Quelle: (Schweizer et al. 2006)	8
Tabelle 3: Keratinexpression in einfachen und geschichteten Epithelien, Die allgemeinen Grundsätze der Keratinexpression mit einer spezifischen Zuordnung bezüglich der einfachen und geschichteten Epithelien. Entnommen und modifiziert aus: Chu und Weiss 2002	10
Tabelle 4: Ein beispielhafter Auszug aus der Datenbank des Blasenarray-TMA BLA 11.2. Alle patientenbezogenen Daten wurden bereits anonymisiert.....	23
Tabelle 5: Zusammensetzung des TMAs für Normalgewebe	24
Tabelle 6: Verschiedene Visualisierungssysteme im Überblick. Quelle der Information: Hantschke und Palmedo 2015	26
Tabelle 7: Detaillierte Aufzählung der Färbeschritte.....	29
Tabelle 8: Beurteilungskriterien.....	30
Tabelle 9: CK10-IHC-Ergebnisse.....	37
Tabelle 10: Rangliste der Cytokeratin 10 positiven Tumorkategorien mit genauen Prozentangaben.....	47
Tabelle 11: Cytokeratin 10 (CK10)-Färbung und histopatologische Tumorparameter bei urothelialen Neoplasien versus plattenepithelialen Neoplasien.	50
Tabelle 12: Cytokeratin 10 (CK10)- IHC versus HPV-Status.	51

12. Erklärung des Eigenanteils

Das Thema für die vorliegende Dissertation habe ich zusammen mit meinem Betreuer, Prof. Dr. Guido Sauter, am Institut für Pathologie des UKE ausgewählt.

Mein Eigenanteil an der Studie umfasste die folgenden Arbeiten:

Zur Auswahl des Themas habe ich zunächst eine umfassende Literaturrecherche zur Expression von Cytokeratin 10 (CK10) in Normalgeweben und Tumoren durchgeführt. Zur Erweiterung des Multitumor Gewebemikro-Arrays (MTA) habe ich die Technik der Arrayherstellung erlernt und die Auswahl und pathologische Beurteilung geeigneter Gewebepblöcke organisiert. Die Auswahl des geeigneten Antikörpers sowie die Festlegung der optimalen Verdünnung habe ich in Zusammenarbeit mit meinem Betreuer getroffen. Dafür habe ich mehrere Testfärbungen durchgeführt und ausgewertet. Ich war zudem für die Erfassung der (anonymisierten) klinischen Verlaufsdaten und der histopathologischen Parameter der Tumoren für die MTA-Erweiterung in einer Excel-Tabelle verantwortlich. Die immunhistochemischen Färbungen und die Beurteilung der Färbungen erfolgten durch technisches Personal und eine erfahrene Pathologin des Instituts für Pathologie. Meine Aufgabe bestand in der anschließenden Aufnahme der Daten und deren Aufarbeitung für die abschließende statistische Analyse, die von Herrn Professor Simon vom Institut für Pathologie des UKE durchgeführt wurde. Die vorliegende Dissertationsschrift habe ich eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst.

13. Eidesstaatliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, 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. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

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

Datum

Unterschrift

14. Danksagung

Aller Dank und Lob gebühren Gott, dem Herrn der Welten, der mir durch seine Hilfe und Unterstützung die Möglichkeit eröffnet hat, ein erfülltes Leben zu führen. Ein Leben, das vom unermüdlichen Streben nach Wissen und tieferer Bedeutung geprägt ist.

Zunächst möchte ich mich beim gesamten Institut für Pathologie am UKE für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. Guido Sauter, welcher mir diese Dissertation ermöglicht hat und durch seine ausgezeichnete Betreuung einen wesentlichen Beitrag zu meiner fachlichen und persönlichen Entwicklung geleistet hat. Seine Expertise, sein wertvolles Feedback und seine motivierende Unterstützung waren während des gesamten Forschungsprozesses von unschätzbarem Wert und haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Ronald Simon und Dr. Martina Kluth bedanken, welche mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Nicht zuletzt möchte ich bei Frau Breitmeyer und dem Team des TMA-Labors für ihre wertvolle Unterstützung und ihr Engagement danken.

Einen besonderen Dank möchte ich an meine liebe Ehefrau Mahassen sowie meine beiden Söhne Ali und Abbas aussprechen, die unermüdlich meine Stützen in allen Lebenslagen waren. Ihre unerschütterliche Unterstützung, die mir stets Frieden und Freude schenkte, war vor allem während dieser Zeit und darüber hinaus von unschätzbarem Wert.

Abschließend möchte ich meinen Freunden und Mitdoktoranden meinen tiefsten Dank aussprechen, welche mich durchgängig begleitet und unermüdlich unterstützt haben.