UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie mit den Sektionen Molekularpathologie und Zytopathologie

Prof. Dr. med. Guido Sauter

Expression von Cytokeratin 18 in menschlichen Tumoren und Normalgeweben: Eine Tissue-Microarray-Studie an 11.952 Tumoren

Dissertation

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

vorgelegt von:

Timo Konstantin Weitbrecht aus Erlangen

Hamburg 2020

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 23.02.2021

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

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

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

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 Das Zytoskelett	4
1.2 Intermediärfilamente	4
1.3 Cytokeratine	6
1.4 Cytokeratin 18	8
1.4.1 Allgemeines	8
1.4.2 Cytokeratin 18 in Normalgeweben	10
1.4.3 Cytokeratin 18 in Tumoren	11
1.5 Immunhistochemie	13
1.6 Zielsetzung	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Tissue-Microarray Technik	20
2.2 Verwendete Tissue-Microarrays für die Cytokeratin 18 Studie	23
2.3 Immunhistochemie	28
2.4 Statistik	29
3. Ergebnisse	
3.1 Technische Aspekte	30
3.2 CK18 in Normalgeweben	
3.3 CK18-Expression in Tumoren	41
3.4 CK18-Expression und klinisch-pathologische Parameter	56
3.4.1 Nierenzellkarzinom	56
3.4.2 Mammakarzinom	60
3.4.3 Urothelkarzinom	63
3.4.4. Plattenepithelkarzinom	64
4. Diskussion	65
5. Zusammenfassung	73
6. English Summary	75
7. Abkürzungsverzeichnis	77
8. Literaturverzeichnis	79
9. Danksagung	89
10. Lebenslauf	90
11. Eidesstattliche Versicherung	91

1. Einleitung

1.1 Das Zytoskelett

Das Zytoskelett aller eukaryotischen Zellen umfasst drei unterschiedliche Filamenttypen: Mikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente. Diese zytoplasmatischen Strukturproteine sind Elemente eines hochdynamischen Systems und maßgeblich für den Erhalt der inneren und äußeren Form der Zelle, Kompartimentierung, sowie Zellmigration, Zellteilung, intrazellulären Transport und Signaltransduktion. (Pegoraro et al. 2017)



Abbildung 1 Komponenten des Zytoskeletts. (aus: Müller-Esterl 2018, S. 466)

1.2 Intermediärfilamente

Intermediärfilamente (IF) sind apolare, schlecht lösliche zytoplasmatische Polypeptide und bilden im Vergleich zu den Mikrotubuli und Mikrofilamenten eine widerstandsfähigere Komponente des Zytoskeletts. (Robert et al. 2016; Strelkov et al. 2003; Wagner et al. 2007) Sie kommen vermehrt in Zellen vor, die besonderen mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt sind. Die monomeren Proteinkomponenten von IF können aufgrund ihrer variablen N- und C-terminalen Domänen in sechs Kategorien eingeteilt werden, die zelltypspezifisch konstant oder in konstanten Kombinationen exprimiert werden. (Coulombe et al. 2001) Dies legt Unterschiede in ihrer Funktion nahe. Die im Zentrum liegende α -helikale Stabstruktur wiederum ist eine hochkonservierte Proteinsequenz. (Omary et al. 2004) IF besitzen einen Durchmesser von ca. 10-12 nm und liegen damit zwischen den Durchmessern -also intermediär- von Mikrotubuli und Mikrofilamenten. (Strelkov et al. 2003)

Abbildung 2 Verteilung der Komponenten des Zytoskeletts in der Zelle am Beispiel des Dünndarmepithels. (aus: Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012, S. 18)



Abbildung 3 Intermediärfilamentpolymerisation. (aus: Müller-Esterl 2018, S. 470)

Klasse	Тур	Größe	Anzahl Gene	Vorkommen
	Saure Keratine	40-70 kDa	28	Epithelzellen
II	Basische Keratine	40-70 kDa	26	Epithelzellen
III	Vimentinähnliche Proteine			
	Vimentin	53 kDa	1	Fibroblasten, Endothelzellen, Leukozyten
	Desmin	53 kDa	1	Muskelzellen
	Saures fibrilläres Gliaprotein	51 kDa	1	Gliazellen
	Peripherin	58 kDa	1	Periphere und zentrale Neurone
IV	Neurofilamentproteine	66-240 kDa	5	Axone
V	Kernlamine (Lamin A, B, C)	60-75 kDa	3	Kernlamina
VI	Nestin	240 kDa	1	Neuronale Stamm- und Vorläuferzellen

Tabelle 1 Intermediärfilamenttypen. Adaptiert aus: (Bernal und Arranz 2018)

1.3 Cytokeratine

Die Familie der Keratine oder auch Cytokeratine (CK) ist die heterogenste und zahlenmäßig größte Gruppe aller IF-Proteine. Sie umfasst 54 von 70 funktionellen Genen, die für IF-Proteine kodieren. (Kim und Coulombe 2007) Der Katalog nach Schweizer (urspr. Moll 1982) teilt die Cytokeratine nach absteigendem Molekulargewicht und nach isoelektrischem Punkt den ersten zwei der sechs Gruppen der IF-Proteine zu. (Moll et al. 1982; Schweizer et al. 2006)

Dies sind Gruppe I) die sauren Cytokeratine (CK9-28, CK31-40; davon elf im Haar, 17 epithelial), deren Gene (n=28) auf Chromosom 17q21.2 liegen und Gruppe II) die neutral bis basischen Cytokeratine (CK1-8, CK71-86; davon sechs im Haar, 20 epithelial), deren Gene (n=26) auf Chromosom 12q13.13 liegen. (Schweizer et al. 2006) Das CK18-Gen stellt eine Ausnahme dar. Obwohl es zur Gruppe I gehört, ist das Gen auf Chromosom 12 zu finden. (Waseem et al. 1990) Funktionell lassen sich drei Subgruppen der Keratine unterscheiden: 1) einfache epitheliale Cytokeratine einschichtiger Epithelien z.B. der Leber oder des Gastrointestinaltrakts, 2) Keratine mehrschichtiger Epithelien z.B. der Epidermis und 3) strukturelle Keratine der Haare und Nägel. (Haines und Lane 2012)

Cytokeratine bilden die typischen IF der Epithelzellen. (Moll et al. 2008) Je ein monomerer Vertreter der Gruppe I bildet zusammen mit einem Vertreter der Gruppe II ein obligat heterodimeres Paar. Zwei Dimere formen ein Tetramer. Diese sind Bausteine von Protofilamenten, von denen sich acht Stück zu einem IF zusammenlagern. (Steinert und Roop 1988)

Den Zellkern umringend verspannen sie das Zellinnere in einer Art Gitternetz und inserieren über Desmoplakin an Desmosomen, die wiederum über Cadherine mechanisch stabile Zell-Zellkontakte ausbilden, oder via Plectin an Hemidesmosomen, die Kontakt der Zelle zur extrazellullären Matrix herstellen. (Andrä et al. 2003; Kouklis et al. 1994) Dementsprechend sind sie essentiell nicht nur für die Stabilität der einzelnen Zelle, sondern auch für die Integrität des Zellverbands. (Moll et al. 2008) Mutationen in CK-Genen können eine Reihe von Krankheiten zur Folge haben. Bekanntes Beispiel ist die Epidermolysis bullosa simplex, die im Rahmen einer Mutation im CK5- oder CK14-Gen auftritt. Beide kodieren für epidermale Keratine. (Omary et al. 2004)

Seit über 30 Jahren gelten Cytokeratine -unter Zuhilfenahme von enstprechenden Antikörpernals immunhistochemische Marker für epitheliale Herkunft von Zellen. (Lane und Alexander 1990) Unterschiedliche Muster an CK-Kombinationen sind spezifisch für bestimme Epitheltypen oder deren Differenzierungsgrade, wobei ein Epitheltyp in der Regel ein bis fünf CK-Paare exprimiert. Verschiedene Epitheltypen können so anhand ihrer CK-Expressionsmuster charakterisiert werden. Auch im Falle einer malignen Transformation behalten epitheliale Zellen ihr CK-Muster größtenteils bei. Dies kann man sich in der histopathologischen Tumordiagnostik zu Nutze machen, um z.B. Karzinome von anderen Tumoren zu unterscheiden. Darüber hinaus können Tumoren, die morphologisch nicht eindeutig einem bestimmten Ausgangsorgan zugeordnet werden können (meistens Metastasen) anhand des CK-Expressionsmusters -vergleichbar mit einem Fingerabdruck- einem Ausgangsgewebe zugerechnet werden. (Chu und Weiss 2002; Moll et al. 2008)



Abbildung 4 Insertion von Cytokeratinfilamenten an Desmosmen. (aus: Müller-Esterl 2018, S. 470)

1.4 Cytokeratin 18

1.4.1 Allgemeines

Das Heterodimer aus Cytokeratin 18 (Gruppe I) und Cytokeratin 8 (Gruppe II) stellt einen IF-Baustein dar, der überwiegend in einfachen, einschichtigen Epithelien vorkommt. So z.B. in parenchymatösen Epithelien innerer Organe und luminalen Zellen von Drüsenepithel. Neben CK18 und seinem komplementären Partner CK8 sind auch CK7, CK19 und CK20 für diesen Epitheltyp charakteristisch. (Chu und Weiss 2002) Posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung und Glycosylierung bestimmen die Löslichkeit, Stabilität und Filamentorganisation von CK18, was Einfluss auf die Zelle selbst nimmt. (Leech et al. 2008; Omary et al. 1998) Wie auch für andere CK-haltige Zellen typisch, bleibt die CK18-Expression in Karzinomen und Metastasen, die aus einfachen Epithelien hervorgehen, meist erhalten. (Oshima et al. 1996)

In Hepatozyten stellt CK8/18 das exklusiv exprimierte CK-Paar dar. Da sich die mechanische Belastung hier, z.B. im Vergleich zur Haut, in Grenzen hält, ist es nur zu einem dünnen Netzwerk verwoben. Daher ist es naheliegend, dass CK18 in der Zelle auch andere Funktionen als die Stabilisierung innehat. (Moll et al. 2008) Hierzu zählt neben den mechanischen Qualitäten eine Beteiligung an zellulären Vorgängen wie Apoptose, Mitose, Regulation des Zellzyklus und intrazellulärer Signaltransduktion, weshalb auch eine Rolle in der Karzinogenese angenommen wird. (Coulombe und Omary 2002; Galarneau et al. 2007; Gilbert et al. 2001) Ein modulierender Einfluss auf Wachstums- und Proliferationssignalketten ist bekannt. Hierzu zählt der Ras-Signalweg, der bei Aktivierung durch onkogene Faktoren über Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie (Jun, Fos) und der ETS-Familie zur verstärkten Expression von CK18 führt. (Oshima et al. 1996; Pankov et al. 1994)

Fortier et al. zeigten 2010, dass eine Überexpression von Akt in bestimmten Krebszelllinien zu einer Überexpression von CK18 führte. (Fortier et al. 2010) Im PI3K/Akt-Signalweg fungiert CK18 als Ziel von Akt, welches ein antiapoptotisches Protoonkogen ist und Zellen vor Fas-induzierter Apoptose schützt. (Abreu et al. 2001) Hepatozyten in CK8-Knockout-Mäusen sind sensibler für Fas-induzierte Apoptose. (Gilbert et al. 2001) Auch eine direkte Inhibition des Fas-Rezeptors (FasR) durch CK18 ist bekannt. (Pan et al. 2013)

In humanen Hepatozyten wirkt CK8/18 offensichtlich zytoprotektiv, denn eine Mutation prädisponiert für Erkrankungen der Leber. So sind Mutationen im CK18-Gen mit gehäuftem Vorkommen von kryptogener Leberzirrhose verknüpft. (Ku et al. 1997) Im ERK/MAPK-Signalweg hat CK8/18 eine regulatorische Rolle inne. In Hepatozyten von CK8-Knockout-Mäusen kommt es zu einer geringeren Aktivierung von ERK1/2, was wiederum zu einer geringeren Aktivierung von

c-Flip führt. Beide wirken antiapoptotisch. (Gilbert et al. 2004) CK18 dient als Ziel von ERK1/2 im ERK/MAPK-Signalweg. (Weng et al. 2012; Zhang et al. 2006) Wang et al. postulierten 2015, dass CK18-Knockdown durch siRNA die Metastasierungsneigung von Krebszellen erhöhe. (Wang et al. 2015)



Abbildung 5 CK18 Immunfluoreszenzfärbung in Rot, Zellkern in Blau in PLC (Leberkrebszellen). (aus: Moll et al. 2008)



Abbildung 6 Funktionen von Cytokeratin 18. Adaptiert aus: (Weng et al. 2012)

Bei chronischen Lebererkrankungen wie z.B. der nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH), der alkoholischen Steatohepatitis (ASH), chronischer Cholestase oder hepatozytären Neoplasien kommt es vermehrt zur Ausbildung von intrahepatozytären hyalinen Einschlüsskörperchen, den Mallory-Denk-Bodys (Abbildung 7). Diese bestehen neben Stressproteinen wie p62 und Ubiquitin zum Großteil aus CK8/18-Aggregaten. (Bardag-Gorce et al. 2006; Strnad et al. 2008)

In den letzten Jahren hat der ELISA-gestützte Nachweis von Cytokeratin 18 bzw. dessen Caspase-gespaltenen Fragmenten (CYFRA) im Blutserum oder Urin zunehmend Bedeutung als Apotose- und Nekrosebiomarker für CK18-haltige Zellen gewonnen (Abbildung 8). Durch den ELISA ist es möglich, den überwiegenden Modus des Zelltods (Apoptose vs. Nekrose) zu bestimmen, da nur im Rahmen der Apoptose, nicht aber im Rahmen des nekrotischen Zelltodes, nebst intaktem CK18 auch CYFRA freigesetzt werden. (Kramer et al. 2004; Leers et al. 1999) Diagnostisch kann man sich dies beispielsweise zum nicht-invasiven Nachweis einer NASH oder einer Graft-vs.-Host-Reaktion nach Lebertransplantation zu Nutze machen. (He et al. 2017; Waterhouse et al. 2011) Auch eine Aussage zum Ansprechen bzw. Progress auf und unter

Chemotherapie und zur Prognoseinschätzung vieler Tumorentitäten ist möglich. (Koelink et al. 2009; Scott et al. 2009; Yaman et al. 2010)



Abbildung 7 Mallory-Denk-Bodys (markiert durch schwarze Pfeile), aus: webpathology.com https://www.webpathology.com/image.asp?case=715&n=13, 05.10.2020

Abbildung 8 M30-ELISA Assay detektiert Caspasegespaltenes CK18-Fragment (Apoptose). M65-ELISA Assay erkennt intaktes und fragmentiertes CK18 (Nekrose). (aus: Olofsson et al. 2007)

1.4.2 Cytokeratin 18 in Normalgeweben

Das Vorhandensein von CK18 und seinem komplementären Partner CK8 ist in einer Reihe von Normalgeweben bekannt. Hierzu gehören sämtliche parenchymatöse Organe, die in einfachen, einschichtigen Epithelien organisiert sind. Das sind beispielweise Leber, Lunge, Niere, Pankreas und andere Organe des Gastrointestinaltrakts. (Goddard et al. 1991; Oshima et al. 1996) Die Epithelzellen der Leber, azinäre- und Inselzellen des Pankreas und proximale Tubuluszellen der Niere exprimieren neben CK8/18 keine weiteren Cytokeratine. Auch duktale/luminale Epithelien von Drüsengeweben in den Pankreasgängen, Gallenwegen oder Sammelrohre der Niere, luminale Zellen des mehrreihigen respiratorischen Epithels, Mesothel oder Urothel enthalten CK18, daneben allerdings auch weitere Cytokeratine. (Moll et al. 2008) Luminale Zellen der Mamma exprimieren typischerweise CK18. Ebenso kommt CK18 in uterinen Zellen vor. (Faridi et al. 2018; Goddard et al. 1991) Typische Cytokeratine des mehrschichtigen Plattenepithels sind CK5, CK14 und CK15. (Lloyd et al. 1995) In Basalzellen dieser Epithelien ist jedoch teilweise CK18-Positivität zu beobachten. (Chu und Weiss 2002) So ist das mehrschichtig-unverhornte plattenepitheliale Gewebe des Ösophagus typischerweise nicht CK18-immunoreaktiv, während sich ösophageale Drüsen durchaus anfärben. (Makino et al. 2009)

1.4.3 Cytokeratin 18 in Tumoren

CK18-Antikörper färben dementsprechend o.g. Normalgewebe und typischerweise auch aus diesen Geweben hervorgehende Karzinome. Laut Literatur wird CK18, zusammen mit anderen Cytokeratinen einfacher Epithelzellen (CK8 und CK19), konstant in Adenokarzinomen exprimiert, während in plattenepithelialen Karzinomen -wie auch in den zugehörigen Ursprungsgewebenwenig oder kein CK18 exprimiert wird. Dies kann man sich diagnostisch zur Unterscheidung -am besten unter Anwendung eines CK-Panels- von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen zu Nutze machen. (Chin et al. 1992; Moll et al. 2008; Suo et al. 1993) So wurde beschrieben, dass z.B. unklare Lungenherde anhand der CK18-Immunhistochemie besser einer bestimmten Entität zugeordnet werden können. (Nhung et al. 1999) Großzellige neuroendokrine Bronchialkarzinome Adenokarzinome färben sich typischerweise stärker als kleinzelligeund oder Plattenepithelkarzinome. (Nagashio et al. 2010) Allerdings wurde beschrieben, dass die CK18-Expression in Plattenepithelkarzinomen in Korrelation mit der Dedifferenzierung der Zellen ansteigen kann, was eine sichere Unterscheidung anhand des CK-Panels erschwert. (Moll et al. 2008) Auch in Tumoren der Haut kann eine CK-Färbung eine differentialdiagnostische Hilfe sein, da Plattenepithelkarzinome in der Regel CK18-negativ sind, während Tumoren mit Ursprung in apokrinen und exokrinen Drüsen, Talgdrüsen oder Merkelzellkarzinome Immunoreaktivität zeigen. (Battifora und Silva 1986; Moll et al. 2008; Yamamoto et al. 2000)

Eine Bestimmung des Ursprungsgewebes soll auch bei Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen durch CK18 Bestimmung erleichtert werden. Während Larynx- und Hypopharynxkarzinome meist CK18-positiv sind, ist dies bei Mundhöhlenkarzinomen seltener der Fall und eine CK18-Positivität soll in diesen Tumoren dann auch mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet sein. (Balm et al. 1996; Fillies et al. 2006)

Ähnliches wurde auch für plattenepitheliale Ösophaguskarzinome beschrieben, denn hier soll eine CK18-Positivität mit einer schlechten Differenzierung und einem fortgeschrittenen Stadium einhergehen. (Makino et al. 2009) Auch eine ektopische Expression von CK8 und CK18 in schlecht differenzierten Tumoren der Haut ist beschrieben. (Markey et al. 1991) Adenokarzinome sind typischerweise CK18-positiv. (Moll et al. 1982) Eine Abnahme oder Verlust der Expression ist gehäuft mit höheren Stadien und einer schlechteren Prognose assoziiert. So z.B. in Adenokarzinomen des Kolons, der Prostata oder der Mamma. (Knösel et al. 2006; Woelfle et al. 2004; Yin et al. 2016) Auch hepatozelluläre (HCC)- und cholangiozelluläre Karzinome (CCC), Renalzellkarzinome, Urothelkarzinome und neuroendokrine Tumoren exprimieren CK18. (Chu und Weiss 2002) Die Tatsache, dass CK8/18 das einzige CK-Paar in Hepatozyten ist, lässt sich auch für die oft schwierige Abgrenzung von HCCs und CCCs nutzen. Während HCCs in der Regel

CK8/18 als exklusives CK-Paar exprimieren, kommt in CCCs beispielsweise meist auch CK7 vor. (Hurlimann und Gardiol 1991) Stark entdifferenzierte HCCs können ihre CK18-Positivität allerdings verlieren. (van Eyken et al. 1988) Auch Sarkome exprimieren vereinzelt ektopisches CK8/18 und zwar ohne Coexpression anderer Cytokeratine. Miettinen und Fetsch beobachteten dies beispielsweise in Angiosarkomen und Hämangioendotheliomen mit epitheloidem Charakter. (Miettinen und Fetsch 2000)

1.5 Immunhistochemie

Die CK18-Immunhistochemie wird seit mehr als 30 Jahren von Pathologen diagnostisch genutzt. (Oshima et al. 1996) Die Immunhistochemie ist eine aus der Routinepathologie nicht mehr wegzudenkende Methode, welche allerdings in ihrer Anwendung verschiedenen Problemen unterworfen ist. Die für diagnostische Zwecke verwendeten Antikörper werden letztlich durch Immunisierung von Mäusen generiert. Für die Herstellung eines monoklonalen Antikörpers werden Mäuse entweder mit dem gesamten Protein (Full-length Protein) oder mit potentiell immunogenen Teilen des Proteins (Peptide) immunisiert. Das Immunsystem reagiert mit der Herstellung von hunderten oder tausenden strukturell unterschiedlichen Antikörpern gegen das injizierte Zielprotein. Das Verfahren zum Herstellen monoklonaler Maus-Antikörper beinhaltet nach Vakzinierung und Schlachtung der Tiere die Fusion der extrahierten Milzzellen mit immortalisierten Krebszellen (Hela-Zellen), wodurch eine Vielzahl von Antikörper-produzierenden Klonen entsteht. (Zuckier et al. 1989) Diese Klone erlauben es letztlich einen Teil der gesamten von der Maus gebildeten Antikörper künstlich herzustellen. Aus der Milz einer einzigen Maus können dabei 100 oder mehr verschiedene monoklonale Antikörper gegen ein Zielprotein hergestellt werden, die sich in ihren Bindungseigenschaften gegenüber dem Zielprotein und anderen Strukturen teilweise erheblich unterscheiden. (Goodman 2018; van Heyningen et al. 1983)

Eine Abfrage der Antikörper-Datenbank www.citeab.com am 03.10.20 ergab unter dem Suchbegriff "CK18" 2.197 verschiedene kommerziell erhältliche Klone von 65 verschiedenen Anbietern. Auf www.antibodypedia.com waren am selben Tag unter demselben Suchbegriff 3.451 verschiedene Klone von 52 verschiedenen Anbietern gelistet. Aufgrund der Art und Weise wie Antikörper hergestellt werden, ist es zu erwarten, dass sich die verschiedenen CK18-Antikörper in ihrer Spezifität, Sensitivität und Affinität erheblich unterscheiden. Es erstaunt deswegen nicht, dass die Literaturangaben zu CK18-Positivität in verschiedenen Tumortypen teilweise deutlich voneinander abweichen. Beispielsweise wurde von einer CK18-Positivität bei hepatozellulären Karzinomen in 41-100%, bei Angiosarkomen in 20-100% und in bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen in 0-100% der Fälle berichtet. (Agaimy et al. 2012; Akiba et al. 2016; Bártek et al. 1991; Broers et al. 1988; Chen et al. 2011; Lai et al. 2018; Miettinen und Fetsch 2000; Tsuji et al. 1999; Young et al. 2002) Mindestens 44 Studien haben in den letzten Jahren die Häufigkeit der CK18-Expression in malignen Tumoren immunhistochemisch untersucht. Die in diesen Studien rapportierten Häufigkeiten sind in Abbildung 9 dargestellt und im Anschluss die entsprechenden Literaturverweise. Eine große Übersichtsarbeit zu Cytokeratinen wurde 2002 von Chu und Weiss publiziert. Die Arbeit fasste die Ergebnisse von 297 Studien zusammen und

beschrieb insgesamt 1.976 Fälle zu CK8/18. Ein Teil der von Chu zitierten Arbeiten waren heute nicht mehr in PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov) abrufbar. Bei von diesem Problem betroffenen Arbeiten wurden die von Chu zusammengefassten Daten übernommen.

0%	20%	40%	60%	80%	100%
Mamma Ca NST				• X	• • •
Hypopharynx PeCa				•	
Sarkom epitheloid				•	
Schilddrüsen Ca medullär				•	
Mamma Ca lobulär				×	•
Lunge Karzinoid			•	X	•
Ameloblastisches Ca				•	
Nierenzell Ca				•	
Mamma Ca medullär					
Endometrium AdenoCa				•	
Pankreas NET					•
Lunge AdenoCa			•		×
Mamma Ca muzinös					•
Magen AdenoCa					×
Chordom					•
Colorektales AdenoCa					×
Dünndarm AdenoCa					•
Hämangioendotheliom					•
Larynx PeCa					•
Malignes Mesotheliom					•
Ovarial Ca endometrioid					•
Ovarial Ca klarzellig					•
Ovarial Ca muzinös					•
Ovarial Ca serös					•
Pankreas Ca					×
Schilddrüsen Ca follikulär					•
Schilddrüsen Ca papillär	×durschnitt	iche Positivität	t		•
Siegelringzell Ca Magen/Colorektal	• n=1-20				X
Speicheldrüse Adenoidzystisches Ca	Summenda	aten aus Chu u	nd Weiss, 2002		•
Synoviales Sarkom biphasisch	• n>20				•
Urothelkarzinom					

Abbildung 9 Diagramm zur Darstellung der bisherigen Studienergebnisse zur CK18-Immunhistochemie. Die Y-Achse listet verschiedene Tumorentitäten nach durchschnittlicher Positivitätsrate. Auf der X-Achse sind die Positivitätsraten (0-100%) der jeweiligen Entität abgebildet. Grüne Punkte repräsentieren Studien mit Fallzahlen über 20, orange Punkte Studien mit Fallzahlen <20. Bei Entitäten mit mehr als einem Studienergebnis gibt das Kreuz den Durchschnitt aller Ergebnisse wieder. Zu Entitäten mit blauem Punkt war kein Originalpaper einsehbar. Die hier wiedergegebenen Daten stammen aus dem Review Chu und Weiss, 2002. Verwendete Abkürzungen: Ca: Karzinom; PeCa: Plattenepithelkarzinom.



Abbildung 9 Fortsetzung: Literaturdiagramm. Erläuterung siehe vorherige Seite.

Literaturverweise zu den Daten aus Abbildung 9:

Ameloblastisches Karzinom: (Yoon et al. 2011) Ameloblastom: (Pal et al. 2013; Yoon et al. 2011) Angiosarkom: (Agaimy et al. 2012; Miettinen und Fetsch 2000) Astrozytom: (Kriho et al. 1997) Basaliom: (Yoshikawa et al. 1998) Cholangiozelluläres Karzinom: (Akiba et al. 2016; Bártek et al. 1991; Lai et al. 2018; Shimonishi et al. 2000; Tsuji et al. 1999) Chondroblastom: (Chu und Weiss 2002) Chordom: (O'Hara et al. 1998) Colorektales Adenokarzinom: (Bártek et al. 1991; Levy et al. 1992; Moll et al. 1993; Ueda et al. 1993) Dünndarm Adenokarzinom: (Chu und Weiss 2002) Endometrium Adenokarzinom: (Hsu et al. 2010) Gastrointestinaler Stromatumor (GIST): (Chu und Weiss 2002) Glioblastoma multiforme: (Terada 2015) Hämangioendotheliom: (Miettinen und Fetsch 2000) Hämangiom: (Miettinen und Fetsch 2000) Haut Plattenepithelkarzinom: (Chu und Weiss 2002) Hepatozelluläres Karzinom: (Akiba et al. 2016; Bártek et al. 1991; Lai et al. 2018; Tsuji et al. 1999) Hypopharynx Plattenepithelkarzinom: (Balm et al. 1996) Kaposi-Sarkom: (Miettinen und Fetsch 2000) Larynx Plattenepithelkarzinom: (Balm et al. 1996) Leiomyosarkom: (Chu und Weiss 2002) Lunge Adenokarzinom: (Broers et al. 1988; Chen et al. 2011; Young et al. 2002) Lunge adenosquamöses Karzinom: (Broers et al. 1988; Young et al. 2002) Lunge großzelliges Karzinom: (Broers et al. 1988) Lunge Karzinoid: (Broers et al. 1988) Lunge kleinzelliges Karzinom: (Broers et al. 1988) Lunge Plattenepithelkarzinom: (Broers et al. 1988; Chen et al. 2011; Young et al. 2002) Lymphangiom: (Levy et al. 1992; Miettinen und Fetsch 2000) Lymphom: (Bártek et al. 1991)

Magen Adenokarzinom: (Bártek et al. 1991; Kim et al. 2004; Levy et al. 1992; Moll et al. 1993; Ueda et al. 1993) Malignes Melanom: (Bártek et al. 1991; Chen et al. 2009) Malignes Mesotheliom: (Chu und Weiss 2002) Mammakarzinom lobulär: (Bártek et al. 1991; Shao et al. 2012; Woelfle et al. 2004) Mammakarzinom medullär: (Shao et al. 2012) Mammakarzinom metaplastisch: (Altaf et al. 2014; Shao et al. 2012) Mammakarzinom muzinös: (Shao et al. 2012) Mammakarzinom NST: (Bártek et al. 1991; Ciocca et al. 2006; Malzahn et al. 1998; Shao et al. 2012; Walker et al. 2007; Woelfle et al. 2004) Mamma DCIS: (Ciocca et al. 2006) Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST): (Chu und Weiss 2002) Mundhöhlen Plattenepithelkarzinom: (Balm et al. 1996; Nanda et al. 2012) Nasopharynxkarzinom: (Li et al. 2009; Liang et al. 2014) Nicht-Seminom: (Chu und Weiss 2002) Nierenzellkarzinom: (Zhang et al. 2012) Ösophagus Plattenepithelkarzinom: (Makino et al. 2009; Yang et al. 2018) Ovarialkarzinom endometrioid: (Ueda et al. 1993) Ovarialkarzinom klarzellig: (Ueda et al. 1993) Ovarialkarzinom muzinös: (Ueda et al. 1993) Ovarialkarzinom serös: (Ueda et al. 1993) Pankreaskarzinom: (Notohara et al. 2000; Ueda et al. 1993) Pankreas NET: (Notohara et al. 2000) Prostatakarzinom: (Yin et al. 2016) Sarkom epitheloid: (Chu und Weiss 2002) Schilddrüsenkarzinom anaplastisch: (Lam et al. 2001) Schilddrüsenkarzinom follikulär: (Lam et al. 2001) Schilddrüsenkarzinom medullär: (Lam et al. 2001) Schilddrüsenkarzinom papillär: (Lam et al. 2001) Schweißdrüsenkarzinom: (Fernandez-Flores und Cassarino 2015) Seminom: (Chu und Weiss 2002) Siegelringzellkarzinom Magen/Colorektal: (Terada 2013) Speicheldrüse Adenoidzystisches Karzinom: (Chu und Weiss 2002) Speicheldrüse mucoepidermoides Karzinom: (Azevedo et al. 2008)

<u>Speicheldrüse myoepithelialer Tumor:</u> (Chu und Weiss 2002) <u>Synoviales Sarkom biphasisch:</u> (Miettinen et al. 2000) <u>Synoviales Sarkom monophasisch:</u> (Miettinen et al. 2000) <u>Thymom:</u> (Chu und Weiss 2002) <u>Urothelkarzinom:</u> (Bártek et al. 1991) <u>Zervix Adenokarzinom:</u> (Hsu et al. 2010)

1.6 Zielsetzung

Unklare Angaben darüber, wie häufig CK18 in diagnostisch relevanten Geweben tatsächlich gefunden werden kann, erschweren die diagnostische Nutzung der CK18-Immunhistochemie in der täglichen Praxis. Neben der Nutzung unterschiedlicher Antikörper dürften auch unterschiedliche Färbeprotokolle und unterschiedliche Kriterien bei der Interpretation der immunhistochemischen Befunde zu den uneinheitlichen Daten in der Literatur geführt haben. Für die bessere Einordnung von CK18-Immunhistochemie-Befunden wäre es deshalb wünschenswert, die CK18-Expression an einem sehr großen Kollektiv von Tumor- und Normalgeweben mit einem Antikörper, einem Färbeprotokoll und standardisierten Auswertekriterien vergleichend zu untersuchen. Das ausgewählte Tissue-Microarray-Archiv (TMA-Archiv) des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) mit mehr als 30.000 Tumorproben im TMA-Format stellt eine einzigartige Basis für Studien dar, welche die genannten Probleme lösen können.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es dementsprechend die Prävalenz der CK18-Expression in einer Vielzahl verschiedener Tumor- und Normalgewebe zu bestimmen. Darüber hinaus sollten aberrante Befunde wie Verlust der CK18-Expression oder Neoexpression von CK18 in normalerweise nicht-exprimierenden Geweben auf ihre mögliche klinische Relevanz hin überprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1 Tissue-Microarray Technik

Die Tissue-Microarray Technik wurde erstmals 1998 beschrieben. (Kononen et al. 1998) Die Methode hat seither die Art und Weise wie gewebebasierte Forschung, insbesondere im onkologischen stattfindet maßgeblich Für die Bereich, geprägt. Evaluation von immunhistochemischen Markern war es vorher üblich, dass von ausgewählten Tumorblöcken "reguläre" Schnitte hergestellt wurden, welche dann Schnitt für Schnitt immunhistochemisch gefärbt wurden. Da Studien zur Klärung der klinischen Relevanz von Biomarkern eine hohe Fallzahl verlangen, waren derartige Studien außerordentlich arbeitsintensiv und es wurde eine große Menge an Reagenzien verbraucht. Darüber hinaus sind Gewebeblöcke von Tumoren, zu denen klinische Verlaufsdaten vorhanden sind ein wertvolles Gut, welche durch die Anfertigung klassischer Großschnitte schnell verbraucht werden. Je nachdem wie häufig ein Block angeschnitten wird kann es sein, dass dieser nach 40 bis 80 Schnitten komplett aufgebraucht ist. Die TMA-Methode löst das Problem des übermäßigen Gewebeverbrauchs, senkt die Reagenzienkosten und führt zu einer massiven Beschleunigung von Biomarker-Studien. Ein TMA-Block enthält zylindrisches Probematerial von hunderten verschiedener Patienten¹ mit einem Durchmesser von jeweils 0,6 mm. Die Gewebezylinder werden mit einer Hohlnadel aus einem vorher ausgewählten repräsentativen Bereich eines Paraffinblocks entnommen und danach in vorgefertigte Löcher in einem ursprünglich leeren Paraffinblock eingebracht. Der Durchmesser der Gewebezylinder betrug bei der Erstpublikation 0,6 mm. (Kononen et al. 1998) Dieser Durchmesser wird nach wie vor am UKE verwendet. Andere Untersucher hatten auch größere Durchmesser -bis zu 2 mm pro Gewebespot- verwendet, um Probleme durch eine mögliche Tumorheterogenität zu vermeiden. (De und Brown 2010; Dessauvagie et al. 2015) Da zahlreiche Studien unter Verwendung von 0,6 mm messenden Gewebeproben pro Tumor gezeigt haben, dass alle etablierten Korrelationen zwischen molekularen Parametern und klinischen Daten auch bei Gewebeproben von 0,6 mm reproduziert werden können, empfiehlt sich aus Gründen der Gewebeeinsparung der kleinstmögliche Zylinderdurchmesser. (Nocito et al. 2001; Ruiz et al. 2006; Torhorst et al. 2001)

¹ Aus Gründen der Lesbarkeit wird im Folgenden die gewohnte Sprachform bei personenbezogenen Substantiven und Pronomen verwendet. Dies impliziert keine Benachteiligung des weiblichen oder anderweitigen Geschlechts, sondern soll im Sinne der sprachlichen Vereinfachung als geschlechtsneutral zu verstehen sein.

Der Standardaufbau eines UKE-TMAs ist in Abbildung 10 dargestellt. Die Arrays enthalten bis zu sechs Sektoren, welche aus Gründen der Orientierung am TMA-Schnitt in ihrer Größe voneinander abweichen. Die Sektoren werden mit Großbuchstaben (A bis F), die Zeilen mit arabischen Zahlen und die Spalten mit Kleinbuchstaben definiert.

TMAs sind hervorragend dafür geeignet, den Erfordernissen des Datenschutzes zu genügen. Die potentiell einem Patienten zuweisbaren Lognummern (Biopsienummer, Einsendenummer) werden nur während der Herstellungsphase eines TMAs benötigt. Nach der Fertigstellung der TMA-Blöcke können die Einsendenummern entweder ausgeblendet (Pseudonymisierung) oder permanent gelöscht werden (Anonymisierung). Nach dem Entfernen der Patienteninformationsnummer werden die vorhandenen klinisch-pathologischen Daten einzig über die TMA-Blockbezeichnung und die Koordinaten auf dem Block definiert. Tabelle 2 zeigt eine Darstellung eines typischen zu einem TMA hergestellten Datenfile.



Abbildung 10 Standardaufbau eines UKE-TMA-Blocks mit 612 sog. Spots. Jede Lokalisation bzw. jeder Spot ist durch eine Koordinate (Dreistellig: Sektor, Zeile, Spalte) eindeutig einer Gewebeprobe zuzuweisen. Sektor F ist meist für eine Kontrollgruppe mit Referenzgewebeproben vorgesehen.

Array Name	Koordinate	Tumorentität	Geschl echt	Alter bei Einsendung	рТ	рN	pМ	Grad ISUP	Grad Fuhr mann	Grad Thoenes	UICC	Tumorgröße in cm
KID7.1C	B2f	NCC, klarzellig	М	59	3-4	0	0	2	2	2	3	19
KID7.1C	B2g	NCC, klarzellig	М	63	1	x	0	2	2	2	1	3,8
KID7.1C	B2h	NCC, papillär Typ 1	М	57	1	0	0	2	2	2	1	2,6
KID7.1C	B2i	NCC, papillär Typ 1	М	37	1	x	x	3	3	2	1	3,5
KID7.1C	B2k	NCC, klarzellig	М	60	2	0	0	3	3	2	2	7,5
KID7.1C	B2I	NCC, klarzellig	М	67	x	2	x	3	3	3	x	4,1
KID7.1C	B2m	NCC, klarzellig	М	57	x	0	x	3	3	2	x	6,5
KID7.1C	B2n	NCC, papillär Typ 2	М	71	1	x	x	1	2	1	1	4,4
				1								

Tabelle 2 Ausschnitt aus dem Datenfile des TMA KID7.1C (Nierentumor-Array). Patientenbezogene Daten sind im vorliegenden Beispiel bereits anonymisiert. Die eindeutige Zuordnung eines Gewebespots zu histopathologischen und klinischen Daten eines Patienten erfolgt über die Koordinate. Weitere Spalten können andere patientenbezogene Daten, z.B. Follow-Up-Daten enthalten. Diese sind der Übersicht halber nicht dargestellt. Verwendete Abkürzung: NCC: Nierenzellkarzinom

2.2 Verwendete Tissue-Microarrays für die Cytokeratin 18 Studie

Für die CK18-Studie wurden insgesamt 38 TMA-Blöcke untersucht, wovon einer ausschließlich aus Normalgeweben bestand. Dieser Normalgewebe-Array (NTA) enthält Proben von 76 verschiedenen Typen von Normalgewebe. Von jedem Normalgewebe wurden dazu Proben von acht verschiedenen Patienten verwendet, um möglichen interindividuellen Variabilitäten oder Färbeartefakten entgegenzuwirken. Die Zusammensetzung fixationsbedingten des Normalgewebe TMAs ist in Tabelle 3 dargestellt. Die übrigen 37 Schnitte dieser Studie beinhalteten 14.579 Tumoren von 115 verschiedenen Tumortypen und Subtypen. Die Liste der untersuchten Tumorentitäten und Subentitäten ist zusammen mit der Anzahl der in der Studie eingeschlossenen Gewebeproben in Tabelle 4 dargestellt. Beispielhaft ist einer der für die Studie verwendeten TMA-Schnitte in Abbildung 11 gezeigt. Detaillierte histopathologische Daten zu Differenzierungsgrad, pT- und pN-Status waren von 4.191 der Patienten verfügbar. Klinische Verlaufsdaten waren 1.178 Mammakarzinompatientinnen 847 von und Nierenzellkarzinompatienten vorhanden. Die mittlere Nachverfolgungszeit lag bei 49 bzw. 39 Monaten (Bereich: 1-88 bzw. 1-250 Monate). Alle Gewebeproben stammen aus dem Institut für Pathologie des UKE, dem Institut für Pathologie des Klinikum Fürth und dem Institut für Pathologie Prof. Dr. R. Krech, Dr. T. Christians in Osnabrück. Die verwendeten Gewebe waren durchweg zum Zwecke der Diagnostik entnommene, in 4%-igem Formalin fixierte Gewebeproben, welche in Paraffin eingebettet worden waren. Die Verwendung von archiviertem diagnostischem Restgewebe für die Herstellung von TMAs und ihre Analyse für Forschungszwecke wurde von der lokalen Ethikkommission Hamburg (WF-049/09) bewilligt. Alle Arbeiten waren unter Einhaltung der Helsinki-Deklaration erfolgt.



Abbildung 11 Dargestellt ist einer der 38 für die Studie verwendeten TMA-Schnitte. Gelistet sind Name des Antikörpers, interne Klonnummer, Verdünnung, pH beim Autoklavieren, Schneidedatum, genaue Bezeichnung des Arrays und Färbedatum. Schon makroskopisch sind die sechs Sektoren (A-F) erkennbar.

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

Tabelle 3 Zusammensetzung des Normalgewebe-Arrays (NTA). Je acht Proben pro Normalgewebetyp entsprechen608 Spots auf dem Array. Die Reihenfolge der Darstellung entspricht der Lokalisation auf dem NTA.

Organsystem	Entität bzw. Subentität n=115	Fallzahl
	Pilomatrixom	28
der	Basaliom	42
nt e	Benigner Naevus	23
Ha	Haut Plattenepithelkarzinom	44
'n	Malignes Melanom	43
	Merkelzellkarzinom	43
	Larynx Plattenepithelkarzinom	43
	Mundboden Plattenepithelkarzinom	43
u	Lunge Plattenepithelkarzinom	66
ore	Lunge Adenokarzinom	176
En	Lunge kleinzelliges Karzinom	16
<u>jsti</u>	Malignes Mesotheliom	40
Åê,	Mesotheliom, epitheloid	26
Ê	Mesotheliom, sonstiges	18
Ate	Parotis pleomorphes Adenom	42
	Parotis Warthin Tumor	47
	Speicheldrüse Basalzelladenom	15
	Vagina Plattenepithelkarzinom	20
	Vulva Plattenepithelkarzinom	33
	Zervix Plattenepithelkarzinom	35
	Zervix Adenokarzinom	38
	Endometriumkarzinom endometrioid	212
	Endometriumkarzinom serös	53
L e	Endometrium maligner Müller'scher Mischtumor	38
Ore	Endometriumkarzinom, high grade	12
En	Endometriumkarzinom klarzellig	7
Ē	Endometrium Stromasarkom	10
che	Ovarialkarzinom endometrioid	86
<u>dis</u>	Ovarialkarzinom serös	495
	Ovarialkarzinom muzinös	75
äko	Ovarialkarzinom klarzellig	47
ñ	Ovar Müller'scher Mischtumor	41
U	Brennertumor	8
	Mammakarzinom NST	1.001
	Mammakarzinom lobulär	229
	Mammakarzinom medullär	22
	Mammakarzinom tubulär	17
	Mammakarzinom muzinös	35
	Phylloides Tumor Mamma	32

Tabelle 4 Auflistung der untersuchten Entitäten bzw. Subentitäten (n=115) nach Organsystemen sortiert mit Angabe der in der Studie eingeschlossenen Fallzahl.

Organsystem	Entität bzw. Subentität n=115	Fallzahl
	Colonadenom, low grade	41
	Colonadenom, high grade	44
	Colon Adenokarzinom	1.750
eu	Dünndarm Adenokarzinom	5
	Magenkarzinom diffuser Typ	161
L L L L L L L L L L L L L L L L L L L	Magenkarzinom intestinaler Typ	156
E E E E E E E E E E E E E E E E E E E	Magenkarzinom gemischter Typ	59
lai	Ösophagus Adenokarzinom	70
stir	Ösophagus Plattenepithelkarzinom	63
Ite	Analkanal Plattenepithelkarzinom	33
<u> </u>	Cholangiozelluläres Karzinom	112
asti	Hepatozelluläres Karzinom	49
Ŭ	Pankreas duktales Adenokarzinom	523
	Pankreas/Papille Adenokarzinom	76
	Pankreas Azinuszellkarzinom	12
	Gastrointestinaler Stromatumor (GIST)	42
	Urothelkarzinom nTa G2 low grade	109
	Urothelkarzinom nTa G2 high grade	100
	Urothelkarzinom nTa G3	144
	Urothelkarzinom pT2-4 G3	939
	Harnhlasenkarzinom kleinzellig	18
	Urothelkarzinom sarkomatoid	18
_	Nierenzellkarzinom klarzellig	722
Ler	Nierenzellkarzinom papillär	209
OL	Nierenzellkarzinom chromophob	112
In	Onkozytom	144
<u>.</u>	Nierenzellkarzinom tubulo-papillär	18
lita	Prostata Adenokarzinom Gleason 3+3	82
Jer	Prostata Adenokarzinom Gleason 4+4	73
l	Prostata Adenokarzinom Gleason 5+5	81
	Prostata Adenokarzinom Rezidiv nach Therapie	287
	Prostatakarzinom kleinzellig	16
	Seminom	204
	Testikuläre intraeptitheliale Neoplasie	67
	embryonales Karzinom des Hodens	46
	Dottersacktumor des Hodens	42
	Teratom des Hodens	27
		400
	Schilddrusenadenom	109
ren	Schilddrusenkarzinom papillär	381
mor	Schilddrüsenkarzinom follikulär	150
L Tu	Schilddrüsenkarzinom medullär	98
rine (Schilddrüsenkarzinom anaplastisch	43
A ob	Nebennieren-Adenom	36
E E	Nebennieren-Karzinom	20
	Phäochromozytom	42

Tabelle 4 Fortsetzung: Auflistung der untersuchten Entitäten bzw. Subentitäten (n=115) nach Organsystemen sortiert mit Angabe der in der Studie eingeschlossenen Fallzahl.

Organsystem	Entität bzw. Subentität n=115	Fallzahl
	Appendix Neuroendokriner Tumor	15
	Colorektal Neuroendokriner Tumor	10
	Ileum Neuroendokriner Tumor	45
Endokrine Tumoren	Lunge Neuroendokriner Tumor	18
	Pankreas Neuroendokriner Tumor	79
	Colorektal Neuroendokrines Karzinom	9
	Gallenblase Neuroendokrines Karzinom	4
	Pankreas Neuroendokrines Karzinom	7

NeoplasienNon Hodgkin Lymphom41Riesenzell-Sehnenscheiden Tumor43Granularzelltumor32Leiomyom32Angiomyolipom74Angiosarkom55Dermatofibrosarkoma protuberans16Ganglioneurom11Kaposi Sarkom5Leiomyosarkom70Liposarkom98Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST)12Myofibrosarkom24Neurofibrom103Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS)67Paragangliom37Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)13Rhabdomyosarkom6Schwannom93Synoviales Sarkom10Osteosarkom29Chondrosarkom21	Hämatologische	Hodgkin Lymphom	39
Riesenzell-Sehnenscheiden Tumor43Granularzelltumor32Leiomyom32Angiomyolipom74Angiosarkom55Dermatofibrosarkoma protuberans16Ganglioneurom11Kaposi Sarkom5Leiomyosarkom70Liposarkom98Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST)12Myofibrosarkom24Neurofibrom103Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS)67Paragangliom37Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)13Rhabdomyosarkom6Schwannom93Synoviales Sarkom10Osteosarkom29Chondrosarkom21	Neoplasien	Non Hodgkin Lymphom	41
Riesenzell-Sehnenscheiden Tumor43Granularzelltumor32Leiomyom32Angiomyolipom74Angiosarkom55Dermatofibrosarkoma protuberans16Ganglioneurom11Kaposi Sarkom5Leiomyosarkom98Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST)12Myofibrosarkom24Neurofibrom103Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS)67Paragangliom37Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)13Rhabdomyosarkom6Schwannom93Synoviales Sarkom29Chondrosarkom21			
Granularzelltumor32Leiomyom32Angiomyolipom74Angiosarkom55Dermatofibrosarkoma protuberans16Ganglioneurom11Kaposi Sarkom5Leiomyosarkom70Liposarkom98Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST)12Myofibrosarkom24Neurofibrom103Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS)67Paragangliom37Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)13Rhabdomyosarkom6Schwannom93Synoviales Sarkom29Chondrosarkom21		Riesenzell-Sehnenscheiden Tumor	43
Leiomyom 32 Angiomyolipom 74 Angiosarkom 55 Dermatofibrosarkoma protuberans 16 Ganglioneurom 11 Kaposi Sarkom 55 Leiomyosarkom 70 Liposarkom 98 Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST) 12 Myofibrosarkom 24 Neurofibrom 103 Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS) 67 Paragangliom 37 Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET) 13 Rhabdomyosarkom 6 Schwannom 93 Synoviales Sarkom 10 Osteosarkom 29 Chondrosarkom 21		Granularzelltumor	32
Angiomyolipom 74 Angiosarkom 55 Dermatofibrosarkoma protuberans 16 Ganglioneurom 11 Kaposi Sarkom 5 Leiomyosarkom 70 Liposarkom 98 Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST) 12 Myofibrosarkom 24 Neurofibrom 103 Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS) 67 Paragangliom 37 Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET) 13 Rhabdomyosarkom 6 Schwannom 93 Synoviales Sarkom 29 Chondrosarkom 21		Leiomyom	32
Angiosarkom 55 Dermatofibrosarkoma protuberans 16 Ganglioneurom 11 Kaposi Sarkom 5 Leiomyosarkom 70 Liposarkom 98 Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST) 12 Myofibrosarkom 24 Neurofibrom 103 Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS) 67 Paragangliom 37 Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET) 13 Rhabdomyosarkom 6 Schwannom 93 Synoviales Sarkom 10 Osteosarkom 29 Chondrosarkom 21		Angiomyolipom	74
Dermatofibrosarkoma protuberans16Ganglioneurom11Kaposi Sarkom5Leiomyosarkom70Liposarkom98Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST)12Myofibrosarkom24Neurofibrom103Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS)67Paragangliom37Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)13Rhabdomyosarkom6Schwannom93Synoviales Sarkom10Osteosarkom29Chondrosarkom21		Angiosarkom	55
Ganglioneurom11Kaposi Sarkom5Leiomyosarkom70Liposarkom98Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST)12Myofibrosarkom24Neurofibrom103Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS)67Paragangliom37Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)13Rhabdomyosarkom6Schwannom93Synoviales Sarkom10Osteosarkom29Chondrosarkom21	C.	Dermatofibrosarkoma protuberans	16
Kaposi Sarkom5Leiomyosarkom70Liposarkom98Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST)12Myofibrosarkom24Neurofibrom103Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS)67Paragangliom37Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)13Rhabdomyosarkom6Schwannom93Synoviales Sarkom10Osteosarkom29Chondrosarkom21	Jore	Ganglioneurom	11
Leiomyosarkom 70 Liposarkom 98 Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST) 12 Myofibrosarkom 24 Neurofibrom 103 Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS) 67 Paragangliom 37 Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET) 13 Rhabdomyosarkom 6 Schwannom 93 Synoviales Sarkom 10 Osteosarkom 29 Chondrosarkom 21	stun	Kaposi Sarkom	5
Liposarkom 98 Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST) 12 Myofibrosarkom 24 Neurofibrom 103 Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS) 67 Paragangliom 37 Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET) 13 Rhabdomyosarkom 6 Schwannom 93 Synoviales Sarkom 10 Osteosarkom 29 Chondrosarkom 21	ve b;	Leiomyosarkom	70
Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST)12Myofibrosarkom24Neurofibrom103Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS)67Paragangliom37Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)13Rhabdomyosarkom6Schwannom93Synoviales Sarkom10Osteosarkom29Chondrosarkom21	lgev	Liposarkom	98
Myofibrosarkom24Neurofibrom103Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS)67Paragangliom37Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)13Rhabdomyosarkom6Schwannom93Synoviales Sarkom10Osteosarkom29Chondrosarkom21	d Weich	Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST)	12
Neurofibrom103Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS)67Paragangliom37Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)13Rhabdomyosarkom6Schwannom93Synoviales Sarkom10Osteosarkom29Chondrosarkom21		Myofibrosarkom	24
Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS)67Paragangliom37Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)13Rhabdomyosarkom6Schwannom93Synoviales Sarkom10Osteosarkom29Chondrosarkom21	un	Neurofibrom	103
Paragangliom37Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)13Rhabdomyosarkom6Schwannom93Synoviales Sarkom10Osteosarkom29Chondrosarkom21	len-	Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert (NOS)	67
Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)13Rhabdomyosarkom6Schwannom93Synoviales Sarkom10Osteosarkom29Chondrosarkom21	loch	Paragangliom	37
Rhabdomyosarkom6Schwannom93Synoviales Sarkom10Osteosarkom29Chondrosarkom21	, х	Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)	13
Schwannom93Synoviales Sarkom10Osteosarkom29Chondrosarkom21		Rhabdomyosarkom	6
Synoviales Sarkom10Osteosarkom29Chondrosarkom21		Schwannom	93
Osteosarkom29Chondrosarkom21		Synoviales Sarkom	10
Chondrosarkom 21		Osteosarkom	29
		Chondrosarkom	21

Tabelle 4 Fortsetzung: Auflistung der untersuchten Entitäten bzw. Subentitäten (n=115) nach Organsystemen sortiert mit Angabe der in der Studie eingeschlossenen Fallzahl.

2.3 Immunhistochemie

Alle immunhistochemischen Untersuchungen wurden an einem Tag, in einem Experiment und in einem Satz von Reagenzien durchgeführt. Die dafür verwendeten Schnitte waren wenige Tage vorher, ebenfalls am gleichen Tag, hergestellt worden. Die Schnitte wurden vor der immunhistochemischen Untersuchung einer hitzeinduzierten Antigendemaskierungsprodezur unterworfen, für 5 min in einem Autoklav bei 121°C in einem pH 7,8 Puffer. Der Primärantikörper für CK18 (monoklonaler Mausantikörper, MSVA, Klon MSVA-018) wurde für 60 min bei 37°C und einer Verdünnung von 1:150 inkubiert. Der gebundene Antikörper wurde dann mit dem Envision-Kit (Dako, Glostrup, Dänemark) nach der Verfahrensanleitung des Herstellers visualisiert. Für Normalgewebe erfolgte eine zelltypspezifische Auswertung durch einen Pathologen (Prof. Dr. G. Sauter). Bei Tumorgeweben wurde der prozentuale Anteil gefärbter neoplastischer Zellen geschätzt und es wurde die Färbeintensität auf einer Skala von 0 bis 3+ semiguantitativ abgeschätzt. Für statistische Untersuchungen wurden die Färbeergebnisse in vier Gruppen kategorisiert, wobei die folgenden Kriterien angewendet wurden: Tumoren ohne jegliche Färbung in Tumorzellen wurden als "negativ" beurteilt. Tumoren mit einer 1+ Färbeintensität in ≤70% der Tumorzellen oder einer 2+ Intensität in ≤30% der Tumorzellen wurden als "schwach positiv" bewertet. Tumoren mit einer 1+ Färbung in >70% der Zellen, einer 2+ Färbung in 31-70% der Zellen oder einer 3+ Färbung in ≤30% der Tumorzellen wurden als "mäßig stark positiv" bewertet. Tumoren mit 2+ Intensität in >70% der Tumorzellen oder 3+ Intensität in >30% der Tumorzellen wurden als "stark positiv" klassifiziert. Tabelle 5 zeigt einen Überblick über die Auswertekriterien.

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

Tabelle 5 Übersicht zur semiquantitativen Interpretation der immunhistochemischen Ergebnisse

2.4 Statistik

Alle statistischen Auswertungen wurden mittels JMP 14 Software (SAS Institute Inc., NC, USA) ausgeführt. Mehrfeldertest und Chi-Quadrat-Tests wurden zur Identifikation von statistischen Assoziationen zwischen kategorischen Parametern (CK18, Grad, Stadium, Nodalstatus) verwendet. Überlebenskurven wurden unter Verwendung des Kaplan-Meier-Verfahrens hergestellt. Ein Log-Rank Test wurde für die Klärung statistisch signifikanter Prognoseunterschiede verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Technische Aspekte

Insgesamt 11.952 von 14.579 Tumorproben (82,0%) waren in unserer TMA-Analyse interpretierbar. Die verbliebenen 2.627 (18,0%) waren nicht beurteilbar, weil entweder eindeutige Tumorzellen auf dem Gewebespot fehlten oder der gesamte Gewebespot auf dem Tissue-Array fehlte. Von allen Normalgewebetypen war eine ausreichende Zahl von Proben auswertbar, um eine eindeutige Beurteilbarkeit der CK18-Expression in den abgebildeten Zelltypen zu ermöglichen.

3.2 CK18 in Normalgeweben

CK18 wurde in den meisten epithelialen Zelltypen exprimiert. CK18 fand sich stark exprimiert in Epithelzellen des Magens (Ausnahme: Parietalzellen, Abbildung 18, S. 34), Duodenum, Ileum, Appendix, Colon, Rektum, Gallenblase, Pankreas (schwächere Färbung in Inselzellen als in azinären Zellen), Endometrium, Endozervix, Alveolarzellen der Lunge, Zytound Synzytiotrophoblast der Plazenta und in allen Zellen der Adenohypophyse (variable Färbeintensität, möglicherweise bedingt durch Unterschiede zwischen einzelnen Zelltypen). Leberepithelzellen zeigten eine zonale Variabilität bei der Färbung der Hepatozyten, wobei die Färbeergebnisse von negativ bis zu stark positiv reichten. Gallengangsepithel war immer stark positiv. Speicheldrüsen zeigten eine starke Färbung von serösen und muzinösen Zellen und eine etwas geringere Anfärbung in Ausführungsgängen, insbesondere in großen Ausführungsgängen. Einige der größeren Gänge waren auf einzelnen Schnitten komplett CK18-negativ. Im Ovar färbten sich Follikelzellen und follikuläre Zysten positiv, wie auch einige Zellen im Corpus luteum. Verschiedene Epithelien zeigten eine starke Anfärbung in Drüsenzellen, aber eine deutlich schwächere und teilweise sogar fehlende Färbung in den zugehörigen Basalzellen. Dieses Phänomen fand sich in Prostata, respiratorischer Schleimhaut von Bronchus und paranasalen Sinus, Nebenhoden, Samenbläschen und Mammadrüsen. In Urothel von Niere und Harnblase fand sich eine starke Färbung in den Deckzellen und eine schwächere Färbung in Urothelzellen. Die Färbung im Urothel nahm typischerweise von oben nach unten ab. Die CK18-Immunhistochemie war immer negativ in allen untersuchten Plattenepithelien einschließlich Haut, Lippe, Mundhöhle, Tonsille, Analkanal, Haarfollikel und Talgdrüsen. Negativ waren auch die Färbungen von Hoden (ausnahmsweise geringe Färbung in einzelnen Sertoli-Zellen, Abbildung 16, S. 33) und Nebenniere. Die CK18-Färbung war auch regelmäßig negativ in allen mesenchymalen Geweben und in Zellen der Blutbildung. Repräsentative Abbildungen von CK18positiven und -negativen Normalgeweben sind in Abbildung 12-29 gezeigt.



Abbildung 12 Nicht-verhornendes Plattenepithel der Mundschleimhaut (CK18-negativ).



Abbildung 13 Nicht-verhornendes Plattenepithel des Analkanals (CK18-negativ).



Abbildung 14 CK18-negative (ekkrine) Talgdrüsen mit Ausführungsgängen.



Abbildung 15 CK18-Negativität im Plattenepithel der Tonsille und im lymphatischem Gewebe.



Abbildung 16 Weitgehend CK18-negatives Hodengewebe mit vereinzelten CK18-positiven Zellen. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um Sertoli-Zellen. CK18-positive Zellen sind nur ausnahmsweise in normalem Hoden zu finden.



Abbildung 17 Kräftige CK18-Positivität in azinären Pankreasdrüsenzellen. Geringere Positivität in einer Langerhans-Insel.



Abbildung 18 CK18-positive Epithelien der Magenschleimhaut. Parietalzellen sind von der Färbung ausgenommen.



Abbildung 19 Rektumschleimhaut mit kräftiger CK18-Positivität im Epithel.



Abbildung 20 Kräftige CK18-Färbung in Epithelien der Epididymis.



Abbildung 21 Sezernierendes Endometrium mit kräftiger CK18-Positivität.



Abbildung 22 Kräftige CK18-Expression in proximalen und distalen Nierentubuli, sowie in einzelnen Zellen der Bowman-Kapsel. Glomeruli sind CK18-negativ.



Abbildung 23 Plazenta mit kräftiger CK18-Expression von Synzytio- und Zytotrophoblast.


Abbildung 24 Urothel des Nierebeckens. Kräftige Positivität von Deckzellen. Die Urothelien färben sich je nach Topographie der Zellen unterschiedlich an. Je weiter oben die Zellen liegen, desto kräftiger die Färbung.



Abbildung 25 Speicheldrüse (Parotis) mit kräftiger CK18-Expression in serösen Drüsen. Deutlich schwächere Expression in Ausführungsgängen.



Abbildung 26a Lebergewebeproben mit unterschiedlich stark ausgeprägter CK18-Positivität von Hepatozyten, je nach zonaler Lokalisation. Geringe Positivität im Bereich von Zentralvenen. Kräftige Positivität periportal.



Abbildung 26b Lebergewebeproben mit unterschiedlich stark ausgeprägter CK18-Positivität von Hepatozyten, je nach zonaler Lokalisation. Geringe Positivität im Bereich von Zentralvenen. Kräftige Positivität periportal.



Abbildung 27 Prostata mit kräftiger Positivität von azinären Zellen. Basalzellen scheinen von der Färbung ausgespart.



Abbildung 28 Mammaepithel mit kräftiger Anfärbung von Drüsenzellen. Basalzellen sind negativ.



Abbildung 29 Adenohypophyse mit unterschiedlich ausgeprägter, teils sehr kräftiger Positivität in praktisch allen Zellen der Adenohypophyse.

3.3 CK18-Expression in Tumoren

Eine zytoplasmatische, gelegentlich membranös akzentuierte CK18-Färbung fand sich in 9.098 (76,1%) von 11.952 erfolgreich untersuchten Tumoren. Darunter fanden sich 5.378 Tumoren (45,0%) mit starker, 1.971 (16,5%) mit moderater und 1.748 (14,6%) mit einer schwachen Anfärbung. Zumindest eine gelegentliche geringe CK18-Positivität fand sich in 90 von 115 (78,3%) der in der Studie eingeschlossenen Tumortypen und Subtypen und bei 78 der 115 Tumorentitäten (67,8%) zeigte sich zumindest in einem Tumor eine starke CK18-Positivität. Die größte Häufigkeit von CK18-positiven Tumoren fand sich in Adenokarzinomen des Gastrointestinaltrakts und in der Prostata. Eine grafische Darstellung der Häufigkeitsverteilung der CK18-Färbung in den verschiedenen Tumortypen ist in Abbildung 30 zu sehen. Die Darstellung zeigt einen S-förmigen Kurvenverlauf mit vielen Tumorentitätera won <20%. Eine detaillierte Auflistung der Ergebnisse einschließlich der Anteile von Tumoren mit schwacher, mäßiger und starker Positivität ist nach Organsystemen geordnet in Tabelle 6 gezeigt. Repräsentative Bilder von CK18-positiven und -negativen Tumoren sind in den Abbildungen 31-49 dargestellt.



Abbildung 30 Häufigkeitsverteilung der CK18-Färbung in den untersuchten Tumorentitäten und –subentitäten.



Abbildung 30 Fortsetzung: Häufigkeitsverteilung der CK18-Färbung in den untersuchten Tumorentitäten und –subentitäten.

Organsv			% schwach	% mäßig	% stark	% gesamt
stem	Entität bzw. Subentität	% neg.	pos.	stark pos.	pos.	pos.
<u>ب</u>	Pilomatrixom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
de	Basaliom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
en	Benigner Naevus	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ло На	Haut Plattenepithelkarzinom	93,2	6,8	0,0	0,0	6,8
un_	Malignes Melanom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
—	Merkelzellkarzinom	32,6	16,3	23,3	27,9	67,4
	Larynx Plattenepithelkarzinom	72,1	25,6	0,0	2,3	27,9
	Mundboden Plattenepithelkarzinom	93,0	7,0	0,0	0,0	7,0
en	Lunge Plattenepithelkarzinom	39,4	48,5	7,6	4,5	60,6
Jor	Lunge Adenokarzinom	0,0	29,5	28,4	42,0	100,0
tun	Lunge kleinzelliges Karzinom	18,8	12,5	50,0	18,8	81,3
gsi	Malignes Mesotheliom	12,5	12,5	15,0	60,0	87,5
we	Mesotheliom, epitheloid	3,8	11,5	34,6	50,0	96,2
em	Mesotheliom, sonstiges	11,1	33,3	16,7	38,9	88,9
Ati	Parotis pleomorphes Adenom	23,8	50,0	19,0	7,1	76,2
	Parotis Warthin Tumor	0,0	40,4	36,2	23,4	100,0
	Speicheldrüse Basalzelladenom	6,7	60,0	6,7	26,7	93,3
	Vaging Diattongnithalkarzingm	00.0	5.0	0.0	50	10.0
		90,0	5,0	0,0	5,0	10,0
		100,0	0,0	0,0	0,0	
		0.0	2,9	0,0	63.2	100.0
	Endometriumkarzinom endometrioid	0,0	14.2	22.2	63.2	99.5
	Endometriumkarzinom serös	1.9	15.1	34.0	43.4	92.5
	Endometrium maligner Müller'scher	1,0	10,1	04,0		02,0
en	Mischtumor	21.1	26.3	34.2	18.4	78.9
Jor	Endometriumkarzinom, high grade	33.3	33.3	25.0	8.3	66.7
_ <u></u>	Endometriumkarzinom klarzellig	0,0	57,1	42,9	0,0	100,0
е	Endometrium Stromasarkom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
sch	Ovarialkarzinom endometrioid	1,2	4,7	26,7	67,4	98,8
ogis	Ovarialkarzinom serös	0,8	13,7	31,9	53,5	99,2
olc	Ovarialkarzinom muzinös	0,0	17,3	18,7	64,0	100,0
äč	Ovarialkarzinom klarzellig	8,5	34,0	31,9	25,5	91,5
JYE	Ovar Müller'scher Mischtumor	22,0	14,6	24,4	39,0	78,0
Ŭ	Brennertumor	62,5	37,5	0,0	0,0	37,5
	Mammakarzinom NST	3,6	21,8	23,5	50,9	96,2
	Mammakarzinom lobulär	0,4	21,0	26,6	52,0	99,6
	Mammakarzinom medullär	59,1	18,2	9,1	13,6	40,9
	Mammakarzinom tubulär	0,0	23,5	17,6	58,8	100,0
	Mammakarzinom muzinös	0,0	11,4	37,1	51,4	100,0
	Phylloides Tumor Mamma	0,0	37,5	21,9	40,6	100,0

Tabelle 6 Auflistung der Ergebnisse der CK18-Immunhistochemie nach Organsystemen sortiert.

Organsys tem	Entität bzw. Subentität	% neg.	% schwach pos.	% mäßig stark pos.	% stark pos.	% gesamt pos.
	Colonadenom, low grade	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	Colonadenom, high grade	0,0	0,0	2,3	97,7	100,0
	Colon Adenokarzinom	2,6	2,3	9,9	85,3	97,4
en	Dünndarm Adenokarzinom	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
Jor	Magenkarzinom diffuser Typ	5,6	32,3	28,6	33,5	94,4
L L L	Magenkarzinom intestinaler Typ	7,1	23,7	19,2	50,0	92,9
E E	Magenkarzinom gemischter Typ	5,1	25,4	22,0	47,5	94,9
lale	Ösophagus Adenokarzinom	1,4	12,9	7,1	78,6	98,6
stir	Ösophagus Plattenepithelkarzinom	68,3	22,2	0,0	9,5	31,7
Ites	Analkanal Plattenepithelkarzinom	75,8	15,2	9,1	0,0	24,2
oin	Cholangiozelluläres Karzinom	1,8	17,0	29,5	51,8	98,2
str	Hepatozelluläres Karzinom	8,2	28,6	20,4	42,9	91,8
G	Pankreas duktales Adenokarzinom	1,0	16,8	25,6	56,6	99,0
	Pankreas/Papille Adenokarzinom	5,3	6,6	25,0	63,2	94,7
	Pankreas Azinuszellkarzinom	0,0	0,0	16,7	83,3	100,0
	Gastrointestinaler Stromatumor (GIST)	97,6	2,4	0,0	0,0	2,4
	Urothelkarzinom pTa G2 low grade	41,3	11,9	23,9	22,9	58,7
	Urothelkarzinom pTa G2 high grade		20,0	24,0	20,0	64,0
	Urothelkarzinom pTa G3		27,8	24,3	29,2	81,3
	Urothelkarzinom pT2-4 G3		28,1	14,7	17,5	60,3
	Harnblasenkarzinom kleinzellig	33,3	33,3	11,1	22,2	66,7
	Urothelkarzinom sarkomatoid	66,7	33,3	0,0	0,0	33,3
	Nierenzellkarzinom klarzellig		31,2	14,3	7,1	52,5
eu	Nierenzellkarzinom papillär		15,3	15,8	66,0	97,1
l	Nierenzellkarzinom chromophob	0,9	9,8	20,5	68,8	99,1
L L L	Onkozytom	1,4	11,8	16,7	69,4	97,9
	Nierenzellkarzinom tubulo-papillär	27,8	5,6	16,7	50,0	72,2
tale	Prostata Adenokarzinom Gleason 3+3	0,0	1,2	1,2	97,6	100,0
eni	Prostata Adenokarzinom Gleason 4+4	0,0	4,1	1,4	94,5	100,0
bo	Prostata Adenokarzinom Gleason 5+5	0,0	3,7	11,1	85,2	100,0
5	Prostata Adenokarzinom Rezidiv n.					
	Therapie	6,3	16,0	27,9	49,8	93,7
	Prostatakarzinom kleinzellig	25,0	18,8	37,5	18,8	75,0
	Seminom	94,1	5,4	0,5	0,0	5,9
	Testikuläre intraeptitheliale Neoplasie	64,2	29,9	3,0	3,0	35,8
	embryonales Karzinom des Hodens	0,0	23,9	19,6	56,5	100,0
	Dottersacktumor des Hodens	0,0	38,1	21,4	40,5	100,0
	Teratom des Hodens	70,4	14,8	0,0	14,8	29,6
en	Schilddrüsenadenom	0,0	5,5	35,8	58,7	100,0
IOL	Schilddrüsenkarzinom papillär	0,3	1,6	14,7	83,5	99,7
Tun	Schilddrüsenkarzinom follikulär	0,0	2,0	<u>34,</u> 0	64,0	100,0
krine	Schilddrüsenkarzinom medullär	1,0	6,1	33,7	59,2	99,0
lopu	Schilddrüsenkarzinom anaplastisch	41,9	32,6	14,0	11,6	58,1
Ш	Nebennieren-Adenom	91,7	5,6	0,0	2,8	8,3

Tabelle 6 Fortsetzung: Auflistung der Ergebnisse der CK18-Immunhistochemie nach Organsystemen sortiert.

Organsyst em		Entität bzw. Subentität	% negativ	% schwach pos.	% mäßig stark pos.	% stark pos.	% gesamt pos.
	Nel	pennieren-Karzinom	70,0	10,0	0,0	20,0	30,0
Ę	Phä	aochromozytom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ore	Арр	pendix Neuroendokriner Tumor	0,0	8,3	0,0	91,7	100,0
Ĕ	Col	orektal Neuroendokriner Tumor	0,0	0,0	10,0	90,0	100,0
L L	lleu	m Neuroendokriner Tumor	0,0	2,2	2,2	95,6	100,0
ре	Lur	nge Neuroendokriner Tumor	0,0	11,8	17,6	70,6	100,0
kri	Par	nkreas Neuroendokriner Tumor	1,3	5,1	31,6	62,0	98,7
opi	Col	orektal Neuroendokrines Karzinom	33,3	22,2	22,2	22,2	66,7
ш	Ga	lenblase Neuroendokrines Karzinom	50,0	0,0	25,0	25,0	50,0
	nkreas Neuroendokrines Karzinom	28,6	28,6	0,0	42,9	71,4	
Hämatologis	che	Hodgkin Lymphom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Neoplasie	n	Non-Hodgkin Lymphom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0

	Riesenzell-Sehnenscheiden Tumor	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Granularzelltumor	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Leiomyom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Angiomyolipom	98,6	1,4	0,0	0,0	1,4
ç	Angiosarkom	87,3	7,3	3,6	1,8	12,7
ore	Dermatofibrosarkoma protuberans	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ĕ	Ganglioneurom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
stu	Kaposi Sarkom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
/ep	Leiomyosarkom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Jew	Liposarkom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
- Ĵ Ĵ	Maligner peripherer					
/eid	Nervenscheidentumor	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
S	Myofibrosarkom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ůn	Neurofibrom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ļ	Sarkom, nicht anderweitig spezifiziert	94,0	4,5	1,5	0,0	6,0
che	Paragangliom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D D D D	Primitiver neuroektodermaler Tumor	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ž	Rhabdomyosarkom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Schwannom	98,9	0,0	1,1	0,0	1,1
	Synoviales Sarkom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Osteosarkom	96,6	3,4	0,0	0,0	3,4
	Chondrosarkom	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabelle 6 Fortsetzung: Auflistung der Ergebnisse der CK18-Immunhistochemie nach Organsystemen sortiert.



Abbildung 31 Klarzelliges Nierenzellkarzinom ohne CK18-Färbung.



Abbildung 32 Kräftige Anfärbung in einem klarzelligen Nierenzellkarzinom.



Abbildung 33 CK18-Negativität in einem Mammakarzinom NST.



Abbildung 34 Mammakarzinom NST mit kräftiger, diffuser CK18-Positivität.



Abbildung 35 Weitestgehende CK18-Negativität eines pTa G2 Harnblasentumors. Zwei basal gelegene Zellen Färben sich dennoch an.







Abbildung 37 Muskelinvasives Urothelkarzinom mit starker CK18-Anfärbung.



Abbildung 38 Magenkarzinom vom intestinalen Typ mit kräftiger CK18-Positivität.



Abbildung 39 Adenokarzinom des Kolons mit diffuser CK18-Positivität.



Abbildung 40 Endometrioides Endometriumkarzinom mit kräftiger CK18-Anfärbung aller Drüsenepithelien.



Abbildung 41 CK18-negatives Plattenepithelkarzinom des Larynx.



Abbildung 42 CK18-Negativität in einem Plattenepithelkarzinom des Mundbodens. Regionäre Drüsenzellen (nicht-neoplastisch) dienen als Positivkontrolle der Färbung.



Abbildung 43 Plattenepithelkarzinom des Larynx mit herdförmig unterschiedlich stark ausgeprägter CK18-Expression.



Abbildung 44 Plattenepithelkarzinom der Vagina ohne CK18-Färbung.



Abbildung 45 Plattenepithelkarzinom der Vagina mit meist schwach ausgeprägter, teilweise mäßig starker CK18-Anfärbung.



Abbildung 46 Plattenepithelkarzinom der Zervix ohne CK18-Anfärbung.



Abbildung 47 Plattenepithelkarzinom der Zervix mit diffuser, kräftiger CK18-Positivität.



Abbildung 48 Seminom des Hodens ohne jegliche CK18-Anfärbung.



Abbildung 49 Embryonales Karzinom des Hodens mit diffuser CK18-Positivität.

3.4 CK18-Expression und klinisch-pathologische Parameter

3.4.1 Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom gehört zu den Tumortypen mit stark variablen CK18-Befunden. Unter 1.205 auswertbaren Tumoren fanden sich unter anderem 356 komplett negative (29,5%) und 375 stark positive (31,1%) Tumoren. Die Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen CK18-Befunde ist für die verschiedenen histologischen Subtypen des Nierenzellkarzinoms in Tabelle 7 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass der häufigste Karzinomtyp, das klarzellige Karzinom, deutlich seltener positiv bzw. stark positiv ist, als die anderen wichtigen Tumorsubtypen. Ein negativer CK18-Befund fand sich bei 47,5% der klarzelligen Karzinome, aber nur 2,4% der papillären Karzinome, 1,4% der Onkozytome und 0,9% der chromophoben Karzinome.

Die Untersuchung der Beziehung zum Tumorphänotyp ergab bei den klarzelligen Nierenzellkarzinomen signifikante Assoziationen zu einigen der untersuchten Parameter für Tumoraggressivität (Tabelle 8). So war ein CK18-negativer Befund signifikant assoziiert mit einem hohen Thoenes-Grad (p=0,0086), einem hohen UICC-Stadium (p=0,001), einem hohen pT-Stadium (p<0,0001) und dem Vorliegen von Fernmetastasen (p<0,0001). Der Vergleich der CK18-Expression mit klinischen Verlaufsdaten ist für das klarzellige Nierenzellkarzinom in Abbildung 51a-c dargestellt. Hierbei ergab sich für den Parameter rezidivfreies Überleben ein signifikant ungünstigerer Befund für CK18-negative Tumoren, als für Tumoren mit CK18-Färbung (p=0,0088) (Abbildung 51a). Die CK18-Expression war hingegen nicht mit den Parametern Gesamtüberleben und tumorspezifisches Überleben (Abbildung 51b und 51c) assoziiert.

Bei papillären Karzinomen fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der CK18-Expression und pT, Differenzierungsgrad, pN- und pM-Status (Daten nicht gezeigt). Es fand sich aber ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer fehlenden oder schwachen CK18-Expression und einem verkürzten tumorspezifischen Überleben (p=0,0257) (Abbildung 53a). Die Beziehung mit dem Gesamtüberleben und dem rezidivfreien Überleben zeigte eine ähnliche Tendenz. Die statistische Evaluation erreichte hier aber nicht das Signifikanzniveau (Abbildung 53b und 53c).

		0/_	%	% mäßig	%	%
	Anzahl	⁷⁰ negativ	schwach	stark	stark	gesamt
Histotyp		nogativ	positiv	positiv	positiv	positiv
Klarzelliges Karzinom	722	47,5	31,2	14,3	7,1	52,5
Papilläres Karzinom	209	2,4	15,3	15,8	66,0	97,1
Onkozytom	144	1,4	11,8	16,7	69,4	97,9
Chromophobes Karzinom	112	0,9	9,8	20,5	68,8	99,1
Tubulo-papilläres Karzinom	18	27,8	5,6	16,7	50,0	72,2

Tabelle 7 Ergebnisse der CK18-Immunhistochemie für verschiedene Nierentumortypen.

Nur klarzellige Nierenzellkarzinome		Anzahl	% negativ	% schwach positiv	% mäßig stark positiv	% stark positiv	P-Wert
ISUP	1	217	42,9	35,5	15,2	6,5	0,1312
	2	218	50,5	28,4	13,8	7,3	
	3	189	51,3	30,2	13,2	5,3	
	4	40	67,5	17,5	5,0	10,0	
Fuhrmann	1	32	37,5	34,4	21,9	6,3	0,2311
	2	399	46,4	31,6	15,0	7,0	
	3	194	52,1	30,9	11,3	5,7	
	4	48	62,5	16,7	10,4	10,4	
Thoenes	1	239	41,0	33,9	17,6	7,5	0,0086
	2	369	51,8	30,1	12,7	5,4	
	3	65	60,0	20,0	7,7	12,3	
UICC	1	294	37,4	36,1	19,0	7,5	0,001
	2	34	50,0	32,4	11,8	5,9	
	3	87	58,6	20,7	11,5	9,2	
	4	70	57,1	34,3	7,1	1,4	
pT	1	391	40,2	35,8	16,1	7,9	<0,0001
	2	72	59,7	25,0	11,1	4,2	
	3-4	206	61,7	21,4	11,2	5,8	
pN	0	114	55,3	28,9	7,9	7,9	0,5327
	≥1	16	43,8	25,0	18,8	12,5	
pM	0	102	39,2	35,3	15,7	9,8	<0,0001
	≥1	73	64,4	31,5	4,1	0,0	

Tabelle 8 Beziehung von Parametern der Tumoraggressivität zu den Ergebnissen der CK18-Immunhistochemie bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen.



Abbildung 51a Signifikante Assoziation von rezidivfreiem Überleben und Ergebnis der CK18-Immunhistochemie bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen.



Abbildung 51b Gesamtüberleben im Vergleich zum Ergebnis der CK18-Immunhistochemie bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen (statistisch nicht signifikant).

Abbildung 51c Tumorspezifisches Überleben im Vergleich zum Ergebnis der CK18-Immunhistochemie bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen (statistisch nicht signifikant).







Abbildung 53b Assoziation von Gesamtüberleben zu den Ergebnissen der CK18-Immunhistochemie bei papillären Nierenzellkarzinomen (statistisch nicht signifikant).



3.4.2 Mammakarzinom

Von 1.846 Mammakarzinomen waren 1.336 auswertbar (72,4%). Nicht-Auswertbarkeit war wie immer bei TMA-Untersuchungen entweder durch das Fehlen eindeutiger Tumorzellen auf dem Gewebespot oder das völlige Fehlen eines Gewebespots bedingt. Von den 1.336 auswertbaren Tumoren waren 3,7% CK18-negativ, 21,7% schwach positiv, 24,0% mäßig stark positiv und 50,4% stark positiv. Die Positivitätsrate war dabei signifikant höher bei No-Special-Type-Karzinomen (NST-Karzinome), als bei lobulären Karzinomen, oder anderen Karzinomtypen (p=0,0005). Der Vergleich mit histopathologischen und molekularen Parametern ergab sowohl für die Gesamtkohorte als auch für die Kohorte von 935 auswertbaren NST-Karzinomen die gleichen statistischen Befunde (Tabelle 9 und 10). Es bestand eine hochsignifikante Assoziation zwischen geringer oder fehlender CK18-Expression und hohem Malignitätsgrad, negativem Östrogenrezeptorstatus (ER), negativem Progesteronrezeptorstatus (PR) und Vorliegen eines sog. Tripel-negativen-Karzinoms (negativ für ER, PR, Her2/neu) (jeweils p<0,0001). Kein signifikanter Zusammenhang bestand allerdings für die Beziehung zum Tumorstadium, dem Nodalstatus und dem Vorliegen oder Fehlen von nachgewiesenen Fernmetastasen. Die Untersuchung der Beziehung mit Rohüberlebensdaten, welche von 501 Patientinnen vorlagen, ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen CK18-Expression und Patientenprognose (Abbildung 55) (p=0,8054).



Abbildung 55 Statistisch nicht signifikanter Zusammenhang zwischen Gesamtüberleben und Ergebnissen der CK18-Immunhistochemie beim Mammakarzinom NST.

				%	% mäßig	%	
		Anzahl	%	schwach	stark	stark	P-Wert
			negativ	positiv	positiv	positiv	
Alle		1.135	4,4	22,5	24,7	48,4	
Histologie	NST	935	3,6	22,2	23,9	50,3	0,0005
	Lobulär	123	0,8	26,0	32,5	40,7	
	Andere	40	16,7	25,0	25,0	33,3	
T-Stadium	pT1	578	5,0	20,1	26,0	49,0	0,4171
	pT2	415	3,4	24,8	23,9	48,0	
	рТ3-4	102	5,9	18,6	22,6	52,9	
Grading	G1	169	0,6	17,2	21,9	60,4	<0,0001
	G2	615	2,0	20,5	27,8	49,8	
	G3	347	10,4	28,5	20,5	40,6	
Nodalstatus	pN0	545	3,7	20,7	25,5	50,1	0,4681
	pN1	212	1,4	23,6	29,3	45,8	
	pN2	77	5,2	20,8	27,3	46,8	
	pN3	66	4,6	21,2	18,2	56,1	
Fernmetastasierung	pM0	242	4,6	23,6	31,4	40,5	0,6481
	pM1	111	4,5	27,9	25,2	42,3	
Her2-Status	Negativ	831	4,9	20,7	22,9	51,5	0,1198
	Positiv	97	1,0	17,5	28,9	52,6	
ER-Status	Negativ	189	18,0	31,2	22,8	28,0	<0,0001
	Positiv	685	0,6	16,8	24,1	58,5	
PR-Status	Negativ	370	10,0	27,0	23,5	39,5	<0,0001
	Positiv	548	0,7	16,6	23,7	58,9	
Tripel-Negativ	Nein	715	1,0	17,3	23,6	58,0	<0,0001
	Ja	128	24,2	35,2	21,1	19,5	

Tabelle 9 Ergebnisse der CK18-Immunhistochemie aller untersuchten Mammakarzinome im Vergleich mit histopathologischen und molekularen Parametern.

			%	%	% mäßig	%	
		Anzahl	negativ	schwach	stark	stark	P-Wert
			U	positiv	positiv	positiv	
NST-Karzinome		935	3,6	22,2	23,9	50,3	
T-Stadium	pT1	497	4,2	18,9	25,0	51,9	0,0611
	pT2	333	2,4	26,1	23,7	47,8	
	рТ3-4	73	6,9	19,2	16,4	57,5	
Grading	G1	147	0,0	16,3	21,1	62,6	<0,0001
	G2	479	2,1	19,0	26,7	52,2	
	G3	308	7,8	30,2	20,5	41,6	
Nodalstatus	pN0	439	3,2	20,1	23,9	52,9	0,6092
	pN1	184	1,6	25,0	28,3	45,1	
	pN2	68	5,9	20,6	25,0	48,5	
	pN3	47	2,1	19,2	17,0	61,7	
Fernmetastasierung	pM0	197	4,1	23,9	30,5	41,6	0,7656
	pM1	93	4,3	29,0	25,8	40,9	
Her2-Status	Negativ	697	4,0	20,8	22,0	53,2	0,1689
	Positiv	89	1,1	18,0	30,3	50,6	
ER-Status	Negativ	160	15	33,8	23,1	28,1	<0,0001
	Positiv	589	0,5	16,6	22,8	60,1	
PR-Status	Negativ	308	8,8	28,6	24,0	38,6	<0,0001
	Positiv	472	0,4	15,7	22,7	61,2	
Tripel-Negativ	Nein	619	0,8	17,5	22,5	59,3	<0,0001
	Ja	107	20,6	37,4	21,5	20,6	

Tabelle 10 Ergebnisse der CK18-Immunhistochemie der NST-Mammakarzinome im Vergleich mit histopathologischen und molekularen Parametern.

3.4.3 Urothelkarzinom

1.328 von 1.712 untersuchten Urothelkarzinomen (77,6%) waren bezüglich CK18 auswertbar. Davon waren 37,6% negativ, 26,3% schwach positiv, 16,9% mäßig stark positiv und 19,2% stark positiv. Bei gleichzeitiger statistischer Evaluation aller Tumoren ergaben sich hochsignifikante Befunde sowohl beim Vergleich der Kategorien pTa G2 low, pTa G2 high, pTa G3 und pT2-4 (p<0,0001) (Tabelle 11), als auch bei der Unterscheidung der Kategorien pTa G2 low, pTa G2 high, pTa G3 und pT4 (p=0,0005) (Tabelle 11). Bei separater Untersuchung von muskelinvasiven Tumoren zystektomierter Patienten ergaben sich allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen 139 Tumoren mit pT2, 230 Tumoren mit pT3 und 109 Tumoren mit pT4 (p=0,2047) (Tabelle 11). In dieser Untergruppe fanden sich auch keine Unterschiede in der CK18-Expression zwischen nodal-positiven und -negativen Tumoren.

		Anzahl	% negativ	% schwach positiv	% mäßig stark positiv	% stark positiv	P-Wert
ienten	Alle	1.328	37,6	26,3	16,9	19,2	
⊃at	pTa G2 low	109	41,3	11,9	23,9	22,9	<0.0001
e	pTa G2 high	100	36,0	20,0	24,0	20,0	,
A	pTa G3	144	18,8	27,8	24,3	29,2	
	pT2-4 G3	921	39,9	28,0	14,8	17,4	
e Patienten	pTa G2 low pTa G2 high pTa G3 pT2	109 100 144 139	41,3 36,0 18,8 36 7	11,9 20,0 27,8 22 3	23,9 24,0 24,3 18,0	22,9 20,0 29,2 23.0	0,0005
AII	pT2 pT3	230	33.9	26.1	10,0	20,0	
c	pT4	109	27,5	34,9	11,9	25,7	
nierte Patiente	рТ2 рТ3 рТ4	139 230 109	36,7 33,9 27,5	22,3 26,1 34,9	18,0 19,1 11,9	23,0 20,9 25,7	0,2047
Zystekton	pN0 pN+	293 170	36,5 27,6	26,6 29,4	16,7 18,2	20,1 24,7	0,2540

Tabelle 11 Ergebnisse der CK18-Immunhistochemie für Urothelkarzinome unterschiedlicher Tumorphänotypen.

3.4.4. Plattenepithelkarzinom

Von einem Teil der untersuchten Plattenepithelkarzinomen waren Daten zum pT-Stadium (n=230), zur Differenzierungsgrad (n=209) und zum Nodalstatus (n=187) vorhanden. Es handelt sich dabei um ein gemischtes Patientenkollektiv aus 26 plattenepithelialen Analkarzinomen, 9 Plattenepithelkarzinomen 39 plattenepithelialen der Haut. Larynxkarzinomen, 33 plattenepithelialen Mundbodenkarzinomen, 63 Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus, 8 Plattenepithelkarzinomen der Vagina, 30 Plattenepithelkarzinomen der Vulva und 36 Plattenepithelkarzinomen der Zervix uteri. Angesichts der heterogenen Zusammensetzung (n=8) sind die an der Kohorte erhobenen statistischen Daten nicht uneingeschränkt aussagekräftig. Es fällt aber auf, das eine CK18-Positivität tendenziell mit einem erhöhten Tumorstadium (p=0,0154), einem hohen Entdifferenzierungsgrad (p=0,0767) und einem positiven Nodalstatus (p=0,0354) assoziiert ist. Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 12 und Abbildung 56 dargestellt.

	Anzahl	% negativ	% schwach positiv	% stark positiv	P-Wert
pT1-2	136	86,8	9,6	3,7	0,0154
рТ3-4	94	72,3	23,4	4,3	
G1-2	134	85,1	11,9	3,0	0,0767
G3	75	72,0	21,3	6,7	
pN0	95	85,3	13,7	1,1	0,0354
pN+	92	73,9	18,5	7,6	

Tabelle 12 Ergebnisse der CK18-Immunhistochemie für die untersuchten, auswertbaren Plattenepithelkarzinome im Vergleich mit histopathologischen Parametern.



Abbildung 56 Gestapeltes Säulendiagramm zur Visualisierung o.g. Daten bei Plattenepithelkarzinomen.

4. Diskussion

Die erfolgreiche Untersuchung von 11.952 Tumoren mittels Immunhistochemie ergab einen umfassenden Überblick über Häufigkeit und Bedeutung der CK18-Expression in den untersuchten Tumortypen. Das wertvollste Ergebnis der Untersuchung ist eine Rangliste zur Häufigkeit der CK18-Positivität über eine breite Palette von Tumorentitäten. Die S-förmige Kurvenform zur CK18-Expressionshäufigkeit über die 115 untersuchten Tumortypen und Subtypen unterstreicht die Tatsache, dass viele Tumorarten CK18 praktisch immer exprimieren und viele andere Tumorarten CK18 nie oder nur sehr selten exprimieren. Das Färbeverhalten der Tumoren reflektiert im Wesentlichen die Verhältnisse in den entsprechenden Ausgangsgeweben: Tumoren, die von CK18-positiven Zellen ausgehen sind in der Regel CK18-positiv und Tumoren, die von CK18-negativen Ausgangszellen abstammen sind CK18-negativ. Zu den Tumorentitäten mit einer CK18-Positivität in mehr als 97% der Fälle gehören insbesondere Adenokarzinome aus dem Gastrointestinaltrakt und der Prostata. Sporadische CK18-negative Fälle, welche in diesen Tumoren in $\leq 3\%$ der Proben auftreten sind am ehesten durch technische Probleme zu erklären. Die faktische Unmöglichkeit die Gewebebehandlung und Fixation zu standardisieren ist ein wesentlicher Grund für gelegentliche falsch-negative oder falsch-positive immunhistochemische Befunde. (Tapia et al. 2004) Die Formalinfixation führt zu einer Vernetzung von Proteinen (sog. Crosslinking), welche umso ausgeprägter auftritt, je länger die Fixation dauert und je höher die Formalinkonzentration ist. (Thavarajah et al. 2012) Die Parameter Fixationsdauer und Formalinkonzentration unterliegen beide Schwankungen. Die Fixationsdauer wird nicht nur dadurch bestimmt, wie lange ein entnommenes Organ in einem formalingefüllten Topf liegt, sondern auch dadurch, wann das am Ende immunhistochemisch untersuchte Gewebeareal von Formalin erreicht wird. Insbesondere bei voluminösen Organen dauert es mehrere Stunden, bis zentral im Präparat liegende Gewebeanteile von Formalin erreicht werden. (Start et al. 1992) Die Exposition gegenüber Formalin variiert also innerhalb eines Gewebestückes grundsätzlich. Die Penetrationsgeschwindigkeit des Formalin in das Gewebe hängt auch von der Gewebebeschaffenheit ab. Fettgewebe und Gewebe mit fibröser Kapsel werden besonders langsam durchdrungen. (Tennstedt und Sauter 2010) Die Formalinkonzentration hängt vom Verhältnis Formalinmenge/Gewebemenge im Transportgefäß ab. Idealerweise sollte zehnmal mehr Formalin als Gewebe in einem Transportgefäß sein. (Dirnhofer et al. 2011)Dieser Wert wird aber meistens nicht erreicht. Bei zu geringen Formalinmengen wird die Konzentration des Formalins durch im Präparat vorhandene "Gewebesäfte" (Blut, Lymphe) oder Organinhalte (Darminhalt, Urin, Galle) verdünnt. Während die genannten präanalytischen Probleme bei Arbeit an humanen, zum Zweck der Diagnostik entnommenen Gewebeproben nicht zu vermeiden sind,

könnten bei der Durchführung einer Studie theoretisch auch "Fehler" der bei immunhistochemischen Untersuchung von Geweben auftreten. Falsche immunhistochemische Ergebnisse aufgrund von technischen Fehlern sind aber bei TMA-Studien besonders unwahrscheinlich. Das besonders hohe Ausmaß der Standardisierung ist ein großer Vorteil der TMA-Technik. Die ganze Studie machte die Färbung von 38 TMA-Schnitten notwendig. Die gesamten Färbungen fanden an einem Tag statt, in den gleichen Reagenzien, bei identischen Temperaturen und Expositionszeiten. Auch oft unberücksichtigte Parameter mit Einfluss auf die immunhistochemische Färbung sind bei TMA-Studien weitestgehend standardisiert. Dazu gehören die Schnittdicke und das Schnittalter. Letzter Parameter ist von besonderer Bedeutung, denn Studien haben gezeigt, dass die Intensität einer immunhistochemischen Färbung mit einer zunehmenden Lagerungsdauer von Schnitten -zumindest für viele Antikörper- stark abnimmt und dass dieser Effekt bereits nach einer Lagerungsdauer von zwei Wochen deutlich erkennbar ist. (Mirlacher et al. 2004) Da in unserem Projekt sämtliche Schnitte der Studie an einem Tag hergestellt wurden und wenige Tage später an einem Tag gefärbt wurden, wurde auch in dieser Hinsicht eine optimale Standardisierung erreicht. Es ist hervorzuheben, dass eine Standardisierung der Schnittlagerungszeit bei immunhistochemischen Studien an großen Patientenkollektiven nur durch das TMA-Verfahren gewährleistet werden kann. Dass Artefaktbedingte falsch negative IHC-Färbungen in TMA-Studien nicht zu vermeiden sind, haben auch kürzlich Studien von Fraune et al. gezeigt. Dabei wurde bei hunderten von Harnblasen-, Pankreas-, ovarial, und fortgeschrittenen Prostatakarzinomen an TMAs mittels IHC nach mikrosatelliteninstabilen Fällen gesucht. (Fraune et al. 2020a; Fraune et al. 2020b; Fraune et al. 2020c; Fraune et al. 2020d) Die weitere Evaluation von am TMA identifizierten Fällen mit einem fehlenden Nachweis einer Mismatch-Repair-Proteinexpression am TMA-Spot hatte in ca. der Hälfte der Fälle ergeben, dass falsch-negative Immunfärbungen vorlagen. In allen diesen Fällen hatte der entsprechende Großschnitt einen typischen "Fixationsgradienten" gezeigt, mit kräftiger Färbung in einem Bereich des Schnittes, welche dann kontinuierlich/graduell überging in Bereiche mit komplett fehlender Färbung. (Fraune et al. 2020d)

Aufgrund der dargelegten technischen Erwägungen gehen wir davon aus, dass CK18 in Adenokarzinomen des Gastrointestinaltrakts und in Prostatakarzinomen obligat exprimiert wird. Dies würde bedeuten, dass eine Herabregulierung von CK18 in diesen Organen nicht mit einer Adenokarzinom-Morphologie vereinbar wäre.

Eine weitere Gruppe von Neoplasien zeigte variable CK18-Immunfärbemuster, einschließlich einer jeweils signifikanten Anzahl von Patienten mit CK18-Positivität und mit CK18-Negativität.

Die Tumortypen mit derart heterogenen Befunden lassen sich grundsätzlich in mindestens vier Kategorien unterteilen. Kategorie 1) sind Tumoren, welche sich von CK18-positiven Vorläuferzellen ableiten, wo es aber in einem Teil der Tumoren zu einer Herabregulierung der CK18-Expression kommt. Kategorie 2) sind Tumoren, die sich von CK18-negativen Vorläuferzellen ableiten, wo es dann aber zu einer CK18-Hochregulierung in einem Teil der Fälle kommt. Kategorie 3) sind Tumoren, welche sich von Geweben ableiten, bei denen die CK18-Expression variabel gestaltet ist, wie beispielsweise dem Urothel oder im Leberparenchym. Kategorie 4) sind Tumoren mit einer gemischten Differenzierung. Zur letzteren Gruppe gehören Karzinome mit einer gemischten glandulären-plattenepithelialen Differenzierung, wie beispielsweise endometrioide Endometriumkarzinome oder aber epithelial-mesenchymal differenzierte Tumoren, wie maligne Müller'sche Mischtumoren, Phylloides Tumoren der Mamma, Teratome des Hodens oder maligne Mesotheliome. Bei diesen Tumoren ist es aufgrund der Normalgewebebefunde zu erwarten, dass mesenchymal differenzierte Gewebe oder plattenepithelial differenzierte Tumoranteile CK18-negativ sind, während anders differenzierte epitheliale Tumorkomponenten CK18-positiv sein sollten. Angesichts des Durchmessers von 0,6 mm pro untersuchter Gewebeprobe, ist bei mischdifferenzierten Tumoren nicht davon auszugehen, dass alle Gewebekomponenten auf jedem TMA-Spot enthalten sind, sodass diese Tumorarten erwartungsgemäß viele CK18-negative und -positive Tumoren enthalten.

Zu den Tumortypen, welche CK18 in einer relevanten Menge von Zellen herunterregulieren, gehört das Nierenzellkarzinom und das Mammakarzinom. Eine echte Herunterregulierung kann in den meisten Fällen einfach von falsch-negativer Färbung aufgrund von technischen Problemen unterschieden werden, weil meistens stark färbende Normalzellen in den gleichen Gewebespots als Positivkontrolle vorhanden sind. Das Vorhandensein von klinischen Verlaufsdaten zu unseren Nierenzellkarzinom- und Mammakarzinom-Kohorten erlaubte in diesem Fall die klinische Bedeutung einer verminderten CK18-Immunfärbung zu evaluieren. Bei beiden Tumorarten ergaben sich dabei Hinweise, dass eine CK18-Herunterregulierung mit einem ungünstigen Phänotyp (Mammakarzinom) oder gar mit einer ungünstigen Patientenprognose (Nierenzellkarzinom) vergesellschaftet war. Für das Mammakarzinom hatten bereits früher immunhistochemische Studien auf eine ungünstige prognostische Bedeutung einer verminderten CK18-Expression hingewiesen. Dazu gehört eine Studie, in der Krebsforscher des UKE an einem unabhängigen, nicht-überlappenden Kollektiv von beinahe 1.500 Mammakarzinomen eine signifikante Beziehung zu einer ungünstigen Prognose gefunden hatten. (Woelfle et al. 2004) Die Gesamtheit dieser Daten wäre mit der Annahme vereinbar, dass ein Verlust der CK18-Expression

bei Tumoren, welche aufgrund ihrer Herkunft CK18 eigentlich exprimieren müssten, ein Anhaltspunkt für eine Entdifferenzierung darstellt, welche meist generell mit zunehmender Aggressivität von Tumorzellen einhergeht. Dass mehrere Tumortypen, welche "definitionsgemäß" wenig differenziert sind, wie kleinzellige Karzinome oder anaplastische Schilddrüsenkarzinome deutlich geringere CK18-Positivitätsraten aufwiesen, als besser differenzierte Tumoren der gleichen Organe, ist ebenfalls mit dem Konzept eines CK18-Expressionsverlustes im Rahmen der Tumorprogression zu vereinbaren.

Plattenepithelkarzinome stellen das beste Beispiel für epitheliale Tumortypen dar, welche normalerweise CK18-negativ sind, aber dennoch in einem kleinen Teil der Fälle CK18 hochregulieren können. Obwohl CK18 in keinem der untersuchten normalen Plattenepithelproben von Mundhöhle, Lippe, Haut, Ösophagus, Vagina, Zervix uteri oder Analhaut nachweisbar war, fand sich unter identischen experimentellen Bedingungen bei Plattenepithelkarzinomen regelmäßig eine CK18-Positivität in einem Teil der Fälle. Der Anteil CK18-positiver Plattenepithelkarzinome war in unserer Studie im Durchschnitt aller Organe 24,2%. Dass die CK18-Immunfärbung in einigen dieser Plattenepithelkarzinome sehr stark ausgeprägt war (so z.B. in Abbildung 47, S. 54, Plattenepithelkarzinom der Zervix uteri) spricht stark dafür, dass in diesen Tumoren eine echte Überexpression stattfindet und nicht etwa eine schwache unspezifische, möglicherweise artifizielle Anfärbung. Analog zum Expressionsverlust in ursprünglich CK18-positiven Geweben, gehen wir davon aus, dass eine CK18-Überexpression in ursprünglich CK18-negativen Geweben ein Indiz für eine zunehmende Dedifferenzierung der betroffenen Tumoren darstellt. Diese Hypothese wird durch die vermehrte CK18-Positivität in Tumoren mit einem hohen pT-Stadium und mit nodalen Metastasen unterstützt, welche sich bei der kombinierten Analyse der zur Verfügung stehenden Plattenepithelkarzinome mit diesbezüglichen Daten fand. Der Befund passt auch gut zu Daten von früheren Studien anderer Untersucher, welche jeweils größere Kollektive von Plattenepithelkarzinomen auf die Expression von CK18 untersucht hatten und Beziehungen zwischen CK18-Positivität und ungünstiger Patientenprognose oder Parametern einer erhöhten Tumoraggressivität gefunden hatten. (Afrem et al. 2016; Broers et al. 1988; Makino et al. 2009; Nanda et al. 2012; Nhung et al. 1999; Safadi et al. 2019; Yang et al. 2018)

Die Rolle von CK18 ist weniger klar bei Tumorentitäten, welche sich von Geweben mit variabler CK18-Expression ableiten, wie beispielsweise bei Leber- und Harnblasenkarzinomen. Bei beiden Normalorganen besteht ein zonaler Expressionsgradient, wobei beim Urothel die ausreifenden

Zellen weniger CK18 exprimieren als die Deckzellen und bei der Leber die periportalen Zellen mehr als die zentrolobulären Zellen. Die Befunde im Normalgewebe deuten darauf hin, dass die CK18-Expression bei bestimmten Zelltypen von der aktuellen metabolischen oder funktionellen Situation einer Zelle abhängen kann. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der bekannten Rolle von CK18 in der Regulation des intrazellulären Adenosintriphosphat (ATP) liegen, in dem es Phosphatreserven bindet, welche für die metabolische Funktion in Hepatozyten benötigt werden. Da CK18 auch eine Rolle bei der Gallensäuresekretion in biliären Epithelzellen spielen soll, könnten die topographischen Besonderheiten der CK18-Expression in der Leber auch durch regionale Unterschiede in der Galleproduktion erklärt werden. (Omary und Ku 1997) Die Analyse von 1.328 Urothelkarzinomen hatte immerhin zur Identifikation von 37,6% komplett negativen Harnblasenkarzinomen und 19,2% Harnblasenkarzinomen mit kräftiger Expression geführt. Dass sich auch zwischen diesen beiden bezüglich CK18-Expression stark unterschiedlichen Gruppen keine signifikanten Unterschiede im Tumorphänotyp von durch Zystektomie behandelten Karzinomen fanden, wäre damit zu vereinbaren, dass CK18 per se keinen direkten Einfluss auf die Aggressivität von Tumorzellen ausübt. (Castillo-Martin et al. 2010)

Die vorliegende Untersuchung ist die ausgedehnteste jemals zur CK18-Expression durchgeführte Studie. Sie wurde möglich durch die Vorzüge der TMA-Technik und den Vorarbeiten zahlreicher anderer Forscher und Doktoranden, welche in den letzten Jahren am Institut für Pathologie des UKE zahlreiche TMAs angefertigt hatten. Im Rahmen der Studie wurden 20.000 Gewebeproben untersucht. Der technische Aufwand war gering. Eine medizinisch-technische Assistentin (MTA) fertigte an einem Tag die TMA-Schnitte an und färbt diese an einem anderen Tag innerhalb von wenigen Stunden. Die Reagenzienkosten (10€ pro Schnitt) beliefen sich auf ca. 400€. Die Auswertung durch einen Pathologen dauerte weniger als zwei Tage. Wäre die gleiche Studie an konventionellen Großschnitten durchgeführt worden, hätten allein die Reagenzienkosten ca. 200.000€ betragen und eine MTA hätte zur Anfertigung der 20.000 Gewebeschnitte mindestens 50-60 Arbeitstage benötigt.

Die durch diese Studie zusammengetragenen Befunde erlauben eine umfassende Beurteilung der möglichen diagnostischen Applikationen der CK18 Immunhistochemie. Die beinahe hundertprozentige Prävalenz der CK18-Expression in gastrointestinalen Tumoren unterstützt das Konzept, eine CK18-Immunhistochemie zur Suche nach Mikrometastasen in Lymphknoten bei Kolonkarzinomen zu verwenden. (Makino et al. 2009; Oshima et al. 1996) Auch die hundertprozentige Positivitätsrate in fortgeschrittenen Prostatakarzinomen könnte diagnostisch

genutzt werden. Der serologische Nachweis von "abgespaltenem" (cleaved) CK18 hat sich bei anderen Tumoren zur Verlaufsbeobachtung oder gar Früherkennung als geeignet erwiesen. (Dive et al. 2010; Olofsson et al. 2007; Oyama et al. 2013) Das gleiche Vorgehen könnte bei fortgeschrittenen Prostatakarzinomen, bei denen kein PSA mehr exprimiert wird, verfolgt werden. Die bedeutendste diagnostische Anwendung der CK18-Immunhistochemie dürfte bei der Unterscheidung von Seminomen zu anderen Keimzelltumoren des Hoden liegen. Nur 12 von 204 analysierten Seminomen (5,9%), aber 100% der 88 untersuchten embryonalen Karzinome und Dottersacktumoren des Hodens zeigten eine CK18-Expression. Dieser Befund passt zu den Daten einer früheren Studie von Biermann et al., bei der ein RNA-Expressionsscreening bei Hodentumoren durchgeführt wurde. (Biermann et al. 2007) In dieser Studie wurde CK18 als eine der wesentlichsten Unterscheidungsmerkmale von seminomatösen vs. nicht-seminomatösen Keimzelltumoren des Hoden identifiziert. Tatsächlich werden Pan-Cytokeratin-Antikörper oft zum Ausschluss eines Seminoms verwendet. Studien, welche über die Färbeergebnisse mit Pan-Cytokeratin-Antikörpern bei Seminomen berichtet hatten, hatten Positivitätsraten von 10-42% publiziert. (Cheville et al. 2000; Eglen und Ulbright 1987; Niehans et al. 1988) Das sind Werte, die deutlich über unseren Ergebnissen liegen. Es ist möglich, dass ein spezifischerer Antikörper, der nur ein einzelnes Cytokeratin erkennt, wie beispielsweise CK18, eine bessere Spezifität für die genannte Differentialdiagnose erzielt.

Es ist eine wichtige Limitierung unserer Studie, dass alle beschriebenen Prävalenzen nur für die verwendeten Reagenzien und Protokolle gelten, die in unserem Labor verwendet wurden. Es kann als sicher angenommen werden, dass die Verwendung anderer Antikörper, anderer Protokolle und Interpretationskriterien für die insgesamt sehr variablen Literaturdaten über die CK18-Expression bei Karzinomen verantwortlich sind. Die Daten der Literatur sind neben unseren eigenen Befunden in Abbildung 57 dargestellt. Es ist mittlerweile gut bekannt, dass unterschiedliche Antikörper, welche für das gleiche Zielprotein hergestellt worden sind, sich in ihren Bindungseigenschaften erheblich unterscheiden können und das Protokollmodifikationen einen großen Einfluss auf die Zahl der als positiv gefundenen Fälle ausüben. (Andersson et al. 2017; Saper 2009; Sugai et al. 2008)

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Untersuchung, dass CK18 bei einer Vielzahl verschiedener Tumoren, insbesondere bei Adenokarzinomen konstant exprimiert wird. Der Verlust der CK18-Expression bei Karzinomen, welche sich von CK18-positiven Vorläuferzellen ableiten, und die Neoexpression von CK18 in Tumoren, welche sich von CK18-negativen

Vorläuferzellen ableiten sind jeweils mit einer ungünstigen Patientenprognose und einem aggressiven Tumorphänotyp assoziiert. Wir postulieren, dass eine aberrante CK18-Expression in diesen Tumoren ein Surrogatbefund für eine Tumorentdifferenzierung darstellt. Die wichtigsten diagnostischen Anwendungen der CK18-Immunhistochemie dürften im immunhistochemischen Metastasennachweis bei gastrointestinalen- und Prostatakarzinomen, sowie der Abgrenzung von Seminomen zu anderen Keimzelltumoren liegen.



Abbildung 57 Vergleich der Ergebnisse der CK18 TMA-Studie mit Daten aus der Literatur.



Abbildung 57 Fortsetzung: Vergleich der Ergebnisse der CK18 TMA-Studie mit Daten aus der Literatur.
5. Zusammenfassung

CK18 ist ein Intermediärfilamentprotein aus der Gruppe der sauren (Typ I) Cytokeratine, welches typischerweise in einschichtigen Epithelien und davon abgeleiteten Karzinomen exprimiert wird. Die CK18-Expression kann diagnostisch für die Zuordnung einer Neoplasie zu einem möglichen Primärtumor genutzt werden. Darüber hinaus kommt der CK18-Expression bei verschiedenen Tumoren möglicherweise prognostische Bedeutung zu. Um die diagnostische und prognostische Relevanz der CK18-Expression in normalen und neoplastischen Geweben systematisch zu analysieren, wurde ein TMA bestehend aus 14.579 Tumorgewebeproben von 115 verschiedenen Tumortypen und Subtypen untersucht. Simultan wurden 608 Normalgewebeproben von 76 verschiedenen Normalgewebstypen immunhistochemisch untersucht. CK18 war in Epithelzellen zahlreicher Organe exprimiert, einschließlich beispielsweise Magen, Kolon, Mamma und Prostata. Von 115 untersuchten Tumorentitäten war bei 90 (76,1%) zumindest in einem Fall eine schwache CK18-Positivität nachweisbar, in 78 (67,8%) der Neoplasie-Typen war mindestens ein Tumor stark positiv. Die Sortierung der Tumortypen nach der Häufigkeit einer nachweisbaren CK18-Expression ergab einen S-förmigen Kurvenverlauf. 37 (32,2%) der untersuchten Tumortypen waren in ≥97% der Fälle CK18-positiv. Weitere 11 (9,6%) der Tumorentitäten waren in 90-97% der Fälle positiv und 37 (32,2%) der Tumorentitäten waren in <20% der Fälle CK18positiv. Lediglich 30 Tumorentitäten (26,1%) zeigten eine Positivität zwischen 21% und 90% der Fälle. Der Vergleich von Befunden in Tumorzellen mit dem Expressionsmuster von CK18 in entsprechenden Normalgeweben ergab bei Tumortypen mit gemischten Befunden vier verschiedene Konstellationen mit unterschiedlicher klinisch-biologischer Relevanz. Gruppe 1) beinhaltet Tumoren, bei denen in einem Teil der Fälle die CK18-Expression des Ausgangsgewebes verloren gegangen ist. Hierzu gehören beispielsweise Mammakarzinome (CK18-negativ in 3,7% der Fälle) und klarzellige Nierenzellkarzinome (CK18-negativ in 47,5% der Fälle). Gruppe 2) beinhaltet Tumoren, welche von CK18 negativen Normalgeweben ausgehen und in einem Teil der Fälle eine Neoexpression von CK18 ausbilden. Hierzu gehören verschiedene Plattenepithelkarzinome. Gruppe 3) beinhaltet Tumoren, welche von Zelltypen ausgehen, die physiologischerweise eine variable CK18-Expression aufweisen, wie beispielsweise Leberzellen oder Urothelien. In hepatozellulären Karzinomen und Urothelkarzinomen fanden sich entsprechend zahlreiche eindeutig negative und auch stark CK18-positive Tumoren. Die biologische Bedeutung dieser Untergruppen ist unklar. Gruppe 4) beinhaltet mischdifferenzierte Tumoren wie endometrioide Karzinome mit plattenepithelial und endometrioid differenzierten Anteilen oder epithelial-mesenchymale Tumoren wie beispielsweise Maligne Müller'sche Mischtumoren. In diesen Tumoren kam es, je nachdem ob im 0,6 mm messenden Gewebeabschnitt endometrioide oder epitheliale Strukturen vorhanden waren, zu Fällen mit und ohne CK18-Positivität.

Der Vergleich mit klinischen Daten und histopathologischen Malignitätskriterien zeigte, dass sowohl der Expressionsverlust von CK18, wie auch die Neoexpression von CK18 mit ungünstigem Tumorphänotyp und ungünstiger Patientenprognose assoziiert waren. Aus den Daten wird geschlossen, dass CK18 bei vielen Tumorarten, insbesondere Adenokarzinomen des Gastrointestinaltrakts und Prostatakarzinomen ein stabil exprimiertes Protein ist, welches für den immunhistochemischen Nachweis von Metastasen geeignet ist. Bei denjenigen Tumoren, die eine aberrante Expression von CK18 (Neoexpression oder Expressionsverlust) zeigen, ist dies ein prognostisch ungünstiges Phänomen. Die Verwendung großer TMA-Kohorten ist ein einzigartiges Instrument zur Klärung der diagnostischen und prognostischen Relevanz immunhistochemischer Untersuchungen unter hochstandardisierten Bedingungen.

6. English summary

CK18 is a Type I (acidic) intermediate filament and is primarily expressed in single-layered epithelial tissues and cancers arising from these tissues. Assessment of CK18-expression can be used diagnostically for allocating a neoplasia to a potential primary tumor. Furthermore expression of CK18 may be of prognostic relevance for several tumor entities. A TMA consisting of 14,579 tumor specimens of 115 different tumor types and subtypes has been analysed, in order to systematically investigate the diagnostic and prognostic relevance of CK18-expression. Simultaneously 608 tissue specimens of 76 different normal tissue types have been examined immunohistochemically. CK18 was expressed in epithelial cells of various organs, including for instance stomach, colon, breast and prostate. At least occasional weak CK18-positivity was observed in 90 of 115 (76.1%) analysed tumor entities, in 78 of 115 (67.8%) at least one tumor showed strong positivity. Ranking the tumor entities by prevalence of CK18-expression yielded an s-shaped curve. 37 (32.2%) of the investigated tumor entities displayed CK18-positivity in ≥97% of all analysable cases. Additionally 11 (9.6%) of tumor entities were positive in 90-97% of all cases. On the other hand 37 (32.2%) tumor entities showed CK18-positivity in less than 20% of all cases. Merely 30 (26.1%) of all tumor types stained positively between 21 and 90%. Comparing the findings of CK18-expression patterns in tumor cells vs. normal tissue revealed four distinct groups for tumor types with mixed results. These groups are of divergent clinical and biological relevance. Group 1) comprises of tumors that arise from CK18-positive precursor tissue, but downregulate CK18 in a relevant fraction of cases. This group includes breast cancer (CK18-negative in 3.7% of cases) and clear cell renal cell carcinoma (CK18-negative in 47.5% of cases). Group 2) is composed of tumors that derive from CK18-negative normal tissues and neoexpress CK18 in a part of the cases. This group includes various squamous cell carcinomas. Group 3) comprises tumors, which arise from celltypes, that variably express CK18 physiologically, for instance hepatocytes or urothelia. In examined cases of hepatocellular carcinoma and urothelial carcinoma there were consequently several tumors which were unambiguously negative and others which stained strongly for CK18. Group 4) contains mixed differentiated tumors such as endometrioid carcinoma (fractions of glandular and squamous differentiation) as well as epithelial-mesenchymal tumors such as Malignant Muller Tumors. In the latter there were CK18-positive and -negative cases, depending on whether there were epithelial or mesenchymal fractions present in the 0.6 mm spot.

Comparing results of immunohistochemistry to clinical data suggests, that downregulation or loss of CK18-expression as well as CK18-neoexpression are linked to unfavourable tumor phenotype and unfavourable prognosis. The data shows that CK18 is a protein which is steadily expressed

in many tumor types, especially in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract carcinomas of the prostate. Thus CK18 can be used as a biomarker for immunohistochemical detection of metastases in these two entities. The lack of CK18-expression in seminomas can be helpful in the sometimes challenging distinction from testicular non-seminomatous germ cell tumors. Aberrant CK18-expression (i.e. neoexpression, loss of expression) is associated with unfavourable prognosis in several tumor types. Using large TMA-cohorts is a unique tool for identifying diagnostic and prognostic relevance of immunohistochemical surveys under highly standardised conditions.

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Akt	Proteinkinase B
AP1	Activating protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
	Karzinom
 	circa
	cholangiozelluläres Karzinom
<u>CK</u>	
	Duktales Carcinoma in situ
FLISA	Enzyme_linked Immunosorbent Assay
E Nr /E Nummer	Einsendenummer
	Östrogeprezentor
	Extrazellulär regulierte Kinaso
	EXildZelluldi Teguilette KildSe
<u>FASR</u>	Fas-Rezeptor
G	nistopathologisches Grading
	Gastrointestinaler Stromatumor
<u> </u>	Glandula
HCC	hepatozelluláres Karzinom
HER2	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2
IF	Intermediärfilament
IHC	Immunhistochemie
ISUP	Inernational Society of Urological Pathology
kDa	Kilodalton
<u> </u>	Lymphangioinvasion
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
mm	Millimeter
MPNST	Maligner peripherer Nervenscheidentumor
MTA	Medizinisch-technische*r Assistent*in
MTA	Multitumor-Array
n	Anzahl
n.	nach
NEC	Neuroendokrines Karzinom
neg.	negativ
NET	Neuroendokriner Tumor
NOS	Not otherwise specified (nicht anderweitig spezifiziert)
Nr.	Nummer
NST	No special type (ohne speziellen Typ)
NTA	Normaltissue-Array (Normalgewebe-Array)
0.Q.	oben genannt
PeCa	Plattenepithelkarzinom
pН	Pondus Hydrogenii
PI3k	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC	Phosphoinositid-Phospholipase C
Ma	Fernmetastasen (p=pathologisch, M=Metastase)
pN	Regionäre Lymphknotenmetastasen (p=pathologisch, N=Nodus)
 DOS.	
 PR	Progesteronrezentor
PSA	Prostataspezifisches Antigen
nT	Ausbreitung des Primärtumors (n=nathologisch, T=Tumor)
P 1	β a constantly a continuation of the pathological β is a contract of the pathological β is contract of the pathological β is a contract o

S.	Seite
S.	siehe
siRNA	Silencing Ribonukleinsäure
sog.	sogenannt
ТМА	Tissue-Microarray
UICC	Union for International Cancer Control
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
urspr.	ursprünglich
V	venöse Hämangioinvasion
VS.	versus
z.B.	zum Beispiel

8. Literaturverzeichnis

- Abreu MT, Arnold ET, Chow JY, Barrett KE. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways oppose Fas-induced apoptosis and limit chloride secretion in human intestinal epithelial cells. Implications for inflammatory diarrheal states. The Journal of biological chemistry 2001; 276(50): 47563–47574.
- Afrem MC, CrăiŢoiu Ş, Hîncu MC, Manolea HO, Nicolae V, CrăiŢoiu MM. Study of CK18 and GDF5 immunoexpression in oral squamous cell carcinoma and their prognostic value. Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie 2016; 57(1): 167–172.
- Agaimy A, Kirsche H, Semrau S, Iro H, Hartmann A. Cytokeratin-positive epithelioid angiosarcoma presenting in the tonsil: a diagnostic challenge. Human pathology 2012; 43(7): 1142–1147.
- Akiba J, Nakashima O, Hattori S, Naito Y, Kusano H, Kondo R, Nakayama M, Tanikawa K, Todoroki K, Umeno Y, Nakamura K, Sanada S, Yamaguchi R, Ogasawara S, Yano H. The expression of arginase-1, keratin (K) 8 and K18 in combined hepatocellularcholangiocarcinoma, subtypes with stem-cell features, intermediate-cell type. Journal of clinical pathology 2016; 69(10): 846–851.
- Altaf FJ, Mokhtar GA, Emam E, Bokhary RY, Mahfouz NB, Al Amoudi S, Al-Gaithy ZK. Metaplastic carcinoma of the breast: an immunohistochemical study. Diagnostic pathology 2014; 9: 139.
- Andersson S, Sundberg M, Pristovsek N, Ibrahim A, Jonsson P, Katona B, Clausson C-M, Zieba A, Ramström M, Söderberg O, Williams C, Asplund A. Corrigendum: Insufficient antibody validation challenges oestrogen receptor beta research. Nature communications 2017; 8: 16164.
- Andrä K, Kornacker I, Jörgl A, Zörer M, Spazierer D, Fuchs P, Fischer I, Wiche G. Plectinisoform-specific rescue of hemidesmosomal defects in plectin (-/-) keratinocytes. The Journal of investigative dermatology 2003; 120(2): 189–197.
- Azevedo RS, Almeida OP de, Kowalski LP, Pires FR. Comparative cytokeratin expression in the different cell types of salivary gland mucoepidermoid carcinoma. Head and neck pathology 2008; 2(4): 257–264.
- Balm AJ, Hageman PC, van Doornewaard MH, Groeneveld EM, Ivanyi D. Cytokeratin 18 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. European archives of otorhino-laryngology official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery 1996; 253(4-5): 227–233.
- Bardag-Gorce F, French BA, Nan L, Song H, Nguyen SK, Yong H, Dede J, French SW. CYP2E1 induced by ethanol causes oxidative stress, proteasome inhibition and cytokeratin aggresome (Mallory body-like) formation. Experimental and molecular pathology 2006; 81(3): 191–201.
- Bártek J, Vojtěsek B, Stasková Z, Bártková J, Kerekés Z, Rejthar A, Kovarík J. A series of 14 new monoclonal antibodies to keratins: characterization and value in diagnostic histopathology. The Journal of pathology 1991; 164(3): 215–224.

- Battifora H, Silva EG. The use of antikeratin antibodies in the immunohistochemical distinction between neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma of the skin, lymphoma, and oat cell carcinoma. Cancer 1986; 58(5): 1040–1046.
- Bernal A, Arranz L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. Cellular and molecular life sciences CMLS 2018; 75(12): 2177–2195.
- Biermann K, Heukamp LC, Steger K, Zhou H, Franke FE, Sonnack V, Brehm R, Berg J, Bastian PJ, Muller SC, Wang-Eckert L, Buettner R. Genome-wide expression profiling reveals new insights into pathogenesis and progression of testicular germ cell tumors. Cancer genomics & proteomics 2007; 4(5): 359–367.
- Broers JL, Ramaekers FC, Rot MK, Oostendorp T, Huysmans A, van Muijen GN, Wagenaar SS, Vooijs GP. Cytokeratins in different types of human lung cancer as monitored by chain-specific monoclonal antibodies. Cancer research 1988; 48(11): 3221–3229.
- Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, Matos T, Cordon-Cardo C. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. Urologic oncology 2010; 28(4): 401–408.
- Chen N, Gong J, Chen X, Xu M, Huang Y, Wang L, Geng N, Zhou Q. Cytokeratin expression in malignant melanoma: potential application of in-situ hybridization analysis of mRNA. Melanoma research 2009; 19(2): 87–93.
- Chen Y, Cui T, Yang L, Mireskandari M, Knoesel T, Zhang Q, Pacyna-Gengelbach M, Petersen I. The diagnostic value of cytokeratin 5/6, 14, 17, and 18 expression in human non-small cell lung cancer. Oncology 2011; 80(5-6): 333–340.
- Cheville JC, Rao S, Iczkowski KA, Lohse CM, Pankratz VS. Cytokeratin expression in seminoma of the human testis. American journal of clinical pathology 2000; 113(4): 583–588.
- Chin NW, Zhang R, Nostro DC, Lanks KW. A novel monoclonal antibody to cytokeratin 18 with reactivity toward lung squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of various sites. The American journal of pathology 1992; 140(5): 1061–1069.
- Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. Histopathology 2002; 40(5): 403–439.
- Ciocca V, Bombonati A, Gatalica Z, Di Pasquale M, Milos A, Ruiz-Orrico A, Dreher D, Folch N, Monzon F, Santeusanio G, Perou CM, Bernard PS, Palazzo JP. Cytokeratin profiles of male breast cancers. Histopathology 2006; 49(4): 365–370.
- Coulombe PA, Ma L, Yamada S, Wawersik M. Intermediate filaments at a glance. Journal of cell science 2001; 114(Pt 24): 4345–4347.
- Coulombe PA, Omary MB. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. Current opinion in cell biology 2002; 14(1): 110–122.
- De J, Brown RE. Tissue-microarray based immunohistochemical analysis of survival pathways in nodular sclerosing classical Hodgkin lymphoma as compared with Non-Hodgkin's lymphoma. International journal of clinical and experimental medicine 2010; 3(1): 55–68.
- Dessauvagie BF, Thomas C, Robinson C, Frost FA, Harvey J, Sterrett GF. Validation of mitosis counting by automated phosphohistone H3 (PHH3) digital image analysis in a breast carcinoma tissue microarray. Pathology 2015; 47(4): 329–334.

Dirnhofer ST, Bubendorf L, Lehr H-A, Landau B, Zenklusen H-R. Qualitätsrichtlinien SGPath. Schweizerische Gesellschaft für Pathologie.

https://sgpath.ch/docs/QRL/QR_SGPath_DE_2011.pdf (04.10.2020).

- Dive C, Smith RA, Garner E, Ward T, George-Smith SS, Campbell F, Greenhalf W, Ghaneh P, Neoptolemos JP. Considerations for the use of plasma cytokeratin 18 as a biomarker in pancreatic cancer. British journal of cancer 2010; 102(3): 577–582.
- Eglen DE, Ulbright TM. The differential diagnosis of yolk sac tumor and seminoma. Usefulness of cytokeratin, alpha-fetoprotein, and alpha-1-antitrypsin immunoperoxidase reactions. American journal of clinical pathology 1987; 88(3): 328–332.
- Faridi N, Bathaie SZ, Abroun S, Farzaneh P, Karbasian H, Tamanoi F, Mohagheghi M-A. Isolation and characterization of the primary epithelial breast cancer cells and the adjacent normal epithelial cells from Iranian women's breast cancer tumors. Cytotechnology 2018; 70(2): 625–639.
- Fernandez-Flores A, Cassarino DS. Endocrine mucin-producing sweat gland carcinoma: a study of three cases and CK8, CK18 and CD5/6 immunoexpression. Journal of cutaneous pathology 2015; 42(8): 578–586.
- Fillies T, Werkmeister R, Packeisen J, Brandt B, Morin P, Weingart D, Joos U, Buerger H. Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. BMC cancer 2006; 6: 10.
- Fortier A-M, van Themsche C, Asselin E, Cadrin M. Akt isoforms regulate intermediate filament protein levels in epithelial carcinoma cells. FEBS letters 2010; 584(5): 984–988.
- Fraune C, Burandt E, Simon R, Hube-Magg C, Makrypidi-Fraune G, Kluth M, Büscheck F, Höflmayer D, Blessin NC, Mandelkow T, Li W, Perez D, Izbicki JR, Wilczak W, Sauter G, Schrader J, Neipp M, Mofid H, Daniels T, Isbert C, Clauditz TS, Steurer S. MMR Deficiency is Homogeneous in Pancreatic Carcinoma and Associated with High Density of Cd8-Positive Lymphocytes. Annals of surgical oncology 2020a.
- Fraune C, Rosebrock J, Simon R, Hube-Magg C, Makrypidi-Fraune G, Kluth M, Büscheck F, Höflmayer D, Schmalfeldt B, Müller V, Wölber L, Witzel I, Paluchowski P, Wilke C, Heilenkötter U, Leffern I von, Clauditz TS, Wilczak W, Sauter G, Steurer S, Burandt E. High homogeneity of MMR deficiency in ovarian cancer. Gynecologic oncology 2020b; 156(3): 669–675.
- Fraune C, Simon R, Höflmayer D, Möller K, Dum D, Büscheck F, Hube-Magg C, Makrypidi-Fraune G, Kluth M, Hinsch A, Burandt E, Clauditz TS, Wilczak W, Sauter G, Steurer S. High homogeneity of mismatch repair deficiency in advanced prostate cancer. Virchows Archiv an international journal of pathology 2020c; 476(5): 745–752.
- Fraune C, Simon R, Hube-Magg C, Makrypidi-Fraune G, Kähler C, Kluth M, Höflmayer D,
 Büscheck F, Dum D, Luebke AM, Burandt E, Clauditz TS, Wilczak W, Sauter G, Steurer S.
 MMR deficiency in urothelial carcinoma of the bladder presents with temporal and spatial homogeneity throughout the tumor mass. Urologic oncology 2020d; 38(5): 488–495.
- Galarneau L, Loranger A, Gilbert S, Marceau N. Keratins modulate hepatic cell adhesion, size and G1/S transition. Experimental cell research 2007; 313(1): 179–194.
- Gilbert S, Loranger A, Daigle N, Marceau N. Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. The Journal of cell biology 2001; 154(4): 763–773.

- Gilbert S, Loranger A, Marceau N. Keratins modulate c-Flip/extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 antiapoptotic signaling in simple epithelial cells. Molecular and cellular biology 2004; 24(16): 7072–7081.
- Goddard MJ, Wilson B, Grant JW. Comparison of commercially available cytokeratin antibodies in normal and neoplastic adult epithelial and non-epithelial tissues. Journal of clinical pathology 1991; 44(8): 660–663.
- Goodman SL. The antibody horror show: an introductory guide for the perplexed. New biotechnology 2018; 45: 9–13.
- Haines RL, Lane EB. Keratins and disease at a glance. Journal of cell science 2012; 125(Pt 17): 3923–3928.
- He L, Deng L, Zhang Q, Guo J, Zhou J, Song W, Yuan F. Diagnostic Value of CK-18, FGF-21, and Related Biomarker Panel in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. BioMed research international 2017; 2017: 9729107.
- Hsu J-D, Yao C-C, Lee M-Y, Kok L-F, Wang P-H, Tyan Y-S, Han C-P. True cytokeratin 8/18 immunohistochemistry is of no use in distinguishing between primary endocervical and endometrial adenocarcinomas in a tissue microarray study. International journal of gynecological pathology official journal of the International Society of Gynecological Pathologists 2010; 29(3): 282–289.
- Hurlimann J, Gardiol D. Immunohistochemistry in the differential diagnosis of liver carcinomas. The American journal of surgical pathology 1991; 15(3): 280–288.
- Kim MA, Lee HS, Yang H-K, Kim WH. Cytokeratin expression profile in gastric carcinomas. Human pathology 2004; 35(5): 576–581.
- Kim S, Coulombe PA. Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. Genes & development 2007; 21(13): 1581–1597.
- Knösel T, Emde V, Schlüns K, Schlag PM, Dietel M, Petersen I. Cytokeratin profiles identify diagnostic signatures in colorectal cancer using multiplex analysis of tissue microarrays.
 Cellular oncology the official journal of the International Society for Cellular Oncology 2006; 28(4): 167–175.
- Koelink PJ, Lamers CB, Hommes DW, Verspaget HW. Circulating cell death products predict clinical outcome of colorectal cancer patients. BMC cancer 2009; 9: 88.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nature medicine 1998; 4(7): 844–847.
- Kouklis PD, Hutton E, Fuchs E. Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins. The Journal of cell biology 1994; 127(4): 1049–1060.
- Kramer G, Erdal H, Mertens HJMM, Nap M, Mauermann J, Steiner G, Marberger M, Bivén K, Shoshan MC, Linder S. Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18. Cancer research 2004; 64(5): 1751– 1756.
- Kriho VK, Yang HY, Moskal JR, Skalli O. Keratin expression in astrocytomas: an immunofluorescent and biochemical reassessment. Virchows Archiv an international journal of pathology 1997; 431(2): 139–147.
- Ku NO, Wright TL, Terrault NA, Gish R, Omary MB. Mutation of human keratin 18 in association with cryptogenic cirrhosis. The Journal of clinical investigation 1997; 99(1): 19–23.

- Lai Y-S, Cheng C-C, Lee M-T, Chao W-T, Lai Y-CC, Hsu Y-H, Liu Y-H. The Prognostic Value of Cytokeratin and Sal-Like Protein 4 Expression in Hepatocellular Carcinoma and Intra-Hepatic Cholangiocarcinoma in Taiwan. International journal of medical sciences 2018; 15(14): 1746–1756.
- Lam KY, Lui MC, Lo CY. Cytokeratin expression profiles in thyroid carcinomas. European journal of surgical oncology the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology 2001; 27(7): 631–635.
- Lane EB, Alexander CM. Use of keratin antibodies in tumor diagnosis. Seminars in cancer biology 1990; 1(3): 165–179.
- Leech SH, Evans CA, Shaw L, Wong CH, Connolly J, Griffiths JR, Whetton AD, Corfe BM. Proteomic analyses of intermediate filaments reveals cytokeratin8 is highly acetylated-implications for colorectal epithelial homeostasis. Proteomics 2008; 8(2): 279–288.
- Leers MP, Kölgen W, Björklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Björklund P, Ramaekers FC, Björklund B, Nap M, Jörnvall H, Schutte B. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. The Journal of pathology 1999; 187(5): 567–572.
- Levy R, Czernobilsky B, Geiger B. Cytokeratin polypeptide in gastrointestinal adenocarcinomas displaying squamous differentiation. Human pathology 1992; 23(6): 695–702.
- Li X-M, Huang W-G, Yi H, Cheng A-L, Xiao Z-Q. Proteomic analysis to identify cytokeratin 18 as a novel biomarker of nasopharyngeal carcinoma. Journal of cancer research and clinical oncology 2009; 135(12): 1763–1775.
- Liang Y-F, Kong B, Xiang W-Y, Ruan J-B, Wang L-M, Chen C, Xu W-H, Wu Q-L, Zeng J-C, Xu J-F. Nasopharyngeal adenoid cystic carcinoma: a case report and review of the literature. International journal of clinical and experimental pathology 2014; 7(7): 4516–4518.
- Lloyd C, Yu QC, Cheng J, Turksen K, Degenstein L, Hutton E, Fuchs E. The basal keratin network of stratified squamous epithelia: defining K15 function in the absence of K14. The Journal of cell biology 1995; 129(5): 1329–1344.
- Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen, 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2012.
- Makino T, Yamasaki M, Takeno A, Shirakawa M, Miyata H, Takiguchi S, Nakajima K, Fujiwara Y, Nishida T, Matsuura N, Mori M, Doki Y. Cytokeratins 18 and 8 are poor prognostic markers in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. British journal of cancer 2009; 101(8): 1298–1306.
- Malzahn K, Mitze M, Thoenes M, Moll R. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. Virchows Archiv an international journal of pathology 1998; 433(2): 119–129.
- Markey AC, Lane EB, Churchill LJ, MacDonald DM, Leigh IM. Expression of simple epithelial keratins 8 and 18 in epidermal neoplasia. The Journal of investigative dermatology 1991; 97(5): 763–770.
- Miettinen M, Fetsch JF. Distribution of keratins in normal endothelial cells and a spectrum of vascular tumors: implications in tumor diagnosis. Human pathology 2000; 31(9): 1062–1067.
- Miettinen M, Limon J, Niezabitowski A, Lasota J. Patterns of keratin polypeptides in 110 biphasic, monophasic, and poorly differentiated synovial sarcomas. Virchows Archiv an international journal of pathology 2000; 437(3): 275–283.

- Mirlacher M, Kasper M, Storz M, Knecht Y, Dürmüller U, Simon R, Mihatsch MJ, Sauter G. Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc 2004; 17(11): 1414–1420.
- Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. Histochemistry and cell biology 2008; 129(6): 705–733.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell 1982; 31(1): 11–24.
- Moll R, Zimbelmann R, Goldschmidt MD, Keith M, Laufer J, Kasper M, Koch PJ, Franke WW. The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. Differentiation; research in biological diversity 1993; 53(2): 75– 93.
- Müller-Esterl W. Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger, 3rd ed. Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2018.
- Nagashio R, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Satoh Y, Ryuge S, Masuda N, Jiang S-X, Okayasu I. Significant high expression of cytokeratins 7, 8, 18, 19 in pulmonary large cell neuroendocrine carcinomas, compared to small cell lung carcinomas. Pathology international 2010; 60(2): 71–77.
- Nanda KDS, Ranganathan K, Devi U, Joshua E. Increased expression of CK8 and CK18 in leukoplakia, oral submucous fibrosis, and oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemistry study. Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology 2012; 113(2): 245–253.
- Nhung NV, Mirejovský P, Mirejovský T, Melínová L. Cytokeratins and lung carcinomas. Ceskoslovenska patologie 1999; 35(3): 80–84.
- Niehans GA, Manivel JC, Copland GT, Scheithauer BW, Wick MR. Immunohistochemistry of germ cell and trophoblastic neoplasms. Cancer 1988; 62(6): 1113–1123.
- Nocito A, Bubendorf L, Tinner EM, Süess K, Wagner U, Forster T, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knönagel H, Rist M, Anabitarte M, Hering F, Hardmeier T, Schoenenberger AJ, Flury R, Jäger P, Fehr JL, Schraml P, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G. Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. The Journal of pathology 2001; 194(3): 349–357.
- Notohara K, Hamazaki S, Tsukayama C, Nakamoto S, Kawabata K, Mizobuchi K, Sakamoto K, Okada S. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: immunohistochemical localization of neuroendocrine markers and CD10. The American journal of surgical pathology 2000; 24(10): 1361–1371.
- O'Hara BJ, Paetau A, Miettinen M. Keratin subsets and monoclonal antibody HBME-1 in chordoma: immunohistochemical differential diagnosis between tumors simulating chordoma. Human pathology 1998; 29(2): 119–126.
- Olofsson MH, Ueno T, Pan Y, Xu R, Cai F, van der Kuip H, Muerdter TE, Sonnenberg M, Aulitzky WE, Schwarz S, Andersson E, Shoshan MC, Havelka AM, Toi M, Linder S. Cytokeratin-18 is a useful serum biomarker for early determination of response of breast carcinomas to chemotherapy. Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research 2007; 13(11): 3198–3206.

- Omary MB, Coulombe PA, McLean WHI. Intermediate filament proteins and their associated diseases. The New England journal of medicine 2004; 351(20): 2087–2100.
- Omary MB, Ku NO. Intermediate filament proteins of the liver: emerging disease association and functions. Hepatology (Baltimore, Md.) 1997; 25(5): 1043–1048.
- Omary MB, Ku NO, Liao J, Price D. Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. Sub-cellular biochemistry 1998; 31: 105–140.
- Oshima RG, Baribault H, Caulín C. Oncogenic regulation and function of keratins 8 and 18. Cancer metastasis reviews 1996; 15(4): 445–471.
- Oyama K, Fushida S, Kinoshita J, Okamoto K, Makino I, Nakamura K, Hayashi H, Inokuchi M, Nakagawara H, Tajima H, Fujita H, Takamura H, Ninomiya I, Kitagawa H, Fujimura T, Ohta T. Serum cytokeratin 18 as a biomarker for gastric cancer. Clinical and experimental medicine 2013; 13(4): 289–295.
- Pal SK, Sakamoto K, Aragaki T, Akashi T, Yamaguchi A. The expression profiles of acidic epithelial keratins in ameloblastoma. Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology 2013; 115(4): 523–531.
- Pan X, Hobbs RP, Coulombe PA. The expanding significance of keratin intermediate filaments in normal and diseased epithelia. Current opinion in cell biology 2013; 25(1): 47–56.
- Pankov R, Umezawa A, Maki R, Der CJ, Hauser CA, Oshima RG. Oncogene activation of human keratin 18 transcription via the Ras signal transduction pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1994; 91(3): 873–877.
- Pegoraro AF, Janmey P, Weitz DA. Mechanical Properties of the Cytoskeleton and Cells. Cold Spring Harbor perspectives in biology 2017; 9(11).
- Robert A, Hookway C, Gelfand VI. Intermediate filament dynamics: What we can see now and why it matters. BioEssays news and reviews in molecular, cellular and developmental biology 2016; 38(3): 232–243.
- Ruiz C, Seibt S, Al Kuraya K, Siraj AK, Mirlacher M, Schraml P, Maurer R, Spichtin H, Torhorst J, Popovska S, Simon R, Sauter G. Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. International journal of cancer 2006; 118(9): 2190–2194.
- Safadi RA, Abdullah NI, Alaaraj RF, Bader DH, Divakar DD, Hamasha AA, Sughayer MA.
 Clinical and histopathologic prognostic implications of the expression of cytokeratins 8, 10, 13, 14, 16, 18 and 19 in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Archives of oral biology 2019; 99: 1–8.
- Saper CB. A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. The journal of histochemistry and cytochemistry official journal of the Histochemistry Society 2009; 57(1): 1–5.
- Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, Maltais L, Omary MB, Parry DAD, Rogers MA, Wright MW. New consensus nomenclature for mammalian keratins. The Journal of cell biology 2006; 174(2): 169–174.
- Scott LC, Evans TRJ, Cassidy J, Harden S, Paul J, Ullah R, O'Brien V, Brown R. Cytokeratin 18 in plasma of patients with gastrointestinal adenocarcinoma as a biomarker of tumour response. British journal of cancer 2009; 101(3): 410–417.
- Shao M-M, Chan SK, Yu AMC, Lam CCF, Tsang JYS, Lui PCW, Law BKB, Tan P-H, Tse GM. Keratin expression in breast cancers. Virchows Archiv an international journal of pathology 2012; 461(3): 313–322.

- Shimonishi T, Miyazaki K, Nakanuma Y. Cytokeratin profile relates to histological subtypes and intrahepatic location of intrahepatic cholangiocarcinoma and primary sites of metastatic adenocarcinoma of liver. Histopathology 2000; 37(1): 55–63.
- Start RD, Layton CM, Cross SS, Smith JH. Reassessment of the rate of fixative diffusion. Journal of clinical pathology 1992; 45(12): 1120–1121.
- Steinert PM, Roop DR. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. Annual review of biochemistry 1988; 57: 593–625.
- Strelkov SV, Herrmann H, Aebi U. Molecular architecture of intermediate filaments. BioEssays news and reviews in molecular, cellular and developmental biology 2003; 25(3): 243–251.
- Strnad P, Zatloukal K, Stumptner C, Kulaksiz H, Denk H. Mallory-Denk-bodies: lessons from keratin-containing hepatic inclusion bodies. Biochimica et biophysica acta 2008; 1782(12): 764–774.
- Sugai M, Umezu H, Yamamoto T, Jiang S, Iwanari H, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T, Naito M. Expression of hepatocyte nuclear factor 4 alpha in primary ovarian mucinous tumors.
 Pathology international 2008; 58(11): 681–686.
- Suo Z, Holm R, Nesland JM. Squamous cell carcinomas. An immunohistochemical study of cytokeratins and involucrin in primary and metastatic tumours. Histopathology 1993; 23(1): 45–54.
- Tapia C, Schraml P, Simon R, Al-Kuraya KS, Maurer R, Mirlacher M, Novotny H, Spichtin H, Mihatsch MJ, Sauter G. HER2 analysis in breast cancer: reduced immunoreactivity in FISH non-informative cancer biopsies. International journal of oncology 2004; 25(6): 1551–1557.
- Tennstedt P, Sauter G. Quality aspects of TMA analysis. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 2010; 664: 17–26.
- Terada T. An immunohistochemical study of primary signet-ring cell carcinoma of the stomach and colorectum: I. Cytokeratin profile in 42 cases. International journal of clinical and experimental pathology 2013; 6(4): 703–710.
- Terada T. Expression of cytokeratins in glioblastoma multiforme. Pathology oncology research POR 2015; 21(3): 817–819.
- Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. Journal of oral and maxillofacial pathology JOMFP 2012; 16(3): 400–405.
- Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Köchli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. The American journal of pathology 2001; 159(6): 2249–2256.
- Tsuji M, Kashihara T, Terada N, Mori H. An immunohistochemical study of hepatic atypical adenomatous hyperplasia, hepatocellular carcinoma, and cholangiocarcinoma with alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen, CA19-9, epithelial membrane antigen, and cytokeratins 18 and 19. Pathology international 1999; 49(4): 310–317.
- Ueda G, Sawada M, Ogawa H, Tanizawa O, Tsujimoto M. Immunohistochemical study of cytokeratin 7 for the differential diagnosis of adenocarcinomas in the ovary. Gynecologic oncology 1993; 51(2): 219–223.
- van Eyken P, Sciot R, Paterson A, Callea F, Kew MC, Desmet VJ. Cytokeratin expression in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. Human pathology 1988; 19(5): 562–568.

- van Heyningen V, Brock DJ, van Heyningen S. A simple method for ranking the affinities of monoclonal antibodies. Journal of immunological methods 1983; 62(2): 147–153.
- Wagner OI, Rammensee S, Korde N, Wen Q, Leterrier J-F, Janmey PA. Softness, strength and self-repair in intermediate filament networks. Experimental cell research 2007; 313(10): 2228–2235.
- Walker LC, Harris GC, Holloway AJ, McKenzie GW, Wells JE, Robinson BA, Morris CM. Cytokeratin KRT8/18 expression differentiates distinct subtypes of grade 3 invasive ductal carcinoma of the breast. Cancer genetics and cytogenetics 2007; 178(2): 94–103.
- Wang X, Lao Y, Xu N, Xi Z, Wu M, Wang H, Li X, Tan H, Sun M, Xu H. Oblongifolin C inhibits metastasis by up-regulating keratin 18 and tubulins. Scientific reports 2015; 5: 10293.
- Waseem A, Alexander CM, Steel JB, Lane EB. Embryonic simple epithelial keratins 8 and 18: chromosomal location emphasizes difference from other keratin pairs. The New biologist 1990; 2(5): 464–478.
- Waterhouse M, Samek E, Torres M, Bertz H, Finke J. Diagnostic utility of a soluble cytokeratin 18 assay for gastrointestinal graft-vs.-host disease detection. Clinical chemistry and laboratory medicine 2011; 49(10): 1695–1697.
- Weng Y-R, Cui Y, Fang J-Y. Biological functions of cytokeratin 18 in cancer. Molecular cancer research MCR 2012; 10(4): 485–493.
- Woelfle U, Sauter G, Santjer S, Brakenhoff R, Pantel K. Down-regulated expression of cytokeratin 18 promotes progression of human breast cancer. Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research 2004; 10(8): 2670–2674.
- Yamamoto O, Hisaoka M, Yasuda H, Kasai T, Hashimoto H. Cytokeratin expression of apocrine and eccrine poromas with special reference to its expression in cuticular cells. Journal of cutaneous pathology 2000; 27(7): 367–373.
- Yaman E, Coskun U, Sancak B, Buyukberber S, Ozturk B, Benekli M. Serum M30 levels are associated with survival in advanced gastric carcinoma patients. International immunopharmacology 2010; 10(7): 719–722.
- Yang ZY, Zhang HY, Wang F, Ma YH, Li YY, He HL, Wang C, Li SS. Expression of cytokeratin(CK)7, CK8/18, CK19 and p40 in esophageal squamous cell carcinoma and their correlation with prognosis. Zhonghua bing li xue za zhi = Chinese journal of pathology 2018; 47(11): 834–839.
- Yin B, Zhang M, Zeng Y, Li Y, Zhang C, Song Y. Corrigendum Downregulation of cytokeratin 18 is associated with paclitaxel-resistance and tumor aggressiveness in prostate cancer. International journal of oncology 2016; 49(2): 848.
- Yoon H-J, Jo B-C, Shin W-J, Cho Y-A, Lee J-I, Hong S-P, Hong S-D. Comparative immunohistochemical study of ameloblastoma and ameloblastic carcinoma. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics 2011; 112(6): 767–776.
- Yoshikawa K, Katagata Y, Kondo S. Biochemical and immunohistochemical analyses of keratin expression in basal cell carcinoma. Journal of dermatological science 1998; 17(1): 15–23.
- Young GD, Winokur TS, Cerfolio RJ, van Tine BA, Chow LT, Okoh V, Garver RI. Differential expression and biodistribution of cytokeratin 18 and desmoplakins in non-small cell lung carcinoma subtypes. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands) 2002; 36(2): 133–141.
- Zhang W, Yu W-j, Jiang Y-x, Li Y-j, Han F, Liu Y, Han Z-I. Chromophobe renal cell carcinoma: a clinicopathologic study and immunophenotypes of 42 cases. Zhonghua bing li xue za zhi = Chinese journal of pathology 2012; 41(2): 76–80.

- Zhang X-S, Zhang Z-H, Jin X, Wei P, Hu X-Q, Chen M, Lu C-L, Lue Y-H, Hu Z-Y, Sinha Hikim AP, Swerdloff RS, Wang C, Liu Y-X. Dedifferentiation of adult monkey Sertoli cells through activation of extracellularly regulated kinase 1/2 induced by heat treatment. Endocrinology 2006; 147(3): 1237–1245.
- Zuckier LS, Rodriguez LD, Scharff MD. Immunologic and pharmacologic concepts of monoclonal antibodies. Seminars in nuclear medicine 1989; 19(3): 166–186.

9. Danksagung

Durch die für wissenschaftliches Arbeiten äußerst konstruktive und produktive Struktur des Instituts für Pathologie des UKE hat mir diese Promotionsarbeit sehr viel Freude bereitet.

An erster Stelle darf ich Herrn Prof. Dr. Guido Sauter danken, der mir diese Dissertation ermöglicht hat und der für mich immer ein erreichbarer, wohlwollend offener und stets motivierender Ansprechpartner war.

Ebenso gilt mein Dank PD Dr. Ronald Simon und Dr. Martina Kluth für die zielgerichtete und konzentrierte wissenschaftliche Betreuung.

Auch Christina Möller-Koop und Melanie Witt danke ich sehr herzlich für ihre Unterstützung und Hilfe rund um das Labor.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden, die mir stets beiseite gestanden haben.

Zudem danke ich allen weiteren Personen, die mich im Rahmen der Dissertation begleitet und moralisch unterstützt haben.

10. Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

11. Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift: