

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Prof. Dr. med. Guido Sauter

## **Expression von Uroplakin 1A in menschlichen Tumor- und Normalgeweben**

Eine immunhistochemische Studie im Tissue-Microarray Format an 6.929 Tumoren

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Steffi Doris Kai Könemann  
aus Lübbecke

Hamburg 2022

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.09.2022**

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

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Walter Fiedler**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Guido Sauter**

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Das Urothel.....	1
1.2 Uroplakin 1A.....	3
1.2.1 Proteinstruktur.....	3
1.2.2 Funktion von Uroplakin 1A.....	5
1.2.3 Expression von Uroplakin 1A in Normalgeweben.....	7
1.2.4 Expression von Uroplakin 1A in Tumorgeweben.....	9
2. Material und Methoden.....	11
2.1 Tissue-Microarray-Technik.....	11
2.2 Immunhistochemie.....	16
2.3 Für die Studie verwendete Tissue-Microarrays.....	18
2.4 Uroplakin 1A Immunhistochemie.....	23
2.5 Statistik.....	25
3. Ergebnisse.....	25
3.1 Technische Aspekte.....	25
3.2 Uroplakin 1A Immunfärbung in Normalgeweben.....	25
3.3 Uroplakin 1A Immunfärbung in Tumoren.....	32
3.4 Uroplakin 1A und Tumorphänotyp beim Harnblasenkarzinom.....	49
4. Diskussion.....	50
5. Zusammenfassung.....	55
6. English Summary.....	56
7. Abkürzungsverzeichnis.....	57
8. Literaturverzeichnis.....	58
9. Danksagung.....	66
10. Lebenslauf.....	67
11. Eidesstattliche Erklärung.....	68

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Urothel

Das Urothel gilt als das effektivste Epithel, was die Abschirmung toxischer Substanzen gegenüber dem menschlichen Körper betrifft (Wu et al. 2009). Es kleidet die ableitenden Harnwege von beiden Nierenbecken über die Harnblase und Drüsenausführungsgänge der Prostata bis zur proximalen Urethra aus (Wan et al. 2018; Dalghi et al. 2020).

Epithelien werden bezüglich ihrer mikroskopischen Morphologie voneinander abgegrenzt. So spielen unter anderem das Aussehen der apikalen Zellschicht (z. B. kubisch, hochprismatisch), die Gesamtzahl der Epithelschichten (einschichtig, mehrschichtig) und der Kontakt einzelner Zellen zur Basalmembran (stratifiziert, pseudostratifiziert), eine wichtige Rolle. Vor einigen Jahren wurde das Urothel noch als Übergangsepithel beschrieben, da es die Eigenschaften eines hochprismatisch stratifizierten Epithels und auch die eines Plattenepithels zu besitzen schien. Diese Bezeichnung ist heute nicht mehr zutreffend, denn das Erscheinungsbild ist je nach Dehnung variabel (Dalghi et al. 2020). Das Urothel ist in einen aus drei Zelltypen bestehenden Aufbau gegliedert (siehe Abbildung 1). Der Basalmembran liegen die Basalzellen auf (Stratum basale), gefolgt von drei bis sieben Schichten Intermediärzellen (Stratum intermedium) und nach luminal gerichteten, in einer einzelnen Schicht angeordneten Deck- oder Schirmzellen mit ihren typischen polyploiden Zellkernen (Stratum superficiale). Bei Betrachtung des Urothels unter einem Elektronenmikroskop (EM), zeigen sich steif erscheinende, konkav geformte Plaques, die den Schirmzellen aufliegen und durch schmale Scharnierbereiche ohne Plaques voneinander separiert werden (siehe Abbildung 2). So sind Barrierefunktion und

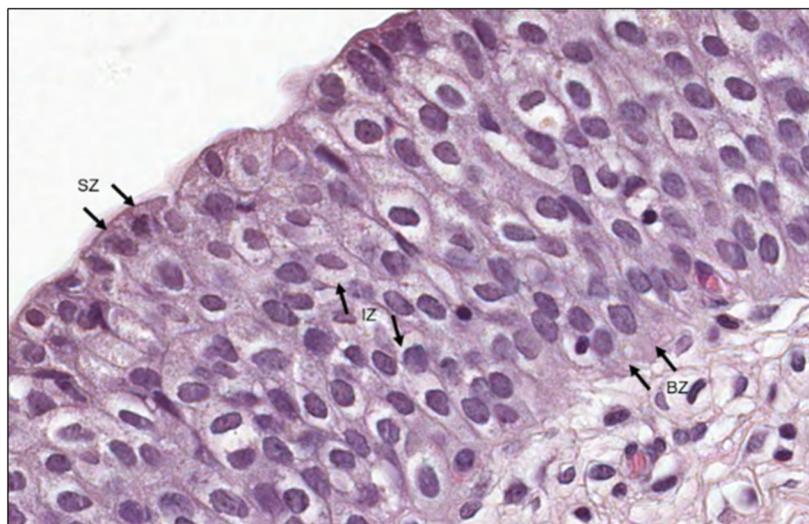


Abbildung 1: **Dreischichtiger Aufbau des Urothels, HE.** Abkürzungen: SZ Schirmzellen, IZ Intermediärzellen, BZ Basalzellen (modifiziert nach The Human Protein Atlas 2021)

gleichzeitige Flexibilität gewährleistet (Porter et al. 1967). Die Plaques bedecken fast die gesamte Oberfläche des Urothels (Min et al. 2006, Liang et al. 2001) und sind Teil der asymmetrischen Einheitsmembran (engl. asymmetric unit membrane - AUM) des terminal differenzierten Urothels (Wu et al. 1994). Sie bestehen aus den Proteinkomplex-bildenden Uroplakinen (UPK). Die AUM bildet mit ihren Plaques und den Deckzellen, die durch tight junctions eng miteinander verbunden sind, die Permeabilitätsbarriere zwischen den im Harn gelösten Stoffen und dem umliegenden Gewebe (Wu et al. 2009).

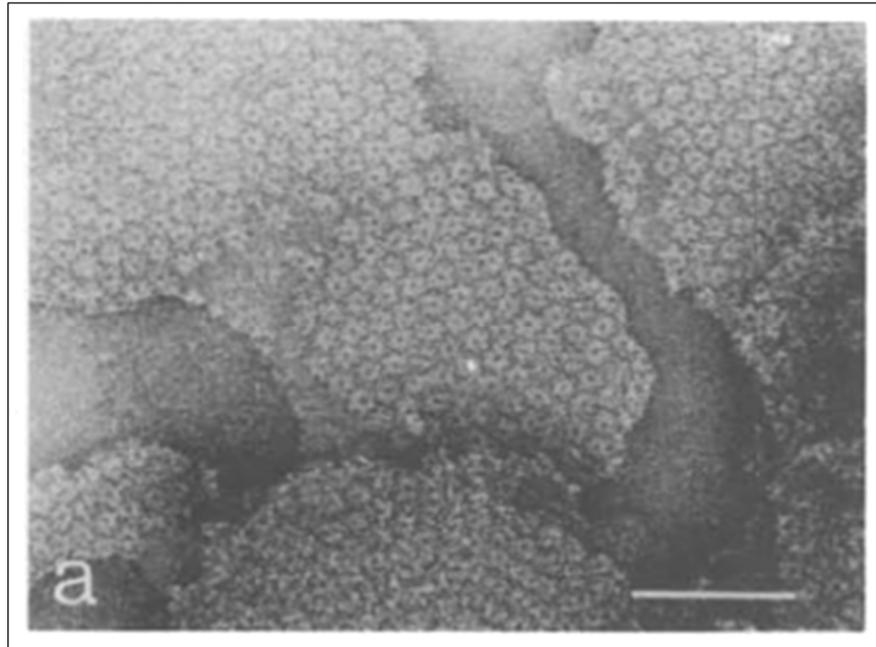


Abbildung 2: **Darstellung der hexagonal geformten urothelialen Plaques im Elektronenmikroskop.** Zu sehen sind auch die Scharnierbereiche ohne aufgelagerte Plaques. Entnommen aus Sun et al. 1996

Neben den bereits bekannten Funktionen, wurden dem Urothel sowohl sensorische als auch sekretorische Eigenschaften nachgewiesen. Durch ein Netzwerk aus Rezeptoren, lokalen neuronalen Fasern, interstitiellen Zellen und diversen Stimuli, wie beispielsweise Änderungen des hydrostatischen Drucks oder Bindung von Adenosintriphosphat (ATP) und anderen Neurotransmittern, kommt es zu einer erhöhten Membranaktivität und Kommunikation mit angrenzenden Geweben (Apodaca et al. 2007). Beispielsweise zieht die Ausschüttung von Prostaglandinen, als Antwort auf eine Dehnung des Urothels, möglicherweise eine Veränderung der Funktion des Musculus detrusor vesicae nach sich (Birder und Groat 2007). Deng et al. wiesen außerdem nach, dass das Urothel von Mäusen in der Lage ist, die Proteinzusammensetzung des Urins durch Sekretion von humanem Wachstumshormon (engl. Human growth hormone - HGH) zu verändern (Deng et al. 2001).

## 1.2 Uroplakin 1A

Uroplakin 1A (UPK1A) ist ein Glykoprotein und bildet zusammen mit den Uroplakinen 1B (UPK1B), 2 (UPK2) und 3A (UPK3A) Oligomere aus, die der apikalen Oberfläche der Schirmzellen aufgelagert sind (Deng et al. 2002). Die hexagonal geformten 16 nm kleinen Plaques stärken und stabilisieren das Urothel während des Miktionszyklus. Es wird angenommen, dass dies unter anderem durch Interaktionen von Uroplakin 3A und dessen großer intrazellulärer Domäne mit dem Zytoskelett der Schirmzellen zustande kommt (Chlapowski et al. 1972, Wu und Sun 1993). Lobban et al. wiesen per In-situ-Hybridisierung nach, dass UPK 1A ausschließlich in den Schirmzellen des Urothels exprimiert wird (Lobban et al. 1998).

### 1.2.1 Proteinstruktur

Uroplakin 1A hat ein Molekulargewicht von 27 Kilodalton (kDa) und stimmt in 39% der Aminosäuresequenz mit dem genetisch verwandten Uroplakin 1B überein (Sun et al. 1996). Das Gen mit dem Namen UPK1A oder auch TSPAN21 ist auf Chromosom 19 an Stelle q13.12 des humanen Genoms lokalisiert und enthält acht Exons. Das exprimierte Protein besteht aus 256 Aminosäuren (Wu et al. 1995, Kong et al. 2010). UPK1A gehört, sowie auch UPK1B, zu der Familie der Tetraspanine (TS) und ist somit ein Transmembranprotein (Yu et al. 1994). Zu den Tetraspaninen gehören unter anderem CD9, CD81 und CD151 (Hemler 2001).

TS sind die Hauptkomponenten der Tetraspanin angereicherten Mikrodomänen (engl. tetraspanin enriched microdomains - TEM). TEM bilden als eine funktionelle Einheit ein komplexes Netzwerk aus Interprotein- und Protein-Lipid-Interaktionen, welche unter anderem Rezeptor-Tyrosinkinasen und Integrine enthalten (Lekishvili et al. 2008). Somit haben TS einen Einfluss auf bestimmte Signalwege, beispielsweise durch Aktivierung der PI3-Kinase und spielen folglich eine Rolle in der Proliferation, Adhäsion, Mobilität und Differenzierung von Zellen und somit auch in der Tumorgenese im menschlichen Körper (Maecker et al. 1997; Detchokul et al. 2014). Strukturell zeichnen sich die Mitglieder der Tetraspaninfamilie durch vier hydrophobe Transmembrandomänen aus. Im Gegensatz dazu stehen UPK2 und UPK3A, welche nur eine Transmembrandomäne zur Verankerung innerhalb der Doppellipidmembran der Deckzellen besitzen. Spezifisch für die TS sind außerdem eine kleine und eine große extrazelluläre Schleife (EC1, EC2), sowie intrazellulär eine kleinere Schleife und die N- und C-terminalen Enden, welche die Transmembrandomänen untereinander verbinden. Innerhalb der EC2 wurden ein konstanter, für alle Proteine dieser Familie gleich aufgebauter, sowie ein individueller Teil beschrieben. Der konstante Anteil beinhaltet die drei  $\alpha$ -Helices A, B und E. Zwischen  $\alpha$ -

Helix B und E ist der variable Abschnitt der zweiten extrazellulären Schleife lokalisiert (Hemler 2005). Zu Beginn befindet sich eine für Tetraspanine spezifische Aminosäuresequenz mit zwei aufeinanderfolgenden Cysteinen und einem Glycin – das CCG Motiv (Hemler 2001). In der Regel sind in diesem Abschnitt der Aminosäurekette zwei Cysteine zu finden, welche intermolekulare Disulfidbrücken zum CCG-Motiv bilden (Abbildung 3). Bei einigen TS sind weitere Cysteine mit untereinander verbindenden Disulfidbrücken beschrieben (Hemler 2005). Diese spielen eine Rolle bei Proteininteraktionen (Fu et al. 2020). Bis heute sind 33 humane Tetraspanine bekannt (Lang und Hochheimer 2020).

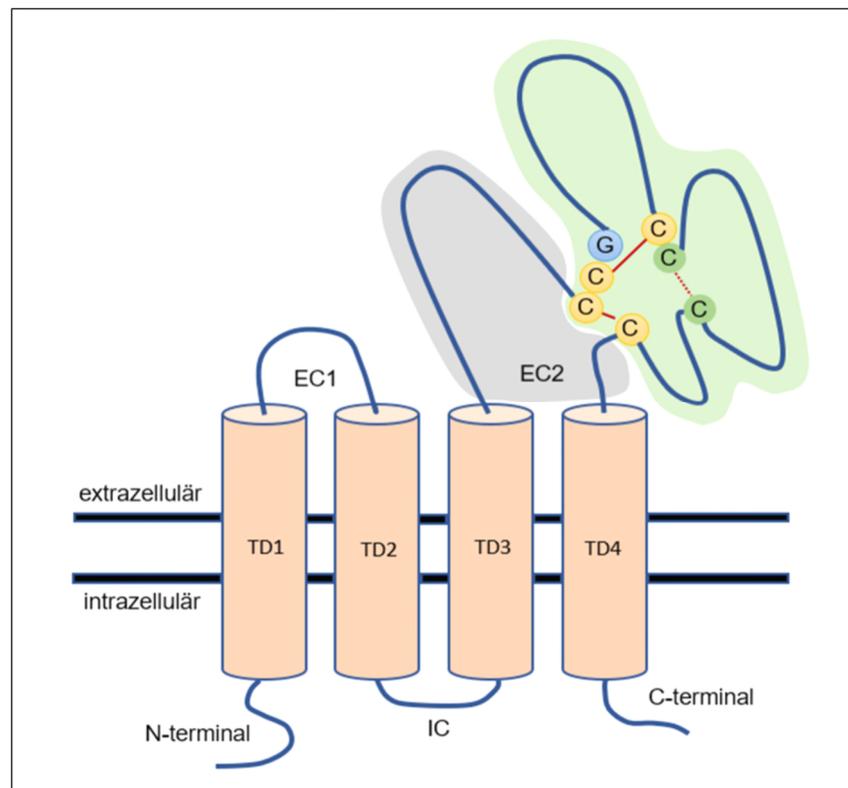


Abbildung 3: **Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus der Tetraspanine.** Konstanter Anteil (grau), individueller Anteil (grün), Disulfidbrücken (rote Linien), variable Disulfidbrücken (rot gestrichelte Linie)  
 Abkürzungen: *EC1/2* Extrazelluläre Schleife, *TD1-4* Transmembrandomäne 1-4, *IC* Intrazelluläre Schleife  
 (modifiziert nach Hemler 2005)

Uroplakin 1A besitzt an der EC2 eine N-glykosidische Bindung, welche über Acetylglucosamine nach luminal exponierte Mannosereste in variabler Anzahl enthält. Anhand dieses Glykosylierungsmusters unterscheidet sich UPK1A von UPK1B und steht deshalb unter anderem mit urothelialen Infektionen durch *Escherichia coli* in Zusammenhang (Xie et al. 2006, Croxen und Finlay 2010). Nach Expression des für Uroplakin 1A codierenden Gens und posttranslationaler Modifikation durch Glykosylierung der entstandenen Aminosäurekette, liegen das Protein sowie auch die anderen Uroplakine als Monomer vor (Tu et al. 2002). Die UPK formieren sich anschließend im

endoplasmatischen Retikulum (ER) zu Heterodimeren – UPK1A mit UPK2 und UPK1B mit UPK3A (Wu et al. 1995). Die Heterodimerbildung ist ein essentieller Schritt für die Funktion des Urothels und Voraussetzung für die Uroplakine das ER verlassen zu können (Tu et al. 2002). In mehreren Versuchen mit unterschiedlichen UPK Knock-out Mäusen stellte man fest, dass UPK1A ohne seinen Bindungspartner UPK2 nicht in der Lage ist, das ER zu verlassen. Gleiches fand man im Umkehrschluss für UPK2 und UPK3A heraus. UPK1B ist jedoch das einzige Uroplakin, welches auch ohne die Dimerisierung mit UPK3A, auf der apikalen Oberfläche der Deckzellen zu finden war (Aboushwareb et al. 2009, Carpenter et al. 2016). Dies ist eine Erklärung dafür, warum UPK1B auch außerhalb des Urothels in anderen Epithelien, wie zum Beispiel der Cornea und Lunge, exprimiert wird (Kallin et al. 1991, Adachi et al. 2000). Nähere Informationen zur Expression finden sich in den nachfolgenden Kapiteln.

UPK2, der Bindungspartner von UPK1A, besitzt drei N-Glykosylierungsstellen von denen zwei im Golgi-Apparat zu komplexeren Glykanen konvertiert werden. Dieser Schritt ermöglicht die Dimerisierung mit UPK1A (Hu et al. 2005). Im weiteren Verlauf der Reifung von UPK2 wird eine Propeptidsequenz durch die Endopeptidase Furin von der Polypeptidkette abgespalten und es kommt zu einer Konformationsänderung des Proteins, welche die Oligomerisierung und Anordnung in 16 nm großen 2D-Kristallen im Trans-Golgi-Apparat ermöglicht (Kałnik-Prastowska et al. 2014; Hu et al. 2005) (siehe Abbildung 3). Es folgt der Transport in diskoidal geformten Vesikeln (DV) zur apikalen Membran. Hier vereinigen sich die nun fusiform erscheinenden Vesikel mit Hilfe von SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptors), wie Synaptobrevin und Syntaxin, mit der Membran (Dalghi et al. 2020), was eine Vergrößerung der Oberfläche und somit die Anpassung des Urothels zum Füllungsstand der Harnblase zur Folge hat (Truschel et al. 2002). Bisher ist über die genauen Abläufe der Signalwege in diesem Abschnitt nur sehr wenig bekannt (Hudoklin et al. 2011). Durch die ungleichmäßige Verteilung der Proteinmassen der Uroplakine innerhalb der apikalen Membran, zeigt sich eine Verschiebung des strukturellen Gleichgewichts in den Extrazellularraum. In der mikroskopischen Ansicht entsteht so ein asymmetrisches Erscheinungsbild, was zu der Namensgebung der AUM geführt hat (Hicks 1965, Sun et al. 1996).

### 1.2.2 Funktion von Uroplakin 1A

Die bisher bekannte Funktion der Uroplakine als Proteinkomplexe innerhalb der AUM sind essentiell für die physiologische Funktion der ableitenden Harnwege. Ohne die präventiven Eigenschaften der Plaque, gelangen die zuvor renal aus dem Plasma filtrierte Stoffe, deren Osmolalität und pH-Wert sich durch vermehrte Konzentration stark verändert haben, in angrenzende Gewebe (Lee 2011). Verschiedenste Studien mit Untersuchungen an UPK-

Knockout-Mäusen belegen, dass es bei Ausbleiben der Expression eines der Uroplakine, zu Veränderungen der Urothelpermeabilität durch fehlerhafte Plaqueformation kommt. Dies hat polypöse Modifikationen des Urothels oder die Manifestation von Krankheitsbildern wie dem vesikourethralen Reflux mit sukzessiver Hydronephrose zur Folge (Kong et al. 2004; Hu et al. 2000; Aboushwareb et al. 2009). Eine weitere Funktion bietet UPK1A als mannosehaltiger Glykoproteinrezeptor dem uropathogenen Erreger *Escherichia coli* (*E. coli*) bei dem Verbleib und der Kolonisierung in der urothelialen Mukosa (Zhou et al. 2001). *E. coli* besitzt an den Typ-1-Fimbrien FimH-Adhäsine, welche Mannose binden können. Diese Bindung kann zur Internalisierung der Bakterien in das Zytoplasma führen, wo sie vor defensiven Mechanismen des Wirts geschützt sind und rezidivierende Infektionen auslösen können (Xie et al. 2006). Genauere Funktionen und Signalwege von Uroplakin 1A als eigenständiges Protein sind jedoch weitestgehend unerforscht und aus den spärlichen Ergebnissen lassen sich nur Vermutungen darüber anstellen. Tetraspanine nehmen, wie bereits beschrieben, auf vielfältige Weise Einfluss auf die Zellmorphologie, Adhäsion und Proliferation in verschiedensten Zelltypen von Säugetieren. CD9 und CD81 regulieren beispielsweise über verschiedene Ras-Signalwege die Proliferation und die Apoptose. CD151 hingegen hemmt diese Kaskade und trägt über die Aktivierung von Rac und Aktinfilamenten zur vermehrten Zelladhäsion und Motilität bei. CD82 wiederum hemmt Rac und somit die Invasion von Tumorzellen (Hemler 2005). Dementsprechend wird vermutet, dass auch Uroplakin 1A einen Einfluss auf den Zellzyklus hat und damit eine Rolle in der Tumorgenese und Progression spielt. Kong et al. untersuchten im Jahr 2010 die Funktion von UPK1A in Zellen von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus. Im Mausmodell inhibierte die Überexpression des Proteins die Zellproliferation und Tumorgenese und ließ damit seine Funktion als Tumorsuppressorgen vermuten. Weitere Forschungen des Teams anhand der Durchflusszytometrie suggerierten, dass UPK1A in der Lage ist, den Zellarrest am G1-Kontrollpunkt des Zellzyklus durch Regulation von Cyclin D und CDK4 einzuleiten (Kong et al. 2010). Wenige Jahre später fanden Zhu et al. heraus, dass eine Herabsetzung des mRNA Levels von Uroplakin 1A zu einer Suppression der Proliferation und einer gesteigerten Apoptoserate in Zellen von Urothelkarzinomen führt (Zhu et al. 2015). Aktuellere Ergebnisse weisen in eine ähnliche Richtung. 2019 erhielten William G. Kaelin Jr, Gregg L. Semenza und Sir Peter J. Ratcliffe den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für die Entdeckung der Mechanismen der Sauerstoffaufnahme von Zellen (Pan et al. 2021). Sie entdeckten den Einfluss des Hypoxie-induzierten Faktor 1 (engl. hypoxia inducible factor 1 – HIF 1) auf die Sauerstoffversorgung. HIF 1 ist ein Transkriptionsfaktor, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit und er wird unter aeroben Bedingungen exprimiert. Unter Bindung des von-Hippel-Lindau-Proteins (VHL) und anschließender Ubiquitinierung wird HIF 1 jedoch unmittelbar im Proteasom abgebaut. Unter hypoxischen Bedingungen

allerdings reguliert er durch Bindung an ein Hypoxie-responsives Element (HRE) am Promotor die Transkription von hunderten Genen, welche sowohl die Glykolyse und Angiogenese in physiologischen als auch in Tumorgeweben fördern (Semenza 2007). Kürzlich führte eine Studie von Song et al. zu dem Ergebnis, dass UPK1A Einfluss auf diesen Signalweg nehmen kann und eine reziproke Regulation von HIF 1 und UPK1A die Glykolyse und Proliferation in hepatozellulären Karzinomen begünstigt, sie sich somit gegenseitig auf transkriptioneller Ebene beeinflussen (Song et al. 2020). Hier zeigt sich erneut, dass Uroplakin 1A eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielen könnte. Im Detail sind diese Regulationsmechanismen bis dato noch nicht bekannt.

### 1.2.3 Expression von Uroplakin 1A in Normalgeweben

Die Expression der Uroplakine ist für das Urothel, wie bereits erläutert, von fundamentaler Bedeutung und sie werden regelmäßig als gewebespezifische Proteine deklariert. Olsburgh et al. konnten tatsächlich eine Urothelspezifität für die Proteine Uroplakin 1A und 2 nachweisen (Olsburgh et al. 2003). UPK1B, UPK3A und UPK3B sind jedoch auch in anderen Gewebeentitäten nachweisbar. UPK1B wird unter anderem im oberflächlichen Epithelium der Cornea exprimiert, wo es vermutlich eine Schutzfunktion vor bakteriellen Infekten einnimmt (Adachi et al. 2000). Die Protein Expression von UPK3 ist nachweislich ebenfalls nicht auf das Urothel beschränkt (Olsburgh et al. 2003). Weitere Informationen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: **Protein Expression der Uroplakine in humanem Normalgewebe.** Daten entnommen aus The Human Protein Atlas

Protein	Expression im Normalgewebe
Uroplakin 1A	<b>Hoch:</b> Harnblase
Uroplakin 1B	<b>Hoch:</b> Harnblase <b>Moderat:</b> Magen und Gallenblase <b>Gering:</b> Leber, Hoden, Eileiter, Endometrium und Tonsillen
Uroplakin 2	<b>Hoch:</b> Harnblase
Uroplakin 3A	<b>Hoch:</b> Harnblase <b>Moderat:</b> Kleinhirn, Nebenschilddrüsen, orale Mukosa, Speicheldrüsen, Rektum, Gallenblase, Niere, Nebenhoden, Ovar, Eileiter, Plazenta, Herzmuskel, Haut, Tonsillen, Knochenmark
Uroplakin 3B	<b>Moderat:</b> Harnblase <b>Gering:</b> Lunge

Der Human Protein Atlas (HPA) gibt die Protein Expression für Uroplakin 1A ebenfalls ausschließlich für die Harnblase an (Abbildung 5). Die ebenfalls im HPA zusammengefassten RNA-Expressionsdaten sprechen allerdings für eine Uroplakin Expression in einigen anderen Organen wie Prostata, mehreren von Plattenepithel bedeckten Organen (Ösophagus, Vagina, Haut, Zervix uteri), aber auch in glatter Muskulatur und verschiedenen Blutbestandteilen (Abbildung 6).

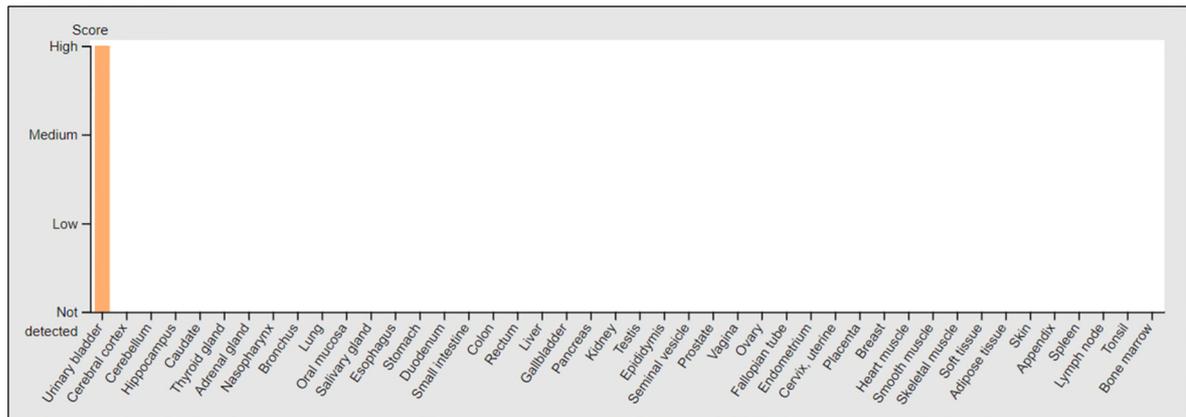


Abbildung 5: **Proteinexpression von Uroplakin 1A in humanem Normalgewebe.**  
Entnommen aus The Human Protein Atlas  
(<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105668-UPK1A/tissue> Stand 15.10.2021)

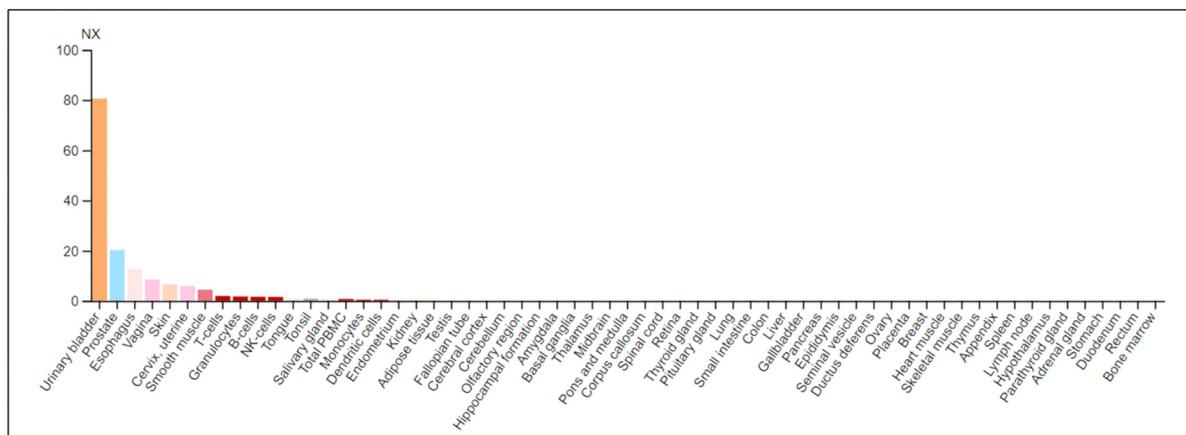


Abbildung 6: **mRNA Expression von Uroplakin 1A in humanem Normalgewebe.**  
Abkürzungen: NX Consensus Normalized eXpression. Entnommen aus The Human Protein Atlas  
(<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105668-UPK1A/tissue> Stand 15.10.2021)

Derartige diskrepante Daten können einerseits durch Verunreinigung von für die Untersuchung der RNA Expression verwendeten Gewebeproben bedingt sein, oder aber durch eine ungenügende Sensitivität der verwendeten Antikörper. Beispielsweise wäre es im Falle von UPK1A-positiver Prostata oder glatter Muskulatur denkbar, dass das untersuchte Prostatagewebe Urothel der prostatistischen Harnröhre beinhaltetete, beziehungsweise die untersuchte glatte Muskulatur aus der Harnblase mit erhaltenem bedeckendem Urothel stammt. Die Daten zur Proteinexpression aus dem Human Protein

Atlas sind insofern nicht ganz zuverlässig, als die verwendeten Antikörper typischerweise polyklonaler Natur sind und angesichts der großen Zahl der im Proteinatlas untersuchten Antikörper im Einzelnen auch nicht komplett validiert werden konnten. Diese ungenügende Validierung wird im HPA durch die gleichzeitige Verwendung mehrerer, meistens drei polyklonaler Antikörper teilweise kompensiert. Dieses Verfahren garantiert aber nicht den Einsatz eines wirklich hochwertigen sensitiven und spezifischen Antikörpers.

#### 1.2.4 Expression von Uroplakin 1A in Tumorgeweben

Verschiedene Forschungsgruppen zeigten, dass die Uroplakine trotz ihres spezialisierten Vorkommens im terminal differenzierten Urothel auch in schlecht differenzierten, invasiven Urothelkarzinomen exprimiert werden können (Moll et al. 1995; Ogawa et al. 1999; Riedel et al. 2001; Olsburgh et al. 2003; Huang et al. 2007). Zwei weitere immunhistochemische Studien zeigten neben einer Uroplakin Expression in Urothelkarzinomen auch einen Nachweis von Uroplakinen in Brenner Tumoren des Ovars (100%) und damit die urotheliale Differenzierung dieser Karzinome (Ogawa et al. 1999; Riedel et al. 2001). Huang et al. entdeckten 2007 in der bisher größten Studie im Tissue-Microarray Format (TMA) an 276 Tumoren der Harnblase mit Hilfe eines pan-UPK-Antikörpers, eine signifikante Korrelation zwischen der Expression der Uroplakine und einem fortgeschrittenen Tumorstadium (Huang et al. 2007). In der Literatur sind jedoch nur wenige für Uroplakin 1A spezifische Studien zu finden.

Ein japanisches Team untersuchte 2002 erstmals ausschließlich die Uroplakin 1A Expression in Urothelkarzinomen an 63 Gewebeschnitten. In 96,8% der neoplastischen Gewebe ließ sich das Glykoprotein nachweisen. Die Hypothese, dass die Expression in gut bis moderat differenzierten Karzinomen gegenüber schlecht differenzierten Tumoren höher liegt, ließ sich in dieser Studie nicht belegen (Kageyama et al. 2002). Uroplakin 1A wurde auch noch in weiteren Tumorentitäten nachgewiesen, wie zum Beispiel in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (engl. esophageal squamous cell carcinoma - ESCC). Kong et al. beschrieben im Rahmen einer TMA-Studie an 300 ESCC Proben und deren korrespondierenden Normalgeweben, dass Uroplakin 1A sowohl im Normalgewebe (100%) als auch in den entarteten Geweben exprimiert wird. Insgesamt wurden von den 186 auswertbaren ESCC 44% der Proben als positiv bewertet. Eine reduzierte Expression war zusätzlich signifikant mit einem fortgeschrittenen klinischen Stadium und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen assoziiert. Die Kaplan Meier Analyse erwies weiterhin, dass die reduzierte Expression mit einem schlechten Gesamtüberleben der Patient:innen korrespondiert. Das Team vermutete anschließend, dass UPK1A eventuell als prognostischer Marker genutzt werden könnte (Kong et al. 2010). Zu ähnlichen Ergebnissen

kamen auch zwei weitere, voneinander unabhängige Forschungsgruppen im Jahr 2014 bei ihren immunhistochemischen Untersuchungen an 445 Adenokarzinomen des Magens, (Zheng et al. 2014) und 125 kolorektalen Karzinomen (He et al. 2014). 221 Adenokarzinome des Magens (49,6%) und 53 kolorektale Karzinome (42,4%) zeigten eine hohe Expression an Uroplakin 1A. Die reduzierte Expression war auch hier in beiden Studien mit klinisch pathologischen Parametern wie Lymphknotenmetastasen, TNM-Stadium, UICC-Stadium und der Tumorgröße assoziiert und auch das Gesamtüberleben nach Kaplan Meier war signifikant höher für die Patientengruppen mit stärkerer UPK1A Expression in Tumoren. Mit Hilfe des Cox'schen Regressionsmodells ließ sich Uroplakin 1A außerdem als unabhängiger Faktor ermitteln.

Die bis dato aktuellste und bereits erwähnte Studie zur Expression von UPK1A in Tumorgewebe stammt aus dem vergangenen Jahr von Song et al. In der Literatur wird die immunhistochemische Untersuchung von 17 Gewebeproben von hepatozellulären Karzinomen (engl. hepatocellular carcinoma - HCC) angegeben. Die Ergebnisse der Echtzeit-PCR (engl. real time quantitative polymerase chain reaction – qRT-PCR) zeigen im Vergleich zum Normalgewebe eine hohe RNA Expression in HCC. Zusätzlich wurden Daten zur RNA-Sequenzierung aus The Cancer Genome Atlas (TCGA) von 357 Patient:innen analysiert und es wurde laut Aussage der Autoren eine signifikant erhöhte RNA Expression in HCC eruiert.

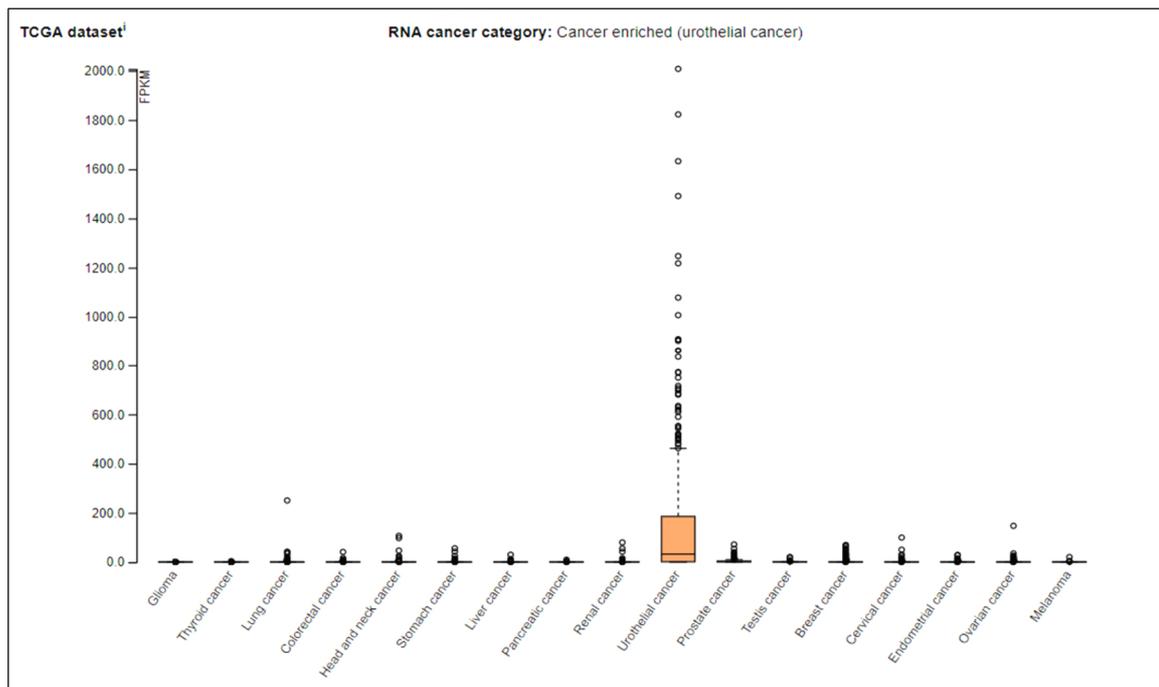


Abbildung 7: mRNA Expression von Uroplakin 1A in verschiedenen Tumorentitäten. Basierend auf den Daten des TCGA (The Cancer Genome Atlas) Abkürzungen: FPKM Fragments per Kilobase of exon per million reads. Entnommen aus The Human Protein Atlas. (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105668-UPK1A/pathology> Stand 15.10.2021)

Eine Korrelation zwischen der Expression und dem Gesamtüberleben nach Kaplan Meier erreichte wiederum keine statistische Signifikanz (Song et al. 2020). Die im Human Protein Atlas zusammengefassten TCGA RNA Daten zu Uroplakin 1A in Tumorgeweben zeigen allerdings weder Hinweise auf eine Hochregulierung noch auf eine prognostische Bedeutung bei hepatozellulären Karzinomen. Abbildung 7 stellt die Ergebnisse des TCGA zusammengefasst dar (Expression of UPK1A in cancer - Summary - The Human Protein Atlas 2021). Unabhängig von einigen diskrepanten RNA- und Protein-Befunden im HPA und in der TCGA-Datenbank, ergeben sich somit viele Hinweise auf eine mindestens weitgehende Gewebespezifität der Uroplakin 1A Expression, sodass der immunhistochemische Nachweis von UPK1A möglicherweise diagnostisch genutzt werden könnte. Da bisher umfassende Studien zur Expression von UPK1A bei verschiedenen Tumorarten fehlen, sollten in dieser Untersuchung mehr als 6.000 Tumoren und 76 verschiedene Normalgewebe-Kategorien in einem Tissue-Microarray-Format immunhistochemisch auf die Expression von UPK1A untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Tissue-Microarray-Technik

Die Tissue-Microarray-Technik wurde 1997 von den Arbeitsgruppen von Prof. Guido Sauter (damals Universitätsklinik Basel, Schweiz) und Prof. Olli-Pekka Kallioniemi (damals National Human Genome Research Institute, NHRGI, Bethesda, Maryland, USA) entwickelt (Kononen et al. 1998). Die Methode erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von Hunderten von Tumoren auf einem einzigen Objektträger und ermöglicht dadurch eine starke Beschleunigung und Ökonomisierung von gewebebasierten Studien (Al Kuraya et al. 2004). Verfahren zur in-situ-Untersuchung von Geweben wie Immunhistochemie (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung oder RNA-in-situ-Hybridisierung) werden massiv beschleunigt, weil für die Untersuchung einer großen Zahl von Tumoren nur sehr wenige Schnittpräparate hergestellt werden müssen. Da ein/e am Universitätsklinikum Eppendorf (UKE) angestellte/r medizintechnische/r Assistent:in (MTA) pro Tag circa 200 Schnitte herstellen kann, wäre es möglich, mit Hilfe einer/s einzigen MTA an einem Tag Präparate von 120.000 Tumoren für eine Studie vorzubereiten. Auch die Menge der Reagenzien welche für die Färbung benötigt wird, ist um einen Faktor von 600 reduziert. Für die Herstellung von TMAs werden aus Tumor-Paraffinblöcken Stenzen mit einem Durchmesser von 0,6 mm entnommen und in vorher definierter Art und Weise in einen leeren Paraffin-Empfängerblock eingebracht. Da pro Tumor lediglich ein 0,6 mm messendes Gewebefragment zur Untersuchung gelangt, wurde ursprünglich die Repräsentativität von

TMA's für Tumoruntersuchungen infrage gestellt (Camp et al. 2000; Rimm et al. 2001; Gancberg et al. 2002). Zahlreiche Studien haben aber seit 1998 gezeigt, dass alle in der klinischen Routine etablierten molekularen Prognosefaktoren auch an Tissue-Microarrays bestehend aus einem 0,6 mm messenden Gewebefragment pro Patient klar identifiziert werden konnten (Kononen et al. 1998; Ruiz et al. 2006; Torhorst et al. 2001). Dies gilt beispielsweise für die prognostische Bedeutung von Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, p53, R2-Status und Ki-67-Labeling-Index beim Mammakarzinom, Vimentin Expression beim Nierenzellkarzinom oder histologische Gradierung beim Urothelkarzinom oder PTEN-Status beim Prostatakarzinom (Kononen et al. 1998; Torhorst et al. 2001; Nocito et al. 2001; Ruiz et al. 2006; Schlomm et al. 2008; Moch et al. 1999; Zellweger et al. 2005). Die geringe Menge der pro Patient:in untersuchten Gewebe wird offensichtlich durch die bisher unerreichte Standardisierung kompensiert, welche bei TMA Studien möglich ist. Die Standardisierung beinhaltet nicht nur klassische Parameter wie Reagenzienkonzentration, Reagenzientemperatur und Inkubationsdauer, sondern auch normalerweise nur schwierig standardisierbare Parameter wie Schnittdicke, der Zeitspanne zwischen Herstellung eines Schnittes und seiner immunhistochemischen Färbung, dem Schnittalter und die Menge des pro Tumor untersuchten Gewebes. Studien haben gezeigt, dass bereits eine Zeitspanne von zwei Wochen zwischen der Herstellung eines Schnittes und seiner Verwendung für eine immunhistochemische Färbung zu einer Reduktion der Färbeintensität führen kann (Mirlacher et al. 2004). Andere Arbeiten haben demonstriert, dass die Zahl der als positiv klassifizierten Fälle mit der untersuchten Tumormenge zunimmt (Camp et al. 2000; Hoos et al. 2001; Rubin et al. 2002; Zhang et al. 2003).

Die genannten Vorteile der TMA Methode müssen allerdings durch einen sehr aufwendigen Herstellungsprozess der Arrays erarbeitet werden. Der Herstellungsprozess von TMA's lässt sich in 5 Schritte aufteilen.

#### 1. *Identifizierung potentiell geeigneter Tumoren.*

Dies erfolgt am UKE in der Regel durch eine Volltextsuche in dem Pathologie-Informationssystem, wobei typischerweise mit einer Kombination von Organ, gewünschtem Tumortyp und verschiedener pT-Stadien sichergestellt wird, dass nicht kleine Biopsien, sondern Operationspräparate, welche mit höherer Wahrscheinlichkeit auch größere Tumormengen beinhalten, gefunden werden. Die Pathologieberichte der so identifizierten Fälle werden dann zunächst auf mögliche Verwendbarkeit überprüft, wobei in einem ersten Schritt Tumoren mit offensichtlich kleiner Größe, ausgedehnten regressiven Veränderungen beziehungsweise Nekrosen oder unsicherer Diagnose ausgeschlossen werden.

2. Prüfung der ausgewählten Fälle auf ihre Verwendbarkeit.

Das entscheidende Kriterium für die Verwendung eines Tumors ist das Vorhandensein von einem mindestens 1 cm<sup>2</sup> großen Tumorareal. Stanzbare Tumorbereiche werden dann mit einem Filzstift markiert. Alle nicht für das Projekt benötigten Schnitte werden anschließend in das Pathologiearchiv zurücksortiert.

3. Prüfung der korrespondierenden Paraffinblöcke auf ihre Tauglichkeit.

Dies erfolgt am UKE durch eine erfahrene MTA (Melanie Witt), welche Blöcke mit einer Gewebetiefe von <2 mm bereits im Vorfeld aussondert, da solche dünnen Blöcke nur für die Entnahme von kurzen Stanzen genutzt werden können, welche später nicht auf allen von dem TMA Block hergestellten Schnitten auftreten.

4. Definition der endgültigen Zusammensetzung des TMAs.

Grundlage ist eine Liste der letztlich für ein Projekt geeigneten Fälle. Alle Fälle werden dann schon vor Herstellung des TMAs einer bestimmten Position in dem geplanten TMA zugeordnet. Die Struktur der UKE TMAs ist prinzipiell immer gleich. Die TMAs bestehen aus maximal sechs ungleichgroßen und asymmetrisch angeordneten Sektoren, welche mit Großbuchstaben (A-F) gekennzeichnet werden. Innerhalb der einzelnen Sektoren werden die Zeilen mit Zahlen (1-9) und die Spalten mit Kleinbuchstaben (a bis maximal r) definiert. So entsteht ein übersichtliches Koordinatensystem. Die Struktur eines Hamburger TMAs ist in Abbildung 8 gezeigt.

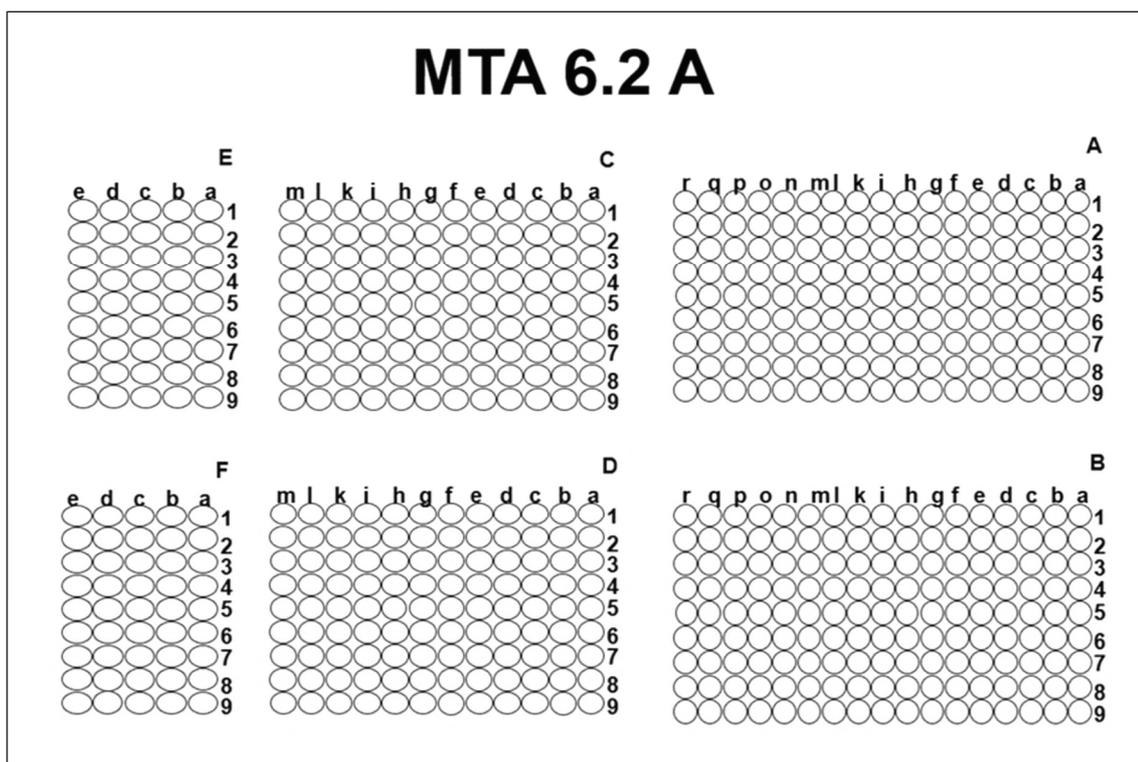


Abbildung 8: Aufbau eines am UKE hergestellten und vollständig mit Gewebe besetzten TMA Blocks. MTA 6.2 A Arrayname A-F Sektoren, a-r Spalten, 1-9 Zeilen

## 5. TMA Manufaktur.

Meistens werden sechs TMA Blöcke (Replikat) parallel hergestellt. Zur Anwendung kommt dabei ein von Mitarbeitern des Instituts für Pathologie hergestellter semiautomatischer Tissue-Arrayer, dessen Herzstück eine Umschaltvorrichtung ist, welche es ermöglicht an einer exakt definierten Stelle entweder einen Bohrer (zum Herstellen von Löchern in Empfängerblöcken) oder eine Hohlneedle (zur Entnahme von Tumorgewebe aus den Spenderblöcken) wahlweise zur Anwendung bringen. Die Herstellung beginnt mit der Bohrung eines ersten Loches im ersten Empfängerblock an der Position A1a mit dem hierzu zur Verfügung stehenden Bohrer. Danach wird das Instrument auf die Hohlneedle umgestellt und ein kleines Podest wird über den bereits vorgelochten Empfängerblock gelegt. Auf dieses Podest wird dann der Spenderblock gebracht, woraus mit der Hohlneedle ein zylindrisches Gewebefragment entnommen wird. Nachdem das Podest und der Tumorblock temporär entfernt worden sind, kann der Tumorzylinder in das direkt unter der Needle liegende vorgebohrte Loch eingebracht werden. Zur Ausstoßung des Zylinders wird ein dünner Draht verwendet der in die Hohlneedle eingeführt wird. Mit Hilfe eines speziell angefertigten Mehrfach-Blockhalters, der Platz für sechs Kopien eines Empfängerblocks bietet, werden sechs Replikat eines TMAs parallel hergestellt. Zur Bestückung des zweiten Replikatblockes wird der Mehrfach-Blockhalter um eine Position verschoben und die beschriebene Prozedur zur Platzierung eines Tumorgewebefragmentes wird wiederholt. Nach Bestückung aller geplanter Replikat eines TMAs wird die Position von Bohrer/Needle mittels eines elektrischen Schrittmotors auf die Position A1b verschoben und die Prozedur wird wiederholt. Die Abbildungen 9-10 illustrieren den TMA Herstellungsprozess im Arrayer.

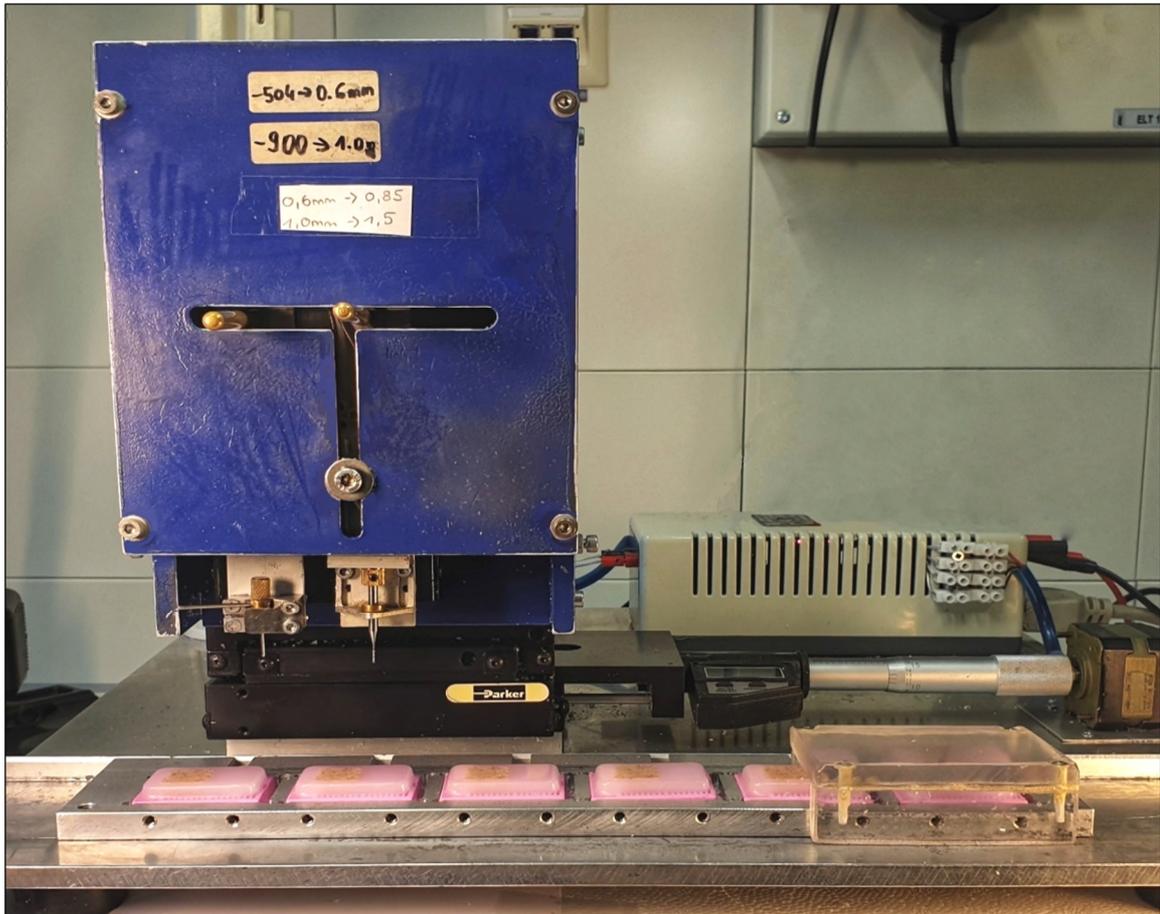


Abbildung 9: Beispiel eines am UKE verwendeten Arrayers mit hergestellten Replikaten.

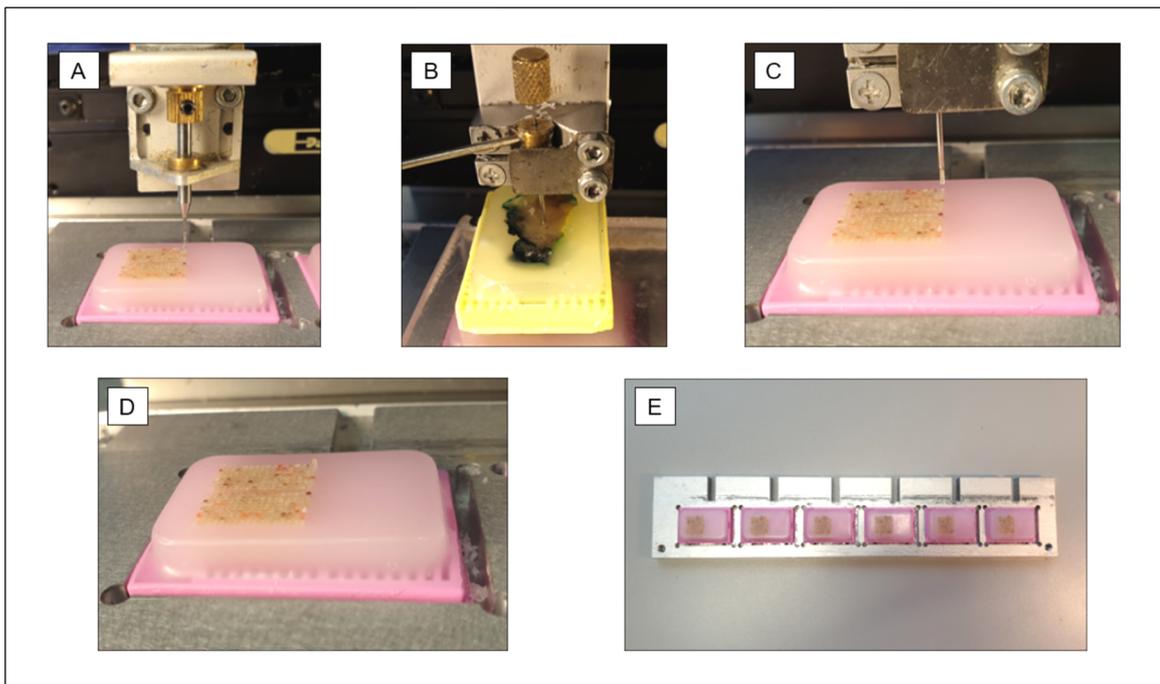


Abbildung 10: **Prozess der TMA Manufaktur.** A Lochbohrung im Empfängerblock an Position B9r. B Tumorgewebeentnahme mit Hilfe einer Hohlneedle aus dem Spenderblock. C Einbringen der Gewebestanze in den Empfängerblock an Position B9r. D Eingebrochenes Tumorgewebe im Empfängerblock. Danach erfolgt die Lochbohrung im zweiten Empfängerblock (Replikate) an derselben Position, wie im vorherigen Block. E Hergestellte Replikate.

Ein wesentlicher Vorteil der TMA Methode liegt in seiner Eignung zur Anonymisierung beziehungsweise Pseudonymisierung von Patientenproben und damit Einhaltung der Vorgaben des Datenschutzes. Für die Herstellung von TMAs werden Biopsie-Nummern benötigt, welche sicherstellen, dass die zu einem Schnitt gehörigen Blöcke korrekt zugeordnet werden können. Mit Hilfe dieser Biopsie-Nummern könnte es theoretisch durch Eindringen in das Pathologie-Informationssystem des UKE möglich sein, Einsicht auf die Klarnamen der Patient:innen zu gewinnen. Die Biopsie-Nummern werden aber nur während der Herstellungsphase benötigt. Unmittelbar nach Fertigstellung eines TMAs können die Biopsie-Nummern entweder ausgeblendet (Pseudonymisierung) oder definitiv gelöscht (Anonymisierung) werden. In beiden Fällen ist es auch in Zukunft möglich, sämtliche histopathologischen oder klinischen Parameter, welche zum Zeitpunkt der TMA Herstellung bekannt waren, dauerhaft über die Koordinatenposition im TMA zuzuordnen. Ein Beispiel eines Datenfiles eines UKE TMAs ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: **Ausschnitt eines beispielhaften TMA Datenfiles eines Harnblasen-Arrays.** Sind Daten nicht vorhanden, wird ein x in der Tabelle eingetragen. Hier sind die Biopsie-Nummern bereits gelöscht (Anonymisierung).

BLA 7.2 -TMA									
Array-Block	Koordinate	Entität	Block-Nr.	pT	pN	Grading	L-Status	V-Status	R-Status
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
A	B7a	Urothelkarzinom	2.1	pTa	x	G3	1	0	1
A	B7b	Urothelkarzinom	1.3	pTa	x	G2 low	x	x	0
A	B7c	Urothelkarzinom	1.1.5	pTa	x	G2 low	0	x	0
A	B7d	Urothelkarzinom	4.2	pT2	pN1	G3	1	0	0
A	B7e	Urothelkarzinom	1.1	pT2b	pN2	G3	1	1	0
A	B7f	Urothelkarzinom	2.1.1	pT3	pN0	G3	1	1	Rx
A	B7g	Urothelkarzinom	3.1	pT4	pN2	G3	1	1	2
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

## 2.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren zur Visualisierung von Proteinen an Gewebeschnitten (Sternberger et al. 1970). Das wesentliche hierfür benötigte Reagenz ist ein spezifischer Antikörper, der das Zielprotein der Untersuchung erkennt. Im Rahmen der Untersuchung werden zunächst Primärantikörper auf einen Gewebeschnitt aufgebracht, welche an spezifische Zielstrukturen binden. Da Antikörper per se farblos sind, benötigt es zur optisch sichtbaren Darstellung der spezifischen Antikörper-Antigen-Bindung ein

Visualisierungsverfahren. Hierzu werden typischerweise Antikörper einer anderen Spezies (als der des Primärkörpers) verwendet, welche sich gegen die Fc-Anteile des Primärantikörpers richten. Diese Sekundärantikörper sind mit einem Visualisierungssystem gekoppelt, welches erlaubt, die Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar zu machen (Im et al. 2019; Ramos-Vara 2005). Das Prinzip dieser indirekten Antikörpervisualisierung ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt. Trotz des einfachen Anwendungsprinzips von Antikörpern gibt es bei der praktischen Anwendung einige ernstzunehmende Schwierigkeiten, die überwunden werden müssen. Ein wesentliches Problem liegt in der Formalinfixierung der Gewebe, welche zu einer Vernetzung (engl. crosslinking) von Proteinen untereinander und mit DNA führen, sodass die Struktur der Proteine und ihre Epitop-Zugänglichkeit nach Formalinfixierung markant verändert werden (Shi et al. 1991). Viele Antikörper, welche ideal dazu geeignet sind, nicht fixiertes natives Protein zu erkennen, funktionieren am in Formalin fixierten Gewebe deswegen nicht. Ein wesentliches Verfahren zur weitgehenden Wiederherstellung der Antigen-Zugänglichkeit ist die hitzeinduzierte Epitop-Demaskierung (engl. heat induced-epitope-retrieval, HIER), wobei durch Zuführung von Flüssigkeit unter großer Hitze (100-120 °C) das Crosslinking weitestgehend aufgehoben wird (Ramos-Vara 2005). In einem auf das Protein abgestimmten leicht basischen (pH 9) oder leicht sauren (pH 6) Milieu kann der Demaskierungsprozess weiterhin optimiert werden (Shi et al. 1991). Ein weiteres Problem ist die biologische Variabilität von Antikörpern. Typischerweise existieren für ein Zielprotein viele verschiedene Antikörper, wobei sich die meisten in ihrer Struktur unterscheiden. Dies führt zu unterschiedlichen Bindungseigenschaften mit unterschiedlicher Affinität und unterschiedlicher Neigung zu unspezifischen Färbereaktionen beziehungsweise Kreuzreaktivitäten mit anderen Proteinen. Da die genannten unerwünschten „Nebenwirkungen“ von Antikörpern nach Fixierung in Formalin anders sind als bei nativen Geweben, muss die Sensitivität und Spezifität eines Antikörpers, welcher in der Immunhistochemie zur Anwendung kommen soll, anders validiert werden, als ein Antikörper für die Anwendung in der Durchflusszytometrie oder an nicht fixierten Zellen (Saper 2009; Bordeaux et al. 2010; Bostrom et al. 2009; Ramos-Vara und Miller 2014). Die von der internationalen Arbeitsgruppe für Antikörper-Validierung (International Working Group for Antibody Validation, IWGAV) für Antikörper zur Immunhistochemie vorgeschlagenen Validierungsverfahren sind der Vergleich mit den Ergebnissen einer anderen Methode für den Expressionsnachweis (z. B. RNA-Messung) oder der Vergleich mit einem anderen unabhängigen Antikörper für das gleiche Zielprotein (Uhlen et al. 2016). Diese Verfahren kamen in der vorliegenden Studie für die Validierung unseres Antikörpers zur Anwendung.

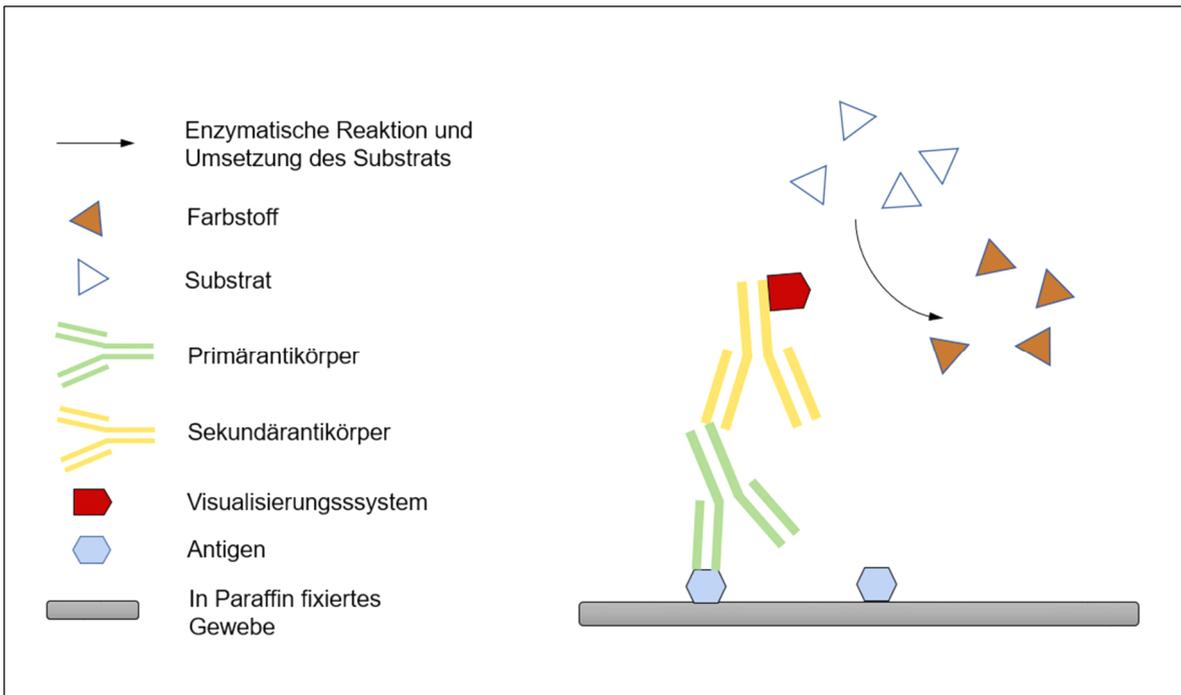


Abbildung 11: **Schematische Darstellung der immunhistochemischen Antigen-detektion.** Der unkonjugierte Primärantikörper bindet an für ihn spezifische Epitope im Gewebe. Dieser wird wiederum von einem mit einem Visualisierungssystem konjugierten Sekundärantikörper spezifisch gebunden. Bei Kontakt eines Substrates (z. B. Diaminobenzidin (DAB)) mit dem Visualisierungssystem entsteht ein bräunlich sichtbarer Farbstoff. Modifiziert nach (Ramos-Vara und Miller 2014)

### 2.3 Für die Studie verwendete Tissue-Microarrays

Für die vorliegende Studie wurden ein Normalgewebe-TMA und ein Set verschiedener Tumor-TMAs verwendet. Der Normalgewebe-TMA bestand aus je 8 Gewebeproben von 76 verschiedenen Normalgewebeskategorien. Die genaue Zusammensetzung des TMAs ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: **Normalgewebe Tissue-Microarray.** Sortiert nach der auf dem Paraffinblock aufgetragenen Reihenfolge.

Untersuchte Normalgewebeskategorien; Organ, Gewebe			
1.	Aorta, Endothel	39.	Rektum, Mukosa
2.	Aorta, Media	40.	Gallenblase, Epithel
3.	Herz	41.	Leber
4.	Quergestreifte Muskulatur	42.	Pankreas
5.	Zunge, Muskulatur	43.	Glandula parotidea
6.	Uterus, Myometrium	44.	Glandula submandibularis
7.	Appendix, muskuläre Wand	45.	Glandula sublingualis
8.	Ösophagus, muskuläre Wand	46.	Knochenmark
9.	Magen, muskuläre Wand	47.	Duodenum, Brunnerdrüse

10.	Ileum, muskuläre Wand	48.	Niere, Kortex
11.	Colon descendens, muskuläre Wand	49.	Niere, Mark
12.	Nierenbecken, muskuläre Wand	50.	Prostata
13.	Harnblase, muskuläre Wand	51.	Glandula vesiculosa
14.	Penis, Corpus spongiosum	52.	Nebenhoden
15.	Ovar, Stroma	53.	Hoden
16.	Fettgewebe	54.	Bronchus, Mukosa
17.	Haut	55.	Bronchialdrüse
18.	Haut, Haarfollikel, Talgdrüse	56.	Sinus paranasales
19.	Lippe, Mundschleimhaut	57.	Lunge
20.	Mundhöhle	58.	Mamma
21.	Tonsille, Oberflächenepithel	59.	Endozervix
22.	Analkanal, Zona cutanea	60.	Endometrium, Proliferationsphase
23.	Analkanal, Zona transitionalis	61.	Endometrium, Sekretionsphase
24.	Ektozervix	62.	Tuba uterina, Mukosa
25.	Ösophagus, Plattenepithel	63.	Unreife Plazenta, Dezidua
26.	Nierenbecken, Urothel	64.	Ovar, Corpus luteum
27.	Harnblase, Urothel	65.	Ovar, folliculäre Zyste
28.	Reife Plazenta, Amnion und Chorion	66.	Unreife Plazenta
29.	Lymphknoten	67.	Reife Plazenta
30.	Milz	68.	Nebennierenrinde
31.	Thymus	69.	Nebenschilddrüse
32.	Tonsille	70.	Schilddrüse
33.	Magen, Antrum	71.	Kleinhirn, Stratum moleculare
34.	Magen, Corpus	72.	Kleinhirn, Stratum neuronorum
35.	Duodenum, Mukosa	73.	Großhirn, Rinde
36.	Ileum, Mukosa	74.	Großhirn, Mark
37.	Appendix, Mukosa	75.	Hypophyse, Hinterlappen und Infundibulum
38.	Colon descendens, Mukosa	76.	Hypophyse, Vorderlappen

Der Tumor-TMA bestand aus 6.929 Tumoren von 115 verschiedenen Tumortypen und Subtypen, welche auf 17 Gewebeblöcke verteilt waren. Die genaue Zusammensetzung des Tumor-TMAs ist in Tabelle 4 dargestellt. Von 565 untersuchten Urothelkarzinomen standen in 531 Fällen histopathologische Daten zur Verfügung.

Tabelle 4: Auflistung der untersuchten Tumorentitäten.

<b>Tumorgruppe</b>	<b>Tumortyp/ -subtyp</b>	<b>(n) in TMA's</b>
<b>Tumoren der Haut</b>	Pilomatrixom	35
	Basalzellkarzinom	88
	Benigner Naevus	29
	Plattenepithelkarzinom der Haut	90
	Malignes Melanom	48
	Malignes Melanom, LKM	86
	Merkelzellkarzinom	46
<b>Tumoren des Halses und des Nackens</b>	Larynx, Plattenepithelkarzinom	110
	Pharynx, Plattenepithelkarzinom	60
	Mundboden, Plattenepithelkarzinom	130
	Glandula Parotis, pleomorphes Adenom	50
	Glandula Parotis, Warthin Tumor	49
	Basalzellenadenom, Speicheldrüse	15
<b>Tumoren der Lunge, der Pleura und des Thymus</b>	Lunge, Adenokarzinom	246
	Lunge, Plattenepithelkarzinom	130
	Lunge, Kleinzelliges Karzinom	20
	Malignes Mesotheliom	48
	Thymom	29
<b>Tumoren des weiblichen Genitaltraktes</b>	Vagina, Plattenepithelkarzinom	78
	Vulva, Plattenepithelkarzinom	130
	Zervix, Plattenepithelkarzinom	129
	Zervix, Adenokarzinom	21
	Endometrium, endometrioides Karzinom	50
	Endometrium, seröses Karzinom	50
	Uterus, Karzinosarkom	20
	Ovarialkarzinom, endometrioid	69
	Ovarialkarzinom, serös	130
	Ovarialkarzinom, muzinös	52
	Ovarialkarzinom, klarzellig	22
	Ovar, Karzinosarkom	17
	Ovar, Granulosarzelltumor	37
	Ovar, Leydigzell-Tumor	4
	Ovar, Sertolizell-Tumor	1
	Ovar, Sertoli-Leydigzell-Tumor	3
	Ovar, Steroidzelltumor	3
	Ovar, Brenner Tumor	41
<b>Tumoren der Mamma</b>	Invasives Mammakarzinom, kein spezieller Typ	126
	Mammakarzinom, lobulär	123

	Mammakarzinom, medullär	15
	Mammakarzinom, tubulär	18
	Mammakarzinom, muzinös	22
	Phylloider Tumor der Mamma	50
<b>Tumoren des Verdauungstraktes</b>	Polyp, adenomatös, low-grade Dysplasie	50
	Polyp, adenomatös, high-grade Dysplasie	50
	Kolon, Adenokarzinom	131
	Magen, Adenokarzinom, diffuser Typ	130
	Magen, Adenokarzinom, intestinaler Typ	130
	Ösophagus, Adenokarzinom	133
	Ösophagus, Plattenepithelkarzinom	124
	Anal-Kanal, Plattenepithelkarzinom	89
	Cholangiokarzinom	50
	Hepatozelluläres Karzinom	50
	Pankreas, duktales Adenokarzinom	131
	Pankreas, Ampulläres Adenokarzinom	58
	Pankreas, Azinuszellkarzinom	10
	Gastrointestinaler Stromatumor (GIST)	50
<b>Tumoren des Harntraktes</b>	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa, G2, low grade	117
	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa, G2, high grade	141
	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa, G3	219
	Urothelkarzinom, pT2-pT4, G3	436
	Harnblase, Plattenepithelkarzinom	22
	Harnblase, kleinzelliges neuroendokrines Karzinom	21
	Nierenbecken, Urothelkarzinom	62
	Nierenzellkarzinom, papillär	50
	Nierenzellkarzinom, klarzellig	50
	Nierenzellkarzinom, chromophob	50
	Onkozytom	50
<b>Tumoren des männlichen Genitaltraktes</b>	Prostata, Adenokarzinom, Gleason 3+3	83
	Prostata, Adenokarzinom, Gleason 4+4	80
	Prostata, Adenokarzinom, Gleason 5+5	85
	Prostata, kleinzelliges neuroendokrines Karzinom	17
	Hoden, Seminom	50
	Hoden, Embryonales Karzinom	50
	Hoden, Dottersack Tumor	50
	Hoden, Sertolizell-Tumor	2
	Hoden, Leydigzell-Tumor	30
	Hoden, Keimstrangtumor	1
	Hoden, Spermatozystischer Tumor	1

	Teratom	50
	Plattenepithelkarzinom, Penis	80
<b>Tumoren des endokrinen Systems</b>	Adenom, Schilddrüse	50
	Adenom, Nebenschilddrüse	43
	Schilddrüsenkarzinom, papillär	50
	Schilddrüsenkarzinom, follikulär	45
	Schilddrüsenkarzinom, medullär	54
	Schilddrüsenkarzinom, anaplastisch	26
	Nebennierenrinden Adenom	50
	Nebennierenrindenkarzinom	26
	Phäochromozytom	50
	Pankreas, neuroendokriner Tumor (NET)	89
	Pankreas, neuroendokrines Karzinom (NEC)	13
	Appendix, neuroendokriner Tumor (NET)	22
	Kolorektaler neuroendokriner Tumor (NET)	11
	Kolorektales neuroendokrines Karzinom (NEC)	12
	Ileum, neuroendokriner Tumor (NET)	49
	Lunge, neuroendokriner Tumor (NET)	19
	Gallenblase, neuroendokrines Karzinom (NEC)	4
<b>Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes</b>	Hodgkin Lymphom	103
	Klein lymphatisches Lymphoma, B-cell Typ (B-SLL/B-CLL)	50
	Diffuses großes B-Zell-Lymphom (DLBCL)	114
	Follikuläres Lymphom	88
	T-Zell Non-Hodgkin Lymphom	24
	Mantelzell Lymphom	18
	Marginalzonen Lymphom	16
	Diffuses großes B-Zell Lymphom (DLBCL) des Hodens	16
	Burkitt Lymphom	5
<b>Tumoren der Knochen und Weichteile</b>	Tendosynovialer Riesenzelltumor	45
	Granularzelltumor	30
	Leiomyom	50
	Leiomyosarkom	49
	Liposarkom	49
	Angiosarkom	32
	Rhabdoider Tumor	5
	Osteosarkom	43
	Chondrosarkom	39
	<b>Summe</b>	<b>6.929</b>

## 2.4 Uroplakin 1A Immunhistochemie

Die mit dem Mikrotom präparierten und auf Objektträger aufgebrauchten TMA-Schnitte (2,5 µm Schnittstärke) wurden über Nacht im Brutschrank bei 60 °C gelagert und am nächsten Tag gefärbt. Die Objektträger wurden dazu zur Entparaffinierung mit Xylol behandelt, mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und anschließend unter destilliertem Wasser abgespült. Um das durch die Gewebefixierung verursachte Crosslinking zu revidieren, erfolgte die hitzeinduzierte Antigen-Demaskierung für 5 Minuten in einem Autoklav bei 121°C unter Zugabe von Tris-EDTA-Citrat Puffer mit einem pH-Wert von 7,8 (Target Retrieval Solution Buffer Dako). Ein weiterer essentieller Schritt ist die Blockierung der Peroxidase-Aktivität, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Dazu wurden die Objektträger mit Blocking Solution (Agilent, Dako #S2023) für 10 Minuten behandelt und anschließend dreimal mit TBS-T-Puffer für je 5 Minuten gespült. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Uroplakin 1A spezifischen Primärantikörper (monoklonaler Maus-Antikörper MSVA-735M, MS Validated Antibodies, Hamburg, Germany) bei 37 °C für 60 Minuten in einer Verdünnung von 1:50 und die erneute Spülung mit TBS-T-Puffer. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Agilent, Dako EnVision, mouse/rabbit #K5007) erfolgte für weitere 30 Minuten bei 37 °C. Auch hier wurden die Schnitte anschließend mit TBS-T Puffer behandelt, um unspezifische Antikörperreaktionen zu vermeiden. Schließlich wurde die Antigen-Antikörper-Reaktion durch Zugabe des DAB-Chromogens (Dako, #K5007) bei 10 Minuten Einwirkzeit visualisiert. Nach Spülung unter destilliertem Wasser wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt, in Leitungswasser gebläut, in aufsteigender Alkoholreihe und anschließender Xylol-Behandlung dehydriert und zuletzt mit einer Folie im Automaten eingedeckt.

Tabelle 5: **Protokoll der Uroplakin 1A Immunhistochemie.** Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte für die Visualisierung von Uroplakin 1A.

Ziel	Arbeitsschritte und Reagenzien
1. Vorbereitung der Objektträger	<ul style="list-style-type: none"> <li>Herstellung von 2,5 µm Schnitten eines jeden TMA-Blocks</li> <li>Lagerung der Schnitte bei 60 °C im Brutschrank</li> </ul>
2. Entparaffinierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>Xylol-Behandlung der Schnitte (3x 5 Minuten)</li> <li>Rehydrierung durch absteigende Alkoholreihe und anschließender Spülung mit Aqua destillata</li> </ul>
3. Antigen-Demaskierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>Autoklavieren der Schnitte bei 121 °C für 5 Minuten unter Zugabe von Tris-EDTA-Citrat-Puffer (pH 7,8)</li> <li>Spülung mit Aqua destillata (2x)</li> <li>Spülung mit TBS-T-Puffer</li> </ul>

4. Peroxidaseblock	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auslegen der Schnitte in feuchter Kammer</li> <li>• Peroxidase Blocking Solution (#S2023) RTU für 10 Minuten</li> <li>• Spülung mit TBS-T-Puffer (3x 5 Minuten)</li> </ul>
5. Inkubation mit Primärantikörper	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inkubation mit 1:50 anti-UPK1A Antikörper bei 37 °C für 60 Minuten (MSVA-735M, MS Validated Antibodies, Hamburg, Germany)</li> <li>• Spülung mit TBS-T-Puffer (3x 5 Minuten)</li> </ul>
6. Inkubation mit Sekundärantikörper	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inkubation mit EnVision (mouse/rabbit #K5007) Sekundärantikörper bei 37 °C für 30 Minuten</li> <li>• Spülung mit TBS-T-Puffer (3x 5 Minuten)</li> </ul>
7. Visualisierung durch Chromogen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zugabe von DAB-Chromogen (#K5007) bei Raumtemperatur für 10 Minuten</li> <li>• Spülung mit Aqua destillata (1x)</li> </ul>
8. Gegenfärbung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hämatoxylin für 3 Minuten</li> <li>• Bläuen mit Leitungswasser für 5 Minuten</li> </ul>
9. Dehydrierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dehydrierung durch aufsteigende Alkoholreihe und anschließende Xylol-Behandlung (3x 5 Minuten)</li> </ul>
10. Eindecken	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eindecken aller Schnitte</li> </ul>

Die Auswertung aller Gewebestanden wurde von einer erfahrenen Pathologin vorgenommen. Die Intensität der Immunfärbung wurde auf einer Skala von 0-3 beurteilt und der prozentuale Anteil der gefärbten Tumorzellen angegeben. Daraufhin lassen sich die einzelnen Gewebeproben in die Kategorien negativ, schwach positiv, moderat positiv und stark positiv einteilen. Eine Veranschaulichung des am UKE angewandten Klassifikationssystems findet sich in der nachfolgenden Tabelle.

Tabelle 6: **Klassifikationssystem.** Kriterien zur Auswertung der Immunhistochemie.

Kategorie	Anteil gefärbter Tumorzellen in %	Intensität der Färbung
Negativ	0	0
Schwach positiv	≤ 70	1
	≤ 30	2
	> 70	1
Moderat positiv	31 – 70	2
	≤ 30	3
Stark positiv	> 70	2
	> 30	3

## 2.5 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit der Software JMP14 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) vorgenommen. Der  $\chi^2$ -Test und Mehrfachtests wurden durchgeführt, um nach Zusammenhängen zwischen UPK1A und Tumorphänotypen zu ermitteln. Ein p-Wert von  $\leq 0.05$  wurde als signifikant definiert.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Technische Aspekte

Insgesamt 5.323 der 6.929 untersuchten Tumorproben aus dem Tumor-TMA ergaben ein verwertbares Ergebnis, während 1.606 (23,2%) nicht auswertbar waren. Gründe für nicht Auswertbarkeit waren entweder ein völliges Fehlen von Gewebe an den entsprechenden Positionen des TMAs oder aber das Fehlen von eindeutigen Tumorzellen auf der gefärbten Gewebeprobe. Von allen auf den Normalgewebe-TMA aufbrachten Normalgewebetypen waren ausreichend Gewebeproben vorhanden, um insgesamt eine Beurteilung der Gewebe bezüglich der Uroplakin 1A Expression vorzunehmen.

### 3.2 Uroplakin 1A Immunfärbung in Normalgeweben

Die stärkste UPK1A Anfärbung war im Urothel in den obersten drei Zellschichten inklusive der Schirmzellen zu sehen, dagegen war die Immunfärbung in den Basalzellen Uroplakin 1A negativ. Eine deutlich schwächere Färbung fand sich außerdem in einigen Zellschichten (mittleres Drittel) von Plattenepithelien verschiedener Kategorien, jedoch nicht in allen. Eine mäßiggradig fokale UPK1A Positivität trat gelegentlich in der Prostata oder der Samenblase auf, welche auf vereinzelt vorkommende urotheliale Zellen oder eine urotheliale Metaplasie in Prostataadrüsen zurückzuführen sein können. Hingegen konnte keine Positivität im Plattenepithel der Krypten der Tonsillen, Hassall'schen Körperchen, Talgdrüsen, Magen, Duodenum, Brunnerdrüsen, Ileum, Appendix, Kolon, Gallenblase, Leber, Pankreas, Speicheldrüsen, respiratorisches Epithel, Lunge, Mamma, Endometrium, Endozervix, Eileiter, Plazenta, Ovar, Testis, Epididymis, Niere, Nebenniere, Schilddrüsen, Nebenschilddrüse, Neuro- und Adenohypophyse und Gehirn festgestellt werden. Repräsentative Beispiele der UPK1A Expression in Normalgeweben sind in Abbildungen 12-23 dargestellt.

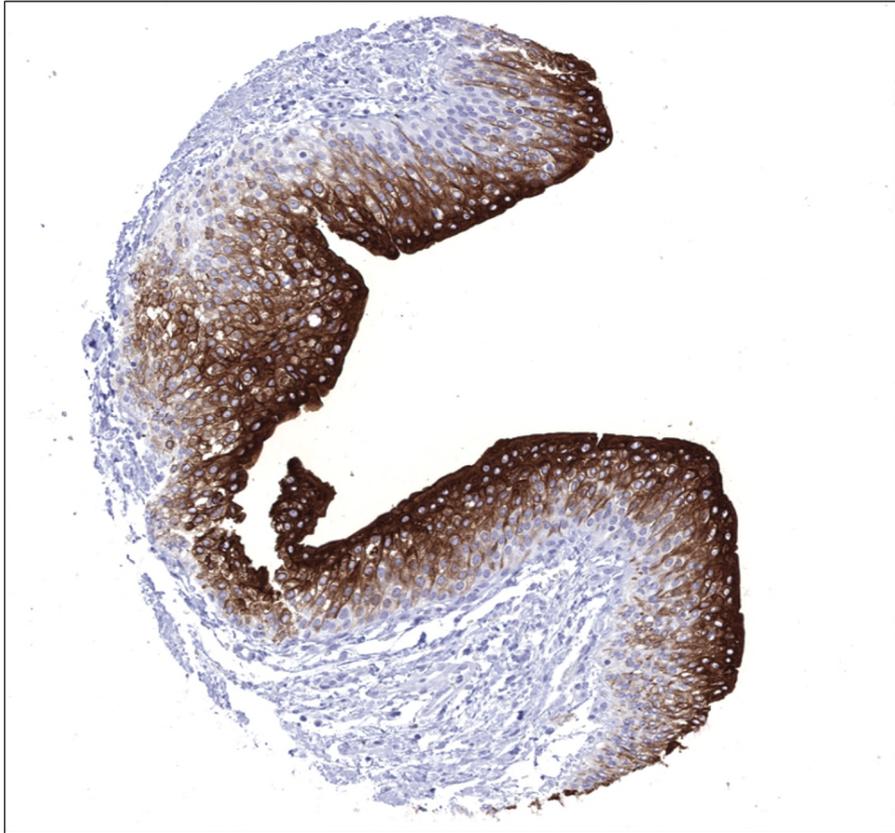


Abbildung 12: **Harnblase, Urothel.** Stark Uroplakin 1A positive Färbung.



Abbildung 13: **Harnblase, Urothel.** Starke Uroplakin 1A Färbung, vorwiegend im oberen Anteil des Urothels.

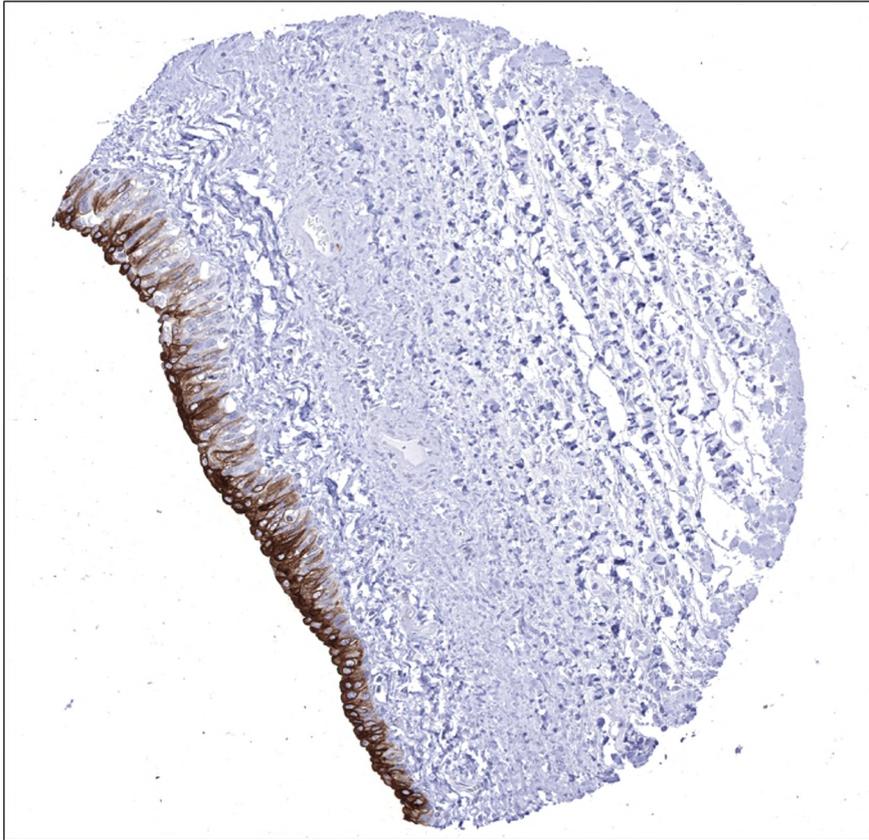


Abbildung 14: **Nierenbecken, Urothel.** Stark positive Uroplakin 1A Färbung.

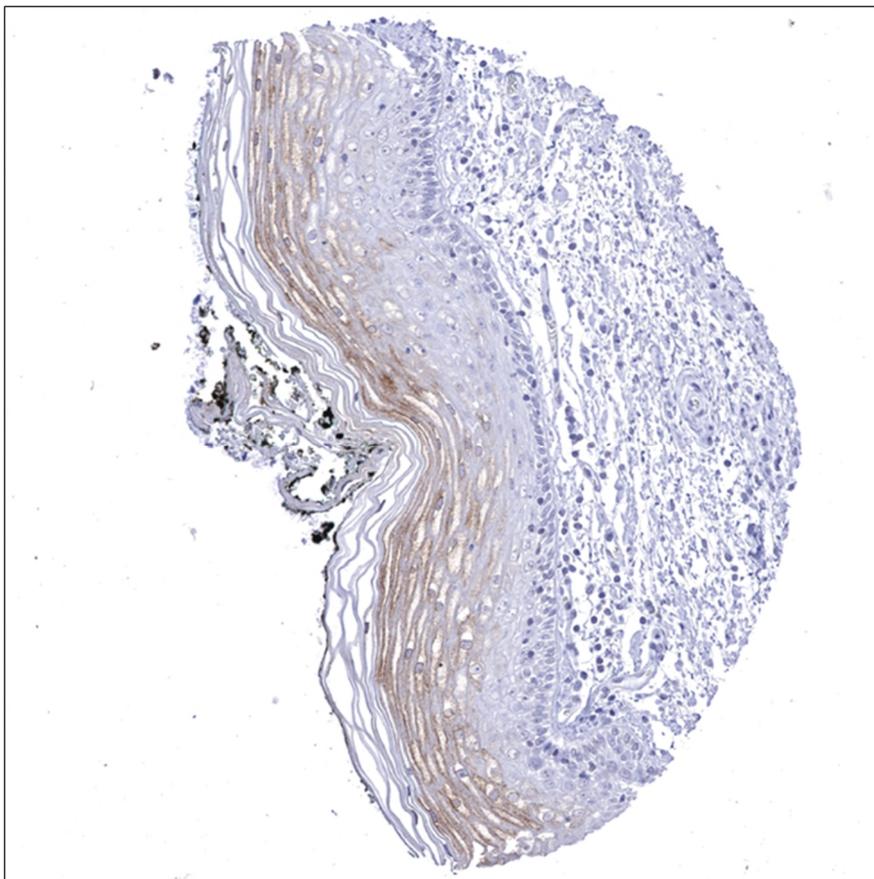


Abbildung 15: **Analkanal.** Moderate Uroplakin 1A Färbung im oberen Drittel des Epithels.

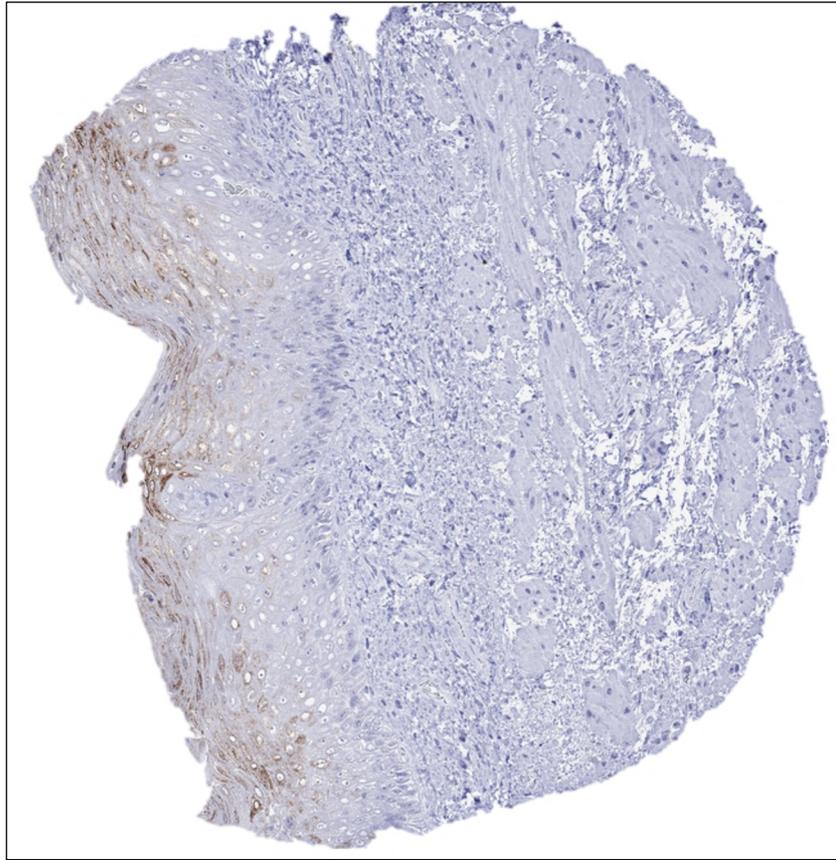


Abbildung 16: **Ösophagus, Plattenepithel (unverhornt)**. Moderate Uroplakin 1A Färbung im oberen Drittel.

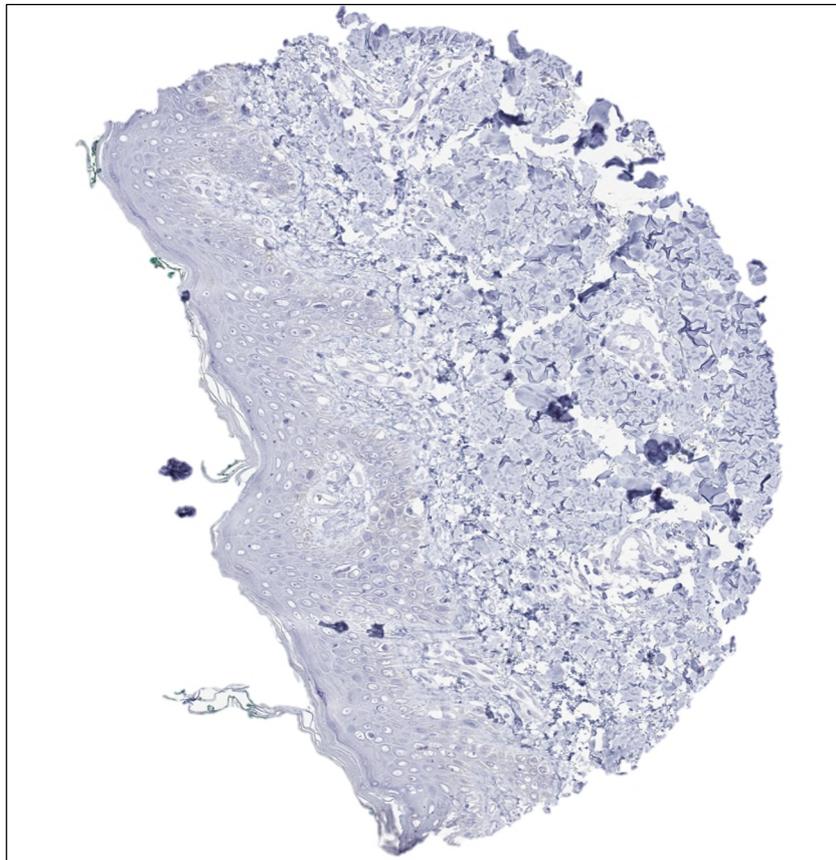


Abbildung 17: **Haut (verhornt)**. Keine eindeutige Uroplakin 1A Färbung.

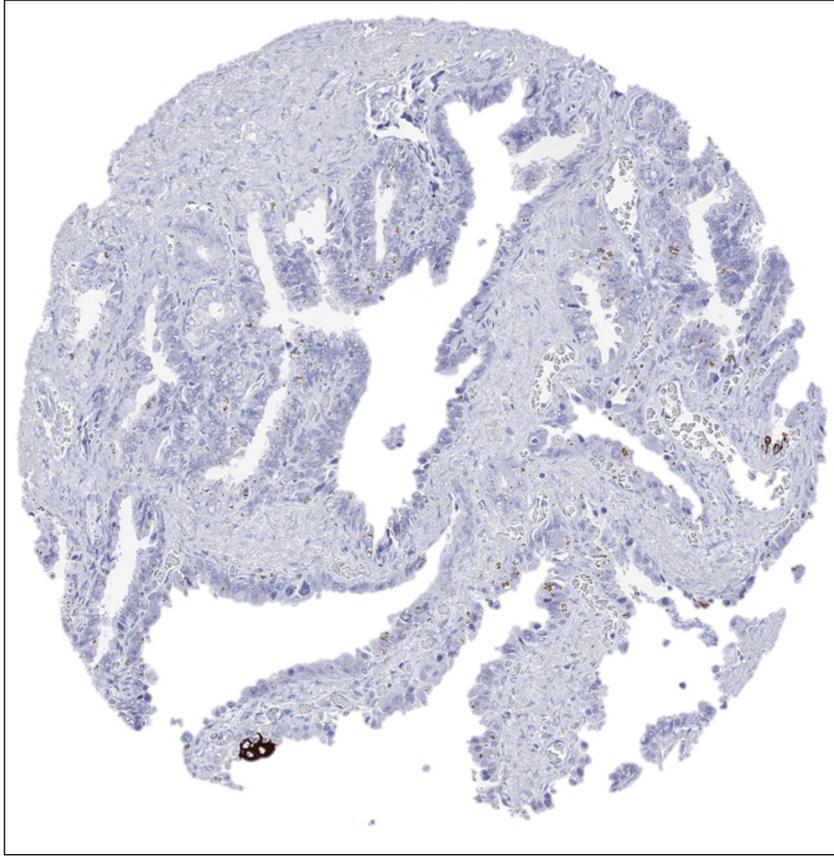


Abbildung 18: **Samenblase**. Stark Uroplakin 1A positive Färbung einiger weniger epithelialer Zellen.

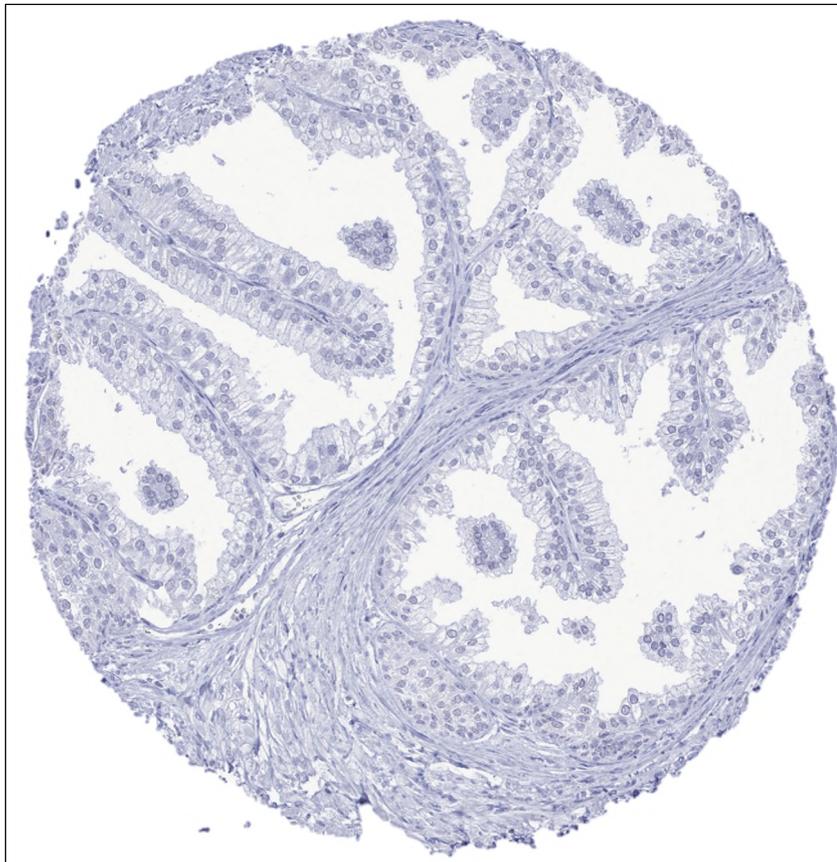


Abbildung 19: **Prostata**. Keine Uroplakin 1A Färbung.

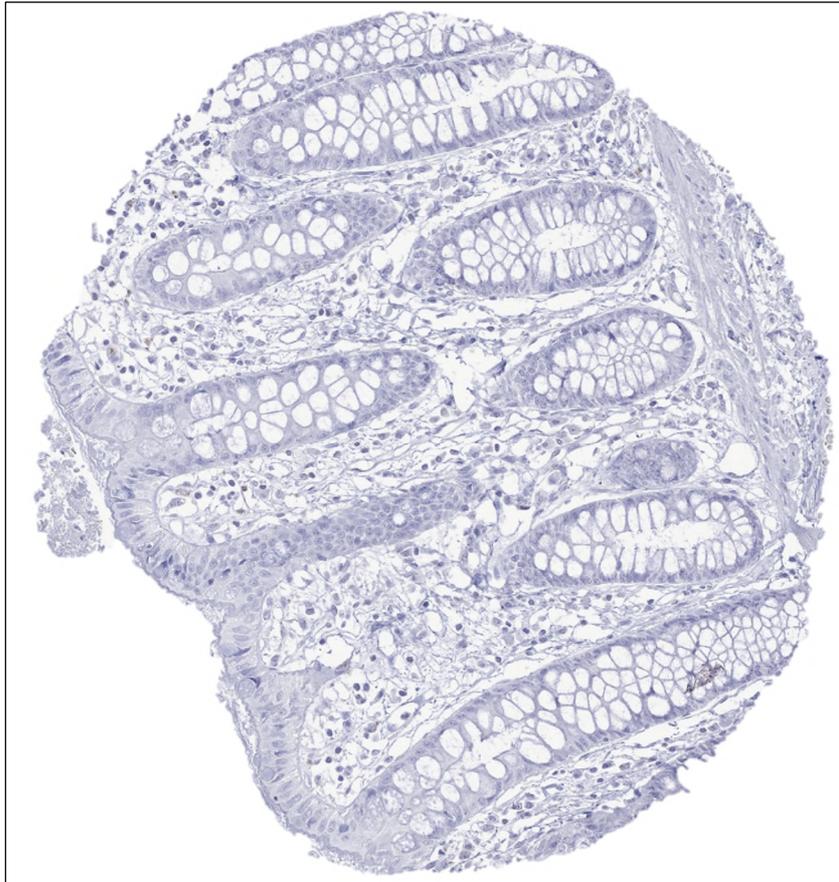


Abbildung 20: **Kolon descendens**. Keine Uroplakin 1A Färbung.

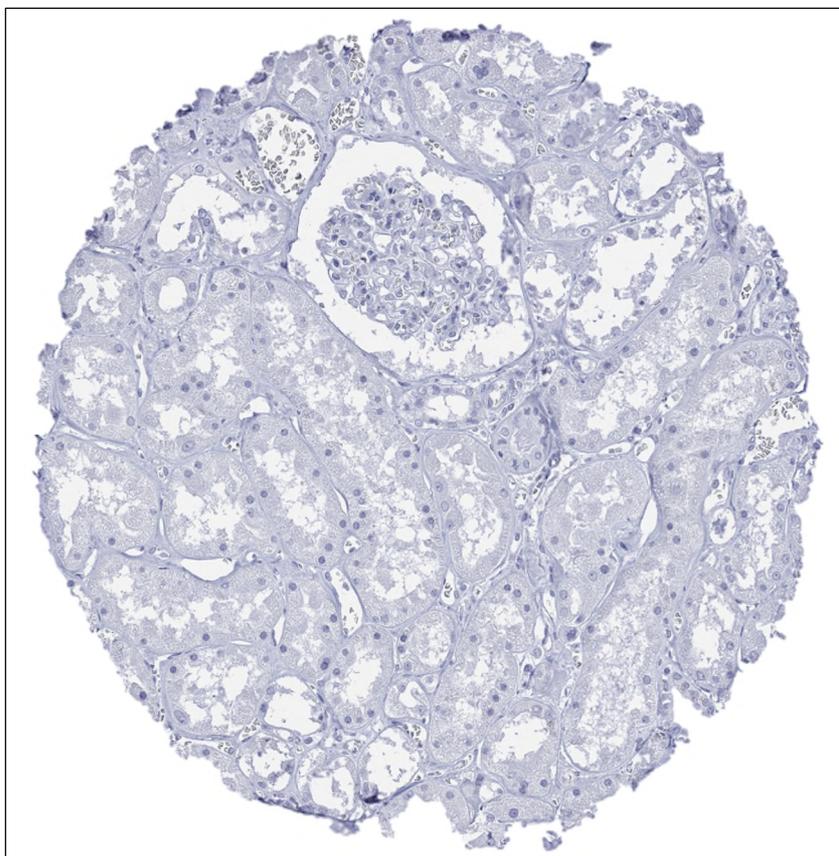


Abbildung 21: **Nierenrinde**. Keine Uroplakin 1A Färbung.

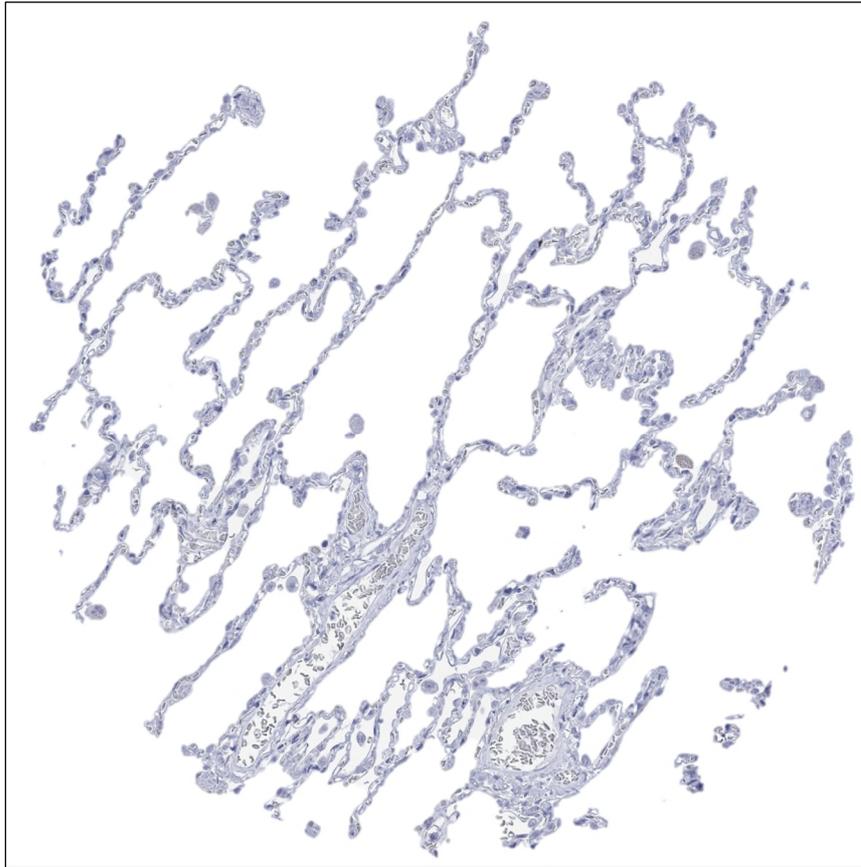


Abbildung 22: **Lunge**. Keine Uroplakin 1A Färbung

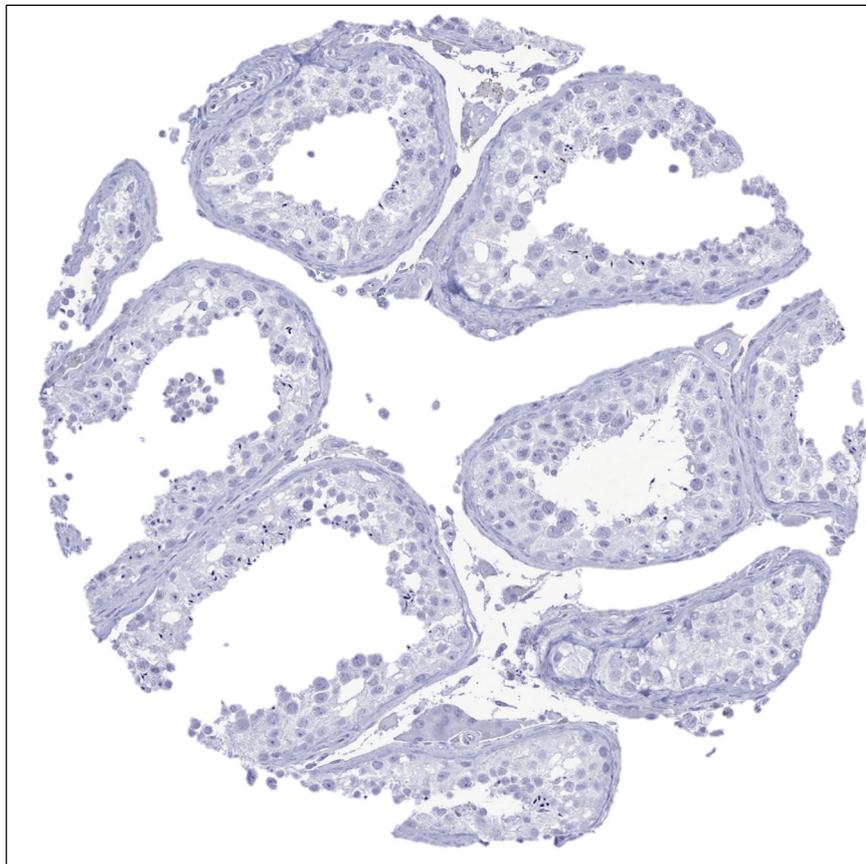


Abbildung 23: **Hoden**. Keine Uroplakin 1A Färbung.

### 3.3 Uroplakin 1A Immunfärbung in Tumoren

Eine Uroplakin 1A Färbung in mindestens einem Tumor fand sich bei 34 von 115 untersuchten Tumortypen. Dabei waren 625 von insgesamt 6.929 untersuchten Tumoren positiv, davon 50,9 % stark, 20,5 % mäßig stark und 28,6 % schwach positiv. Eine organsystematische Darstellung der Uroplakin 1A Färbeergebnisse ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Erweiterung der in Tabelle 4 gezeigten untersuchten Tumorentitäten mit Angabe der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung.

Tumorgruppe	Tumortyp/ -subtyp	(n) in TMA	analysierbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
<b>Tumoren der Haut</b>	Pilomatrixom	35	25	100,0	0,0	0,0	0,0
	Basalzellkarzinom	88	78	100,0	0,0	0,0	0,0
	Benigner Naevus	29	22	100,0	0,0	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom der Haut	90	89	98,9	1,1	0,0	0,0
	Malignes Melanom	48	43	100,0	0,0	0,0	0,0
	Malignes Melanom, Lymphknoten Metastasen	86	84	100,0	0,0	0,0	0,0
	Merkelzellkarzinom	46	28	100,0	0,0	0,0	0,0
<b>Tumoren des Halses und des Nackens</b>	Larynx, Plattenepithelkarzinom	110	79	94,9	2,5	2,5	0,0
	Pharynx, Plattenepithelkarzinom	60	58	100,0	0,0	0,0	0,0
	Mundboden, Plattenepithelkarzinom	130	112	97,3	2,7	0,0	0,0
	Glandula Parotis, pleomorphes Adenom	50	32	100,0	0,0	0,0	0,0
	Glandula Parotis, Warthin Tumor	49	36	100,0	0,0	0,0	0,0
	Basalzelladenom, Speicheldrüse	15	10	90,0	10,0	0,0	0,0
<b>Tumoren der Lunge, der Pleura und des Thymus</b>	Adenokarzinom, Lunge	246	171	99,4	0,0	0,6	0,0
	Plattenepithelkarzinom, Lunge	130	70	100,0	0,0	0,0	0,0
	Kleinzelliges Karzinom, Lunge	20	10	100,0	0,0	0,0	0,0
	Malignes Mesotheliom	48	25	100,0	0,0	0,0	0,0
	Thymom	29	24	100,0	0,0	0,0	0,0
<b>Tumoren des weiblichen Genitaltraktes</b>	Vagina, Plattenepithelkarzinom	78	45	100,0	0,0	0,0	0,0
	Vulva, Plattenepithelkarzinom	130	109	100,0	0,0	0,0	0,0
	Zervix, Plattenepithelkarzinom	129	110	98,2	1,8	0,0	0,0
	Zervix, Adenokarzinom	21	21	95,2	4,8	0,0	0,0
	Endometrium, endometroides Karzinom	50	45	97,8	2,2	0,0	0,0

	Endometrium, seröses Karzinom	50	26	100,0	0,0	0,0	0,0
	Uterus, Karzinosarkom	20	20	85,0	15,0	0,0	0,0
	Ovarialkarzinom, endometroid	69	58	100,0	0,0	0,0	0,0
	Ovarialkarzinom, serös	130	117	97,4	1,7	0,9	0,0
	Ovarialkarzinom, muzinös	52	42	100,0	0,0	0,0	0,0
	Ovarialkarzinom, klarzellig	22	20	100,0	0,0	0,0	0,0
	Ovar, Karzinosarkom	17	16	100,0	0,0	0,0	0,0
	Ovar, Granulosarzelltumor	37	35	100,0	0,0	0,0	0,0
	Ovar, Leydigzell-Tumor	4	4	100,0	0,0	0,0	0,0
	Ovar, Sertolizell-Tumor	1	1	100,0	0,0	0,0	0,0
	Ovar, Sertoli-Leydigzell-Tumor	3	3	100,0	0,0	0,0	0,0
	Ovar, Steroidzelltumor	3	3	100,0	0,0	0,0	0,0
	Ovar, Brenner Tumor	41	37	35,1	27,0	21,6	16,2
<b>Tumoren der Mamma</b>	Invasives Mammakarzinom, kein spezieller Typ	126	71	95,8	4,2	0,0	0,0
	Mammakarzinom, lobulär	123	97	96,9	3,1	0,0	0,0
	Mammakarzinom, medullär	15	12	100,0	0,0	0,0	0,0
	Mammakarzinom, tubulär	18	7	100,0	0,0	0,0	0,0
	Mammakarzinom, muzinös	22	15	100,0	0,0	0,0	0,0
	Phylloider Tumor der Mamma	50	44	100,0	0,0	0,0	0,0
<b>Tumoren des Verdauungstraktes</b>	Polyp, adenomatös, low-grade Dysplasie	50	21	100,0	0,0	0,0	0,0
	Polyp, adenomatös, high-grade Dysplasie	50	44	100,0	0,0	0,0	0,0
	Kolon, Adenokarzinom	131	74	100,0	0,0	0,0	0,0
	Magen Adenokarzinom, diffuser Typ	130	76	98,7	0,0	0,0	1,3
	Magen Adenokarzinom, intestinaler Typ	130	79	97,5	2,5	0,0	0,0
	Ösophagus, Adenokarzinom	133	77	100,0	0,0	0,0	0,0
	Ösophagus, Plattenepithelkarzinom	124	65	100,0	0,0	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom des Anal-Kanals	89	65	95,4	3,1	1,5	0,0
	Cholangiokarzinom	50	37	100,0	0,0	0,0	0,0
	Hepatozelluläres Karzinom	50	39	100,0	0,0	0,0	0,0
	Duktales Adenokarzinom, Pankreas	131	71	98,6	1,4	0,0	0,0
	Ampulläres Adenokarzinom, Pankreas	58	24	95,8	4,2	0,0	0,0
	Azinuszellkarzinom, Pankreas	10	9	88,9	11,1	0,0	0,0
	Gastrointestinaler Stromatumor (GIST)	50	43	100,0	0,0	0,0	0,0

<b>Tumoren des Harntraktes</b>	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2, low grade	117	117	6,0	11,1	23,1	59,8
	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa G2, high grade	141	98	2,0	19,4	12,2	66,3
	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa, G3	219	139	9,4	21,6	17,3	51,8
	Urothelkarzinom, pT2-pT4 G3	436	350	57,4	10,6	9,1	22,9
	Harnblase, Plattenepithelkarzinom	22	20	100,0	0,0	0,0	0,0
	Harnblase, kleinzelliges neuroendokrines Karzinom	21	19	100,0	0,0	0,0	0,0
	Nierenbecken, Urothelkarzinom	62	58	44,8	8,6	10,3	36,2
	Nierenzellkarzinom, papillär	50	45	100,0	0,0	0,0	0,0
	Nierenzellkarzinom, klarzellig	50	39	100,0	0,0	0,0	0,0
	Nierenzellkarzinom, chromophob	50	45	100,0	0,0	0,0	0,0
	Onkozytom	50	41	100,0	0,0	0,0	0,0
<b>Tumoren des männlichen Genitaltraktes</b>	Prostata, Adenokarzinom, Gleason 3+3	83	83	98,8	1,2	0,0	0,0
	Prostata, Adenokarzinom, Gleason 4+4	80	79	91,1	7,6	1,3	0,0
	Prostata, Adenokarzinom, Gleason 5+5	85	83	95,2	3,6	1,2	0,0
	Prostata, kleinzelliges neuroendokrines Karzinom	17	10	100,0	0,0	0,0	0,0
	Hoden, Seminom	50	44	100,0	0,0	0,0	0,0
	Hoden, embryonales Karzinom	50	43	97,7	2,3	0,0	0,0
	Hoden, Dottersack Tumor	50	30	100,0	0,0	0,0	0,0
	Hoden, Sertolizell-Tumor	2	2	100,0	0,0	0,0	0,0
	Hoden, Leydigzell-Tumor	30	1	100,0	0,0	0,0	0,0
	Hoden, Keimstrangtumor	1	1	100,0	0,0	0,0	0,0
	Hoden, spermatozystischer Tumor	1	44	100,0	0,0	0,0	0,0
	Hoden, Teratom	50	29	96,6	3,4	0,0	0,0
	Penis, Plattenepithelkarzinom	80	79	94,9	5,1	0,0	0,0
<b>Tumoren des endokrinen Systems</b>	Schilddrüse, Adenom	50	48	89,6	6,3	4,2	0,0
	Nebenschilddrüse, Adenom	43	44	68,2	20,5	9,1	2,3
	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	50	45	66,7	15,6	13,3	4,4
	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	45	44	100,0	0,0	0,0	0,0
	Medulläres Schilddrüsenkarzinom	54	41	100,0	0,0	0,0	0,0
	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	26	22	95,5	4,5	0,0	0,0
	Nebennierenrinden Adenom	50	46	100,0	0,0	0,0	0,0
	Nebennierenrindenkarzinom	26	20	100,0	0,0	0,0	0,0
	Phäochromozytom	50	44	100,0	0,0	0,0	0,0

	Pankreas, neuroendokriner Tumor (NET)	89	13	100,0	0,0	0,0	0,0
	Pankreas, neuroendokrines Karzinom (NEC)	13	10	100,0	0,0	0,0	0,0
	Appendix, neuroendokriner Tumor (NET)	22	47	100,0	0,0	0,0	0,0
	Kolorektaler neuroendokriner Tumor (NET)	11	18	100,0	0,0	0,0	0,0
	Kolorektales neuroendokrines Karzinom (NEC)	12	77	100,0	0,0	0,0	0,0
	Ileum, neuroendokriner Tumor (NET)	49	11	100,0	0,0	0,0	0,0
	Lunge, neuroendokriner Tumor (NET)	19	4	100,0	0,0	0,0	0,0
	Gallenblase, neuroendokrines Karzinom (NEC)	4	13	100,0	0,0	0,0	0,0
<b>Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes</b>	Hodgkin Lymphom	103	76	100,0	0,0	0,0	0,0
	Klein lymphatisches Lymphoma, B-cell Typ (B-SLL/B-CLL)	50	46	100,0	0,0	0,0	0,0
	Diffuses großes B-Zell-Lymphom (DLBCL)	114	106	100,0	0,0	0,0	0,0
	Follikuläres Lymphom	88	86	100,0	0,0	0,0	0,0
	T-Zell Non-Hodgkin Lymphom	24	24	100,0	0,0	0,0	0,0
	Mantelzell Lymphom	18	18	100,0	0,0	0,0	0,0
	Marginalzonen Lymphom	16	13	100,0	0,0	0,0	0,0
	Diffuses großes B-Zell Lymphom (DLBCL) des Hodens	16	16	100,0	0,0	0,0	0,0
<b>Tumoren der Knochen und Weichteile</b>	Burkitt Lymphom	5	3	100,0	0,0	0,0	0,0
	Tendosynovialer Riesenzelltumor	45	24	100,0	0,0	0,0	0,0
	Granularzelltumor	30	13	100,0	0,0	0,0	0,0
	Leiomyom	50	47	100,0	0,0	0,0	0,0
	Leiomyosarkom	49	39	100,0	0,0	0,0	0,0
	Liposarkom	49	33	100,0	0,0	0,0	0,0
	Angiosarkom	32	23	100,0	0,0	0,0	0,0
	Rhabdoider Tumor	5	17	100,0	0,0	0,0	0,0
Osteosarkom	43	10	100,0	0,0	0,0	0,0	
Chondrosarkom	39	5	100,0	0,0	0,0	0,0	

In Tabelle 8 ist eine Rangliste der untersuchten Tumorkategorien nach der Häufigkeit positiver Befunde abgebildet. Die Darstellung macht deutlich, dass eine UPK1A Färbung überwiegend in verschiedenen Kategorien von Urothelkarzinomen zu finden war, wobei Neoplasien des Urothels auch besonders eine mäßig starke oder starke Uroplakin 1A Positivität aufwiesen. Eine starke UPK1A Immunfärbung fand sich in 66,3% der pTa G2 high grade Tumoren, 59,8% der pTa G2 low grade Tumoren, 51,8% der pTa G3 Tumoren,

36,2% der Urothelkarzinome des Nierenbeckens und 22,9% der muskelinvasiven Urothelkarzinome der Harnblase. Selbst beim Brenner Tumor des Ovars, eine weitere „urotheliale“ Neoplasie, waren 16,2% der Fälle stark Uroplakin 1A positiv.

Tabelle 8: Rangliste untersuchter Tumorkategorien nach Häufigkeit ihrer positiven Befunde.

Tumorentität	≥ schwach (%)	≥ moderat (%)	stark (%)
Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa, G2 high grade	98,0	78,6	66,3
Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom pTa, G2 low grade	94,0	82,9	59,8
Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom, pTa, G3	90,6	69,1	51,8
Ovar, Brenner Tumor	64,9	37,8	16,2
Nierenbecken, Urothelkarzinom	55,2	46,6	36,2
Muskelinvasives Urothelkarzinom, pT2-4, G3	42,6	32,0	22,9
Schilddrüsenkarzinom, follikulär	33,3	17,8	4,4
Schilddrüsenkarzinom, papillär	31,8	11,4	2,3
Uterus, Karzinosarkom	15,0	0,0	0,0
Pankreas, Azinuszellkarzinom	11,1	0,0	0,0
Schilddrüsenadenom	10,4	4,2	0,0
Speicheldrüse, Basalzelladenom	10,0	0,0	0,0
Prostata, Adenokarzinom, Gleason 4+4	8,9	1,3	0,0
Plattenepithelkarzinom des Larynx	5,1	2,5	0,0
Penis, Plattenepithelkarzinom	5,1	0,0	0,0
Prostata, Adenokarzinom, Gleason 5+5	4,8	1,2	0,0
Zervix, Adenokarzinom	4,8	0,0	0,0
Analkanal, Plattenepithelkarzinom	4,6	1,5	0,0
Schilddrüsenkarzinom, anaplastisch	4,5	0,0	0,0
Invasives Mammakarzinom, kein spezieller Typ	4,2	0,0	0,0
Adenokarzinom des Pankreas / der Ampulla vateri	4,2	0,0	0,0
Teratom	3,4	0,0	0,0
Mammakarzinom, lobulär	3,1	0,0	0,0
Mundboden, Plattenepithelkarzinom	2,7	0,0	0,0
Ovarialkarzinom, serös	2,6	0,9	0,0
Magen, Adenokarzinom, intestinaler Typ	2,5	0,0	0,0
Hoden, Embryonalkarzinom	2,3	0,0	0,0
Endometriumkarzinom, endometrioid	2,2	0,0	0,0
Zervix, Plattenepithelkarzinom	1,8	0,0	0,0
Pankreas, duktales Adenokarzinom	1,4	0,0	0,0
Magen, Adenokarzinom, diffuser Typ	1,3	1,3	1,3

Prostata, Adenokarzinom, Gleason 3+3	1,2	0,0	0,0
Haut, Plattenepithelkarzinom	1,1	0,0	0,0
Lunge, Adenokarzinom	0,6	0,6	0,0

Das UPK1A Färbemuster bei Urothelkarzinomen war meist membranös und zytoplasmatisch, nur selten rein zytoplasmatisch. Repräsentative Beispiele Uroplakin 1A positiver Urothelkarzinome sind in Abbildungen 24-32 gezeigt.



Abbildung 24: Urothelkarzinom (pTa, G2 low grade) mit starker UPK1A Positivität in 100% der Tumorzellen.

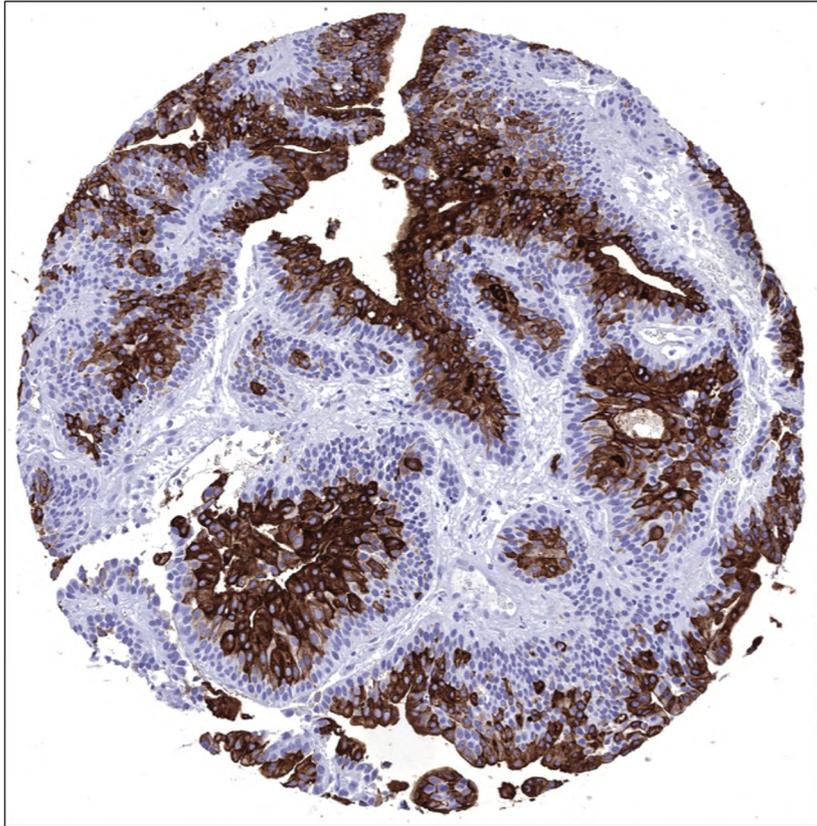


Abbildung 25: Urothelkarzinom (pTa, G2 high grade) mit starker UPK1A Positivität in 80% der Tumorzellen.

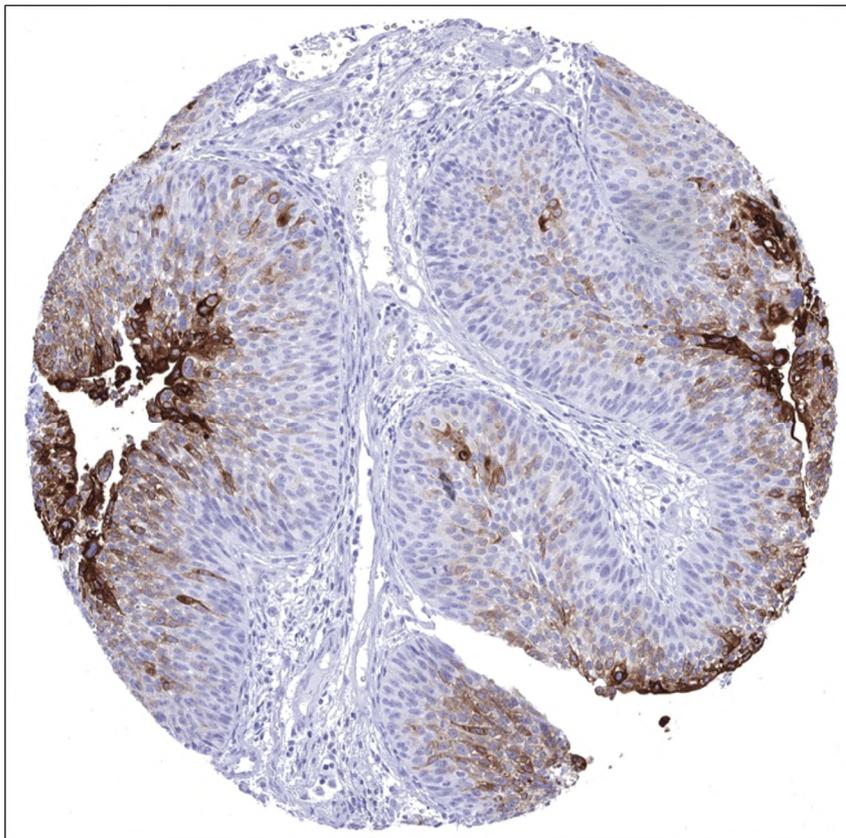


Abbildung 26: Urothelkarzinom (pTa, G2 high grade) mit mäßiger UPK1A Positivität in 30% der Tumorzellen.

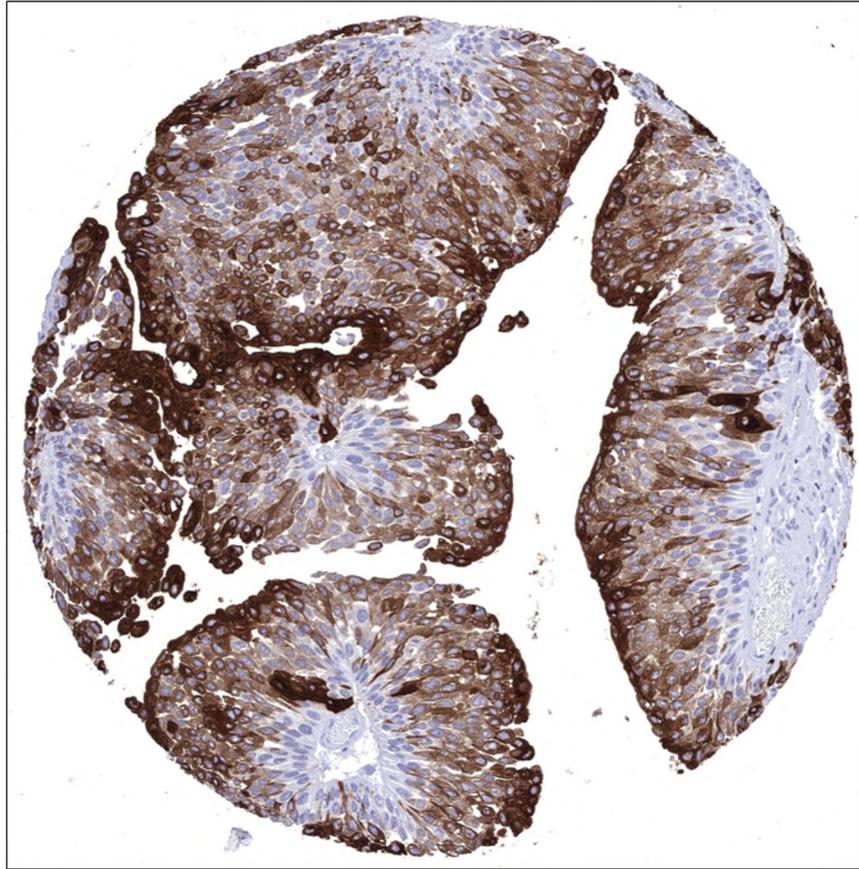


Abbildung 27: Urothelkarzinom (pTa, G3) mit starker UPK1A Positivität in 90% der Tumorzellen.

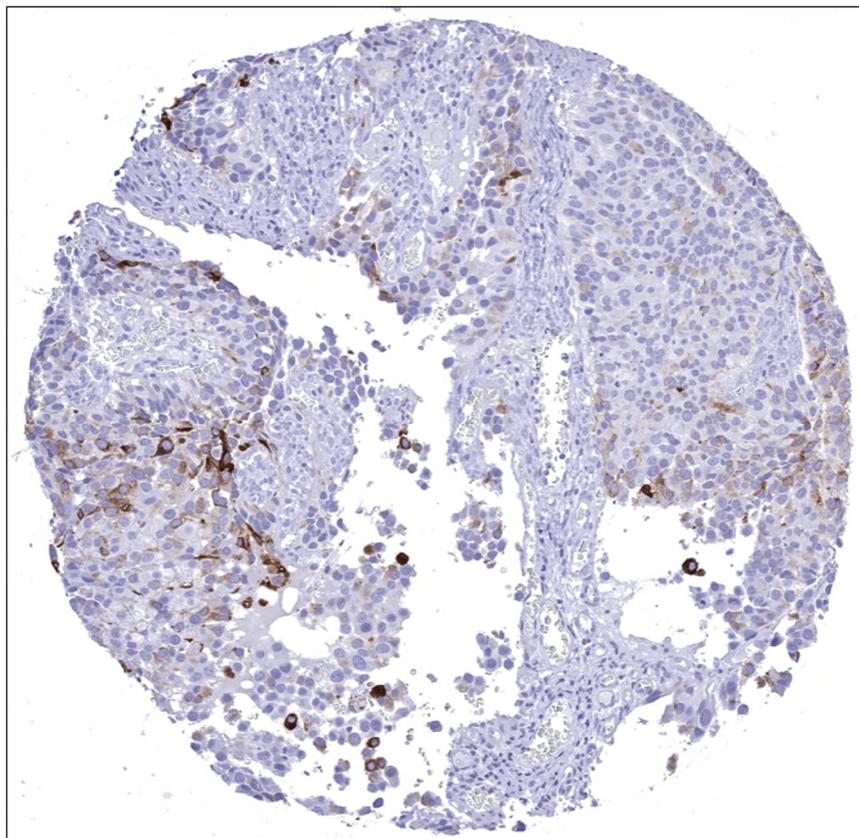


Abbildung 28: Urothelkarzinom (pTa, G3) mit mäßiger UPK1A Positivität in 15% der Tumorzellen.

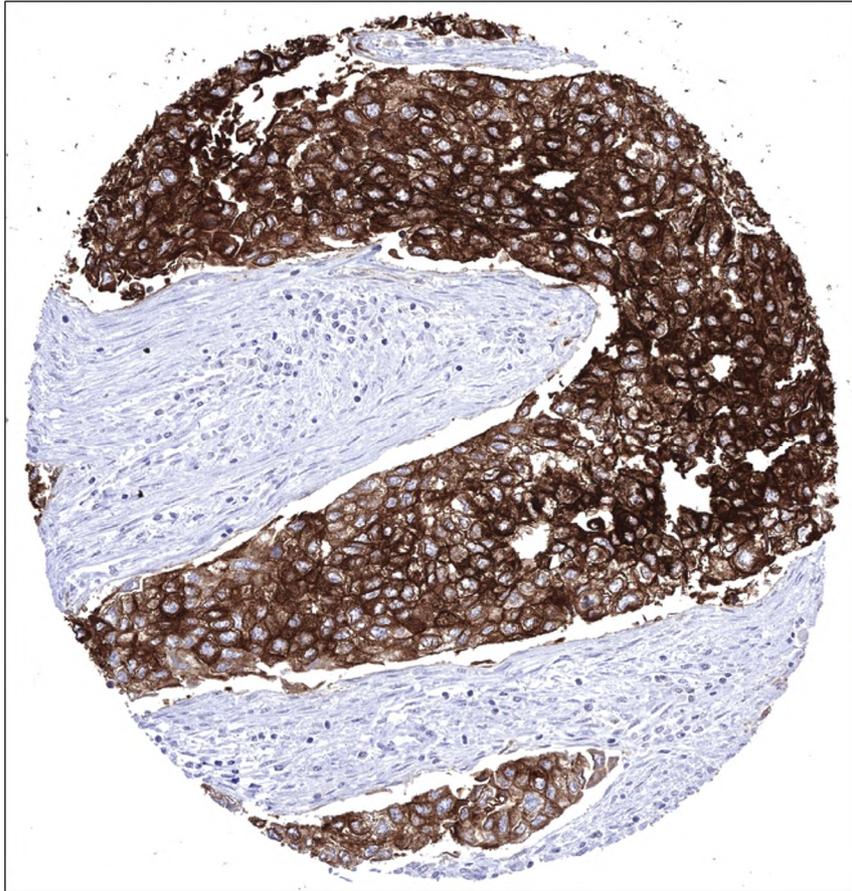


Abbildung 29: Muskelinvasives Urothelkarzinom mit starker UPK1A Positivität in 100% der Tumorzellen.

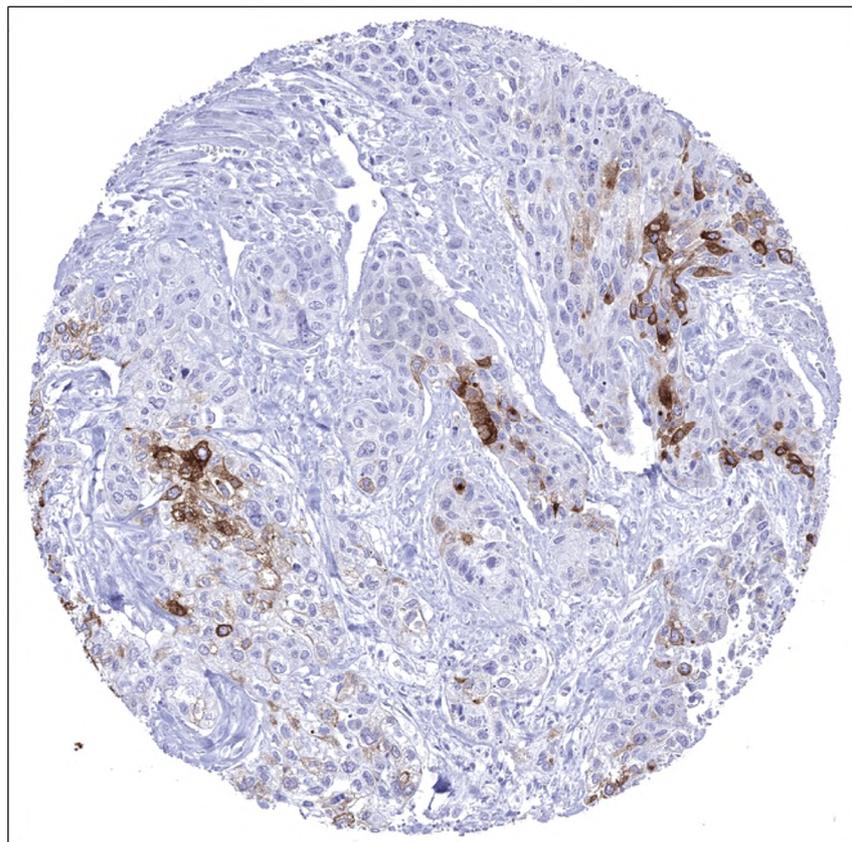


Abbildung 30: Muskelinvasives Urothelkarzinom mit mäßiger UPK1A Positivität in 20% der Tumorzellen.

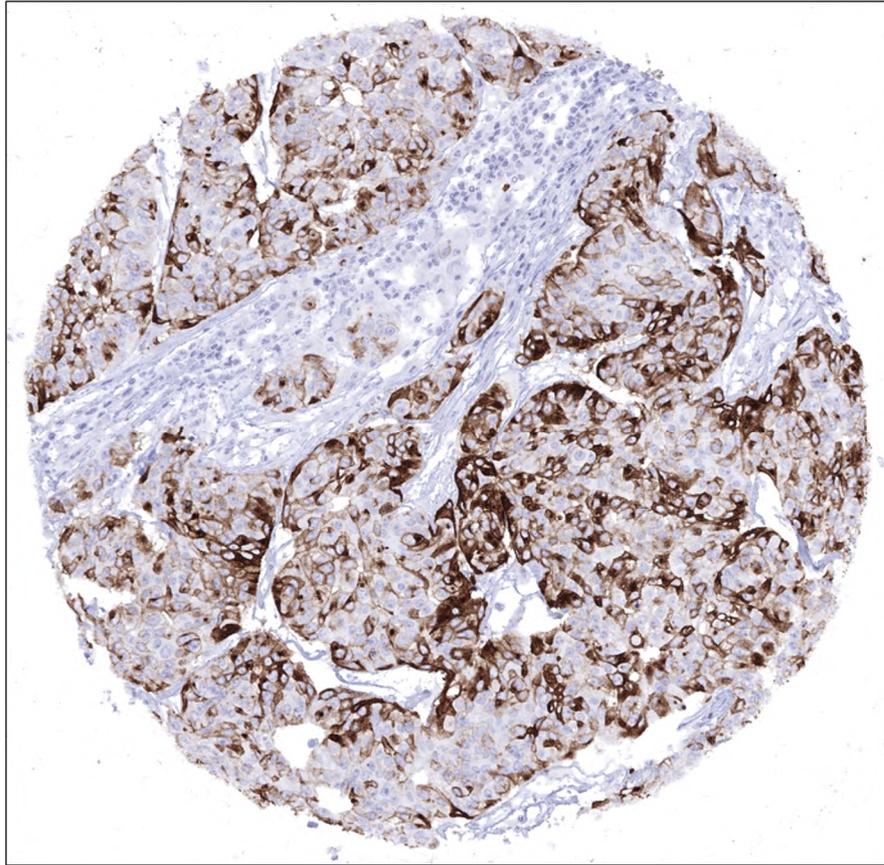


Abbildung 31: Urothelkarzinom des Nierenbeckens mit starker UPK1A Positivität in 60% der Tumorzellen.

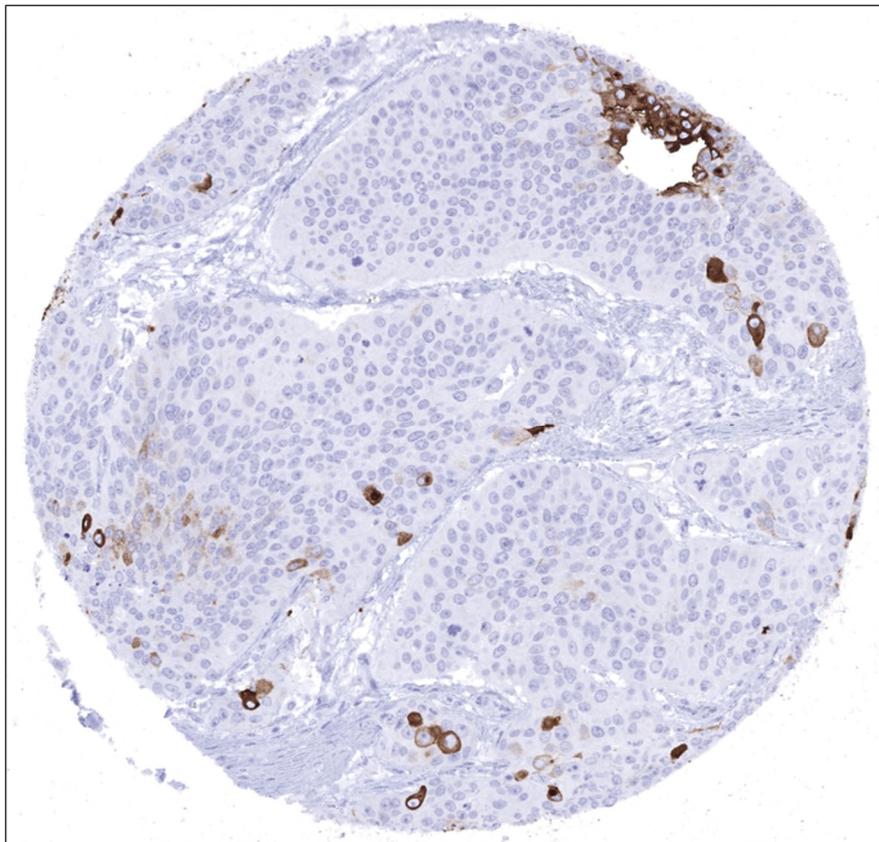


Abbildung 32: Urothelkarzinom des Nierenbeckens mit starker UPK1A Positivität in 5% der Tumorzellen.

Verschiedene Typen von Neoplasien der Schilddrüse machten die nächsthäufige Gruppe Uroplakin 1A positiver Tumoren aus. Dazu gehörten insbesondere folliculäre (33,3% positiv), papilläre (31,8% positiv) Karzinome und Adenome der Schilddrüse (10,4% positiv). Im Gegensatz zu den Urothel-Neoplasien war die Färbung in Schilddrüsentumoren meistens rein oder überwiegend zytoplasmatisch, wobei gelegentlich eine leichte Tendenz zur Anreicherung in apikalen Abschnitten erkennbar war. Repräsentative Beispiele von UPK1A positiven Schilddrüsentumoren sind in Abbildungen 33-35 dargestellt.

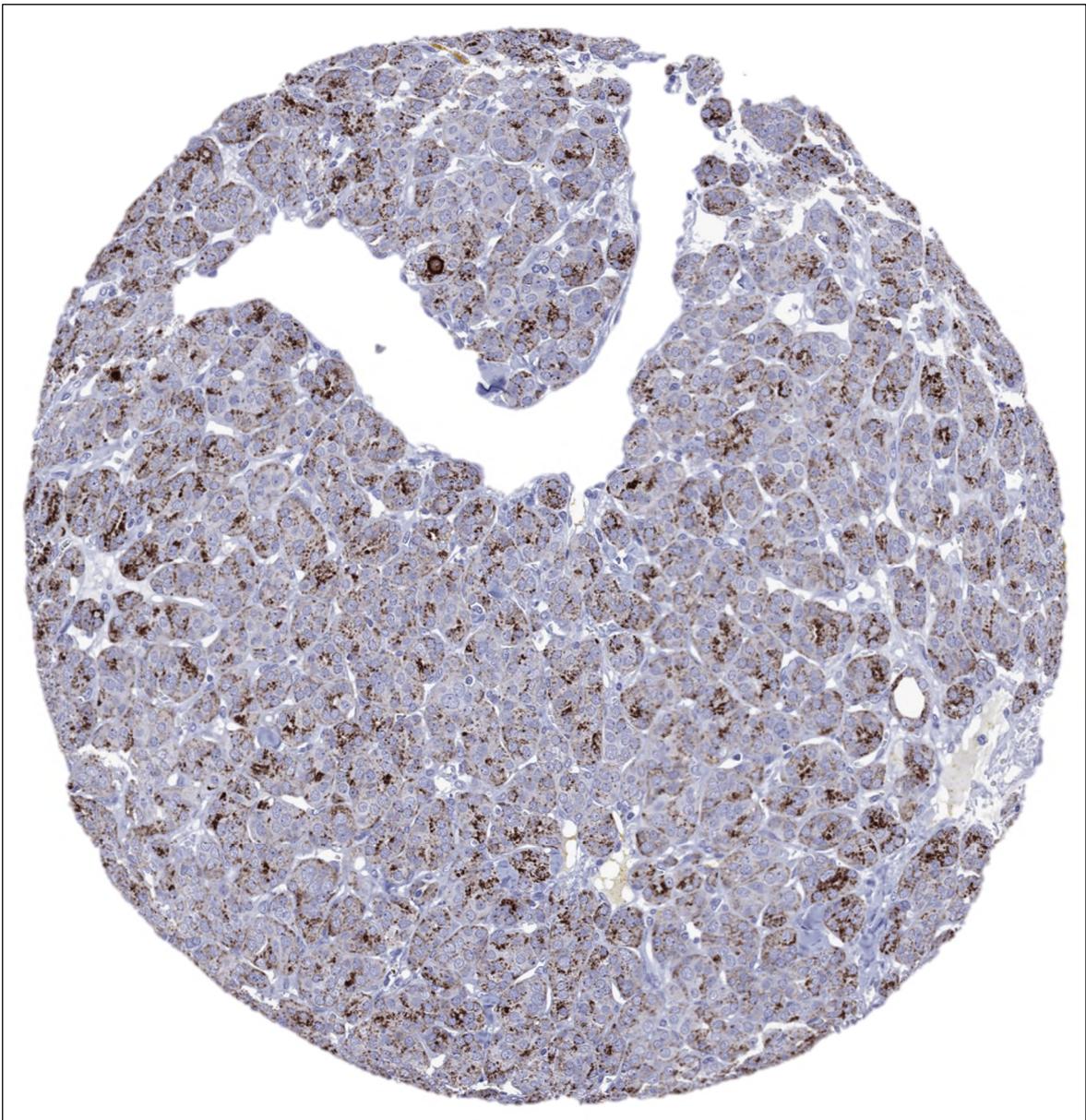


Abbildung 33: **Follikuläres Schilddrüsenkarzinom mit starker zytoplasmatischer UPK1A Positivität in 100% der Tumorzellen.**

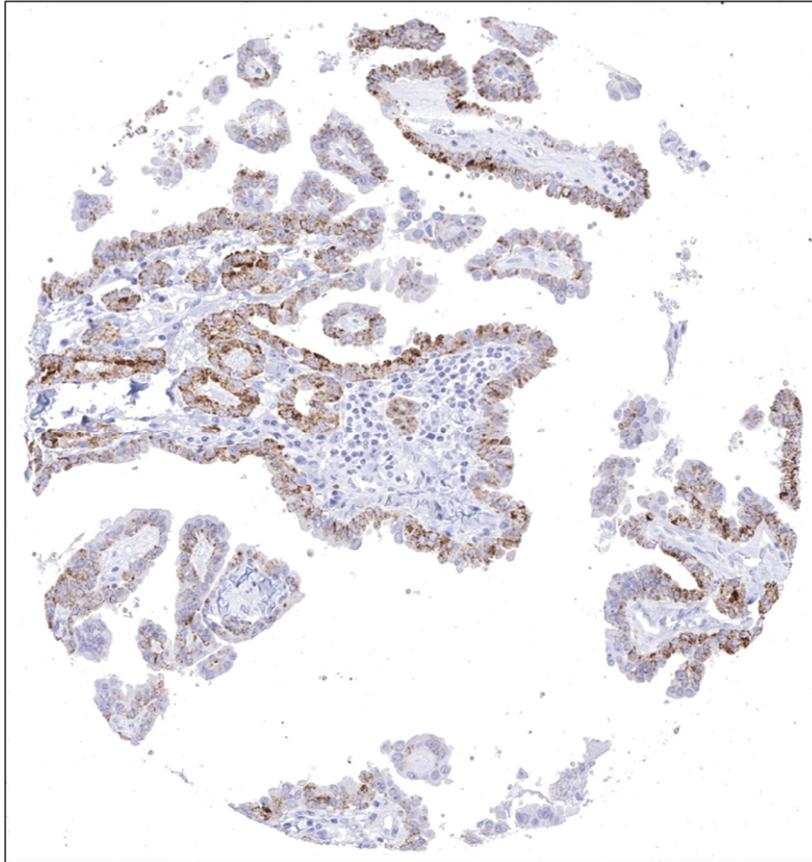


Abbildung 34: **Papilläres Schilddrüsenkarzinom mit mäßiger zytoplasmatischer UPK1A Positivität in 70% der Tumorzellen.**

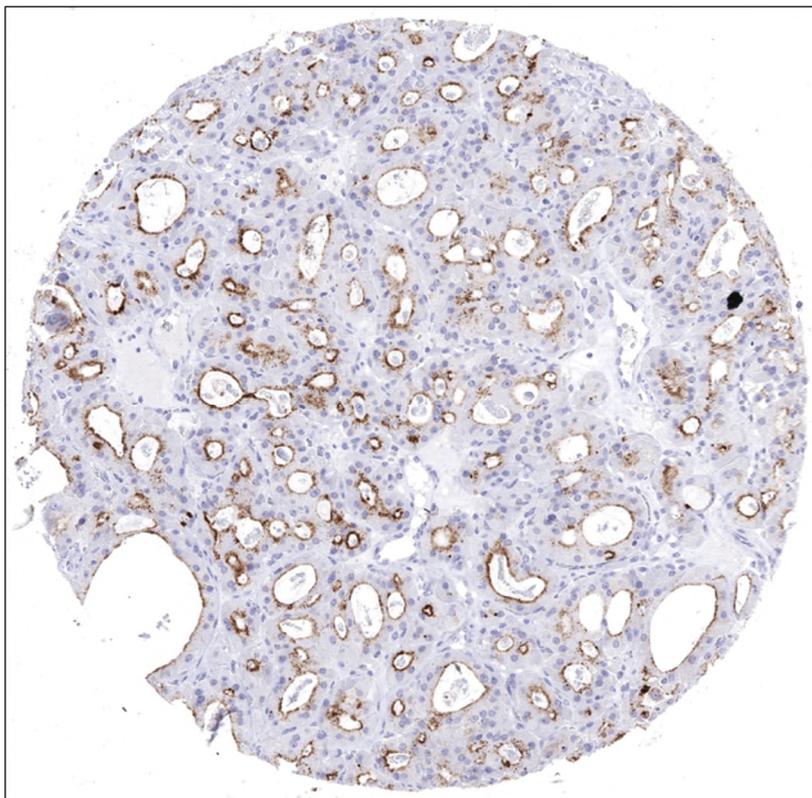


Abbildung 35: **Follikuläres Schilddrüsenkarzinom mit starker, überwiegend membranöser UPK1A Positivität in 90% der Tumorzellen.**

Alle anderen untersuchten Tumorkategorien zeigten deutlich seltener und in geringerem Ausmaß eine immunhistochemische Uroplakin 1A Anfärbung. Nur 3 dieser Entitäten erreichten eine Häufigkeit von  $\geq 10\%$ . Darunter waren das Karzinosarkom des Uterus (15%) und das Basalzelladenom von Speicheldrüsen (10%), wobei alle positiven Tumoren aus diesen Kategorien lediglich eine geringgradige Positivität aufwiesen. Eine Positivitätsrate zwischen 5 und 10% fand sich ebenfalls nur bei 3 Tumorentitäten, wozu das Adenokarzinom der Prostata (Gleason 4+4=8) und Plattenepithelkarzinome des Larynx und Penis gehörten. Auch bei diesen Tumorentitäten lagen überwiegend geringgradige Anfärbungen vor und nur in Einzelfällen eine mäßiggradige Färbung. Eine starke Färbung fand sich in diesen Kategorien nicht. Lediglich in einem von 76 auswertbaren Fällen eines Adenokarzinoms des Magens vom diffusen Typ konnte außerhalb der Kategorien Urothel- und Schilddrüsenkarzinome eine starke Uroplakin 1A Positivität diagnostiziert werden. Repräsentative Beispiele von nicht Schilddrüsen- und nicht Urothelkarzinomen mit und ohne UPK1A Anfärbung sind in den Abbildungen 36-44 dargestellt. Die Bilder machen deutlich, dass in vielen Fällen eine Uroplakin 1A Positivität bei diesen Neoplasien aufgrund einer nur sehr dezenten Anfärbung einer geringen Zahl von Tumorzellen diagnostiziert worden war.

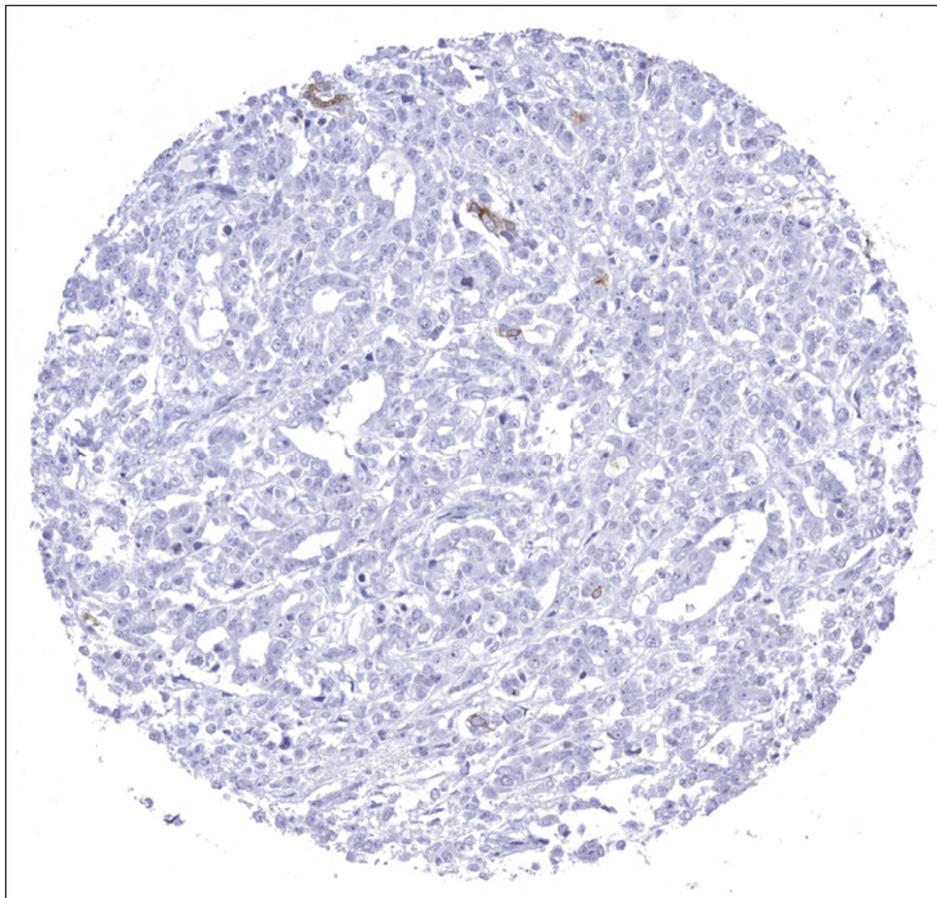


Abbildung 36: Karzinosarkom der Uterus mit mäßiger UPK1A Positivität in 5% der Tumorzellen.

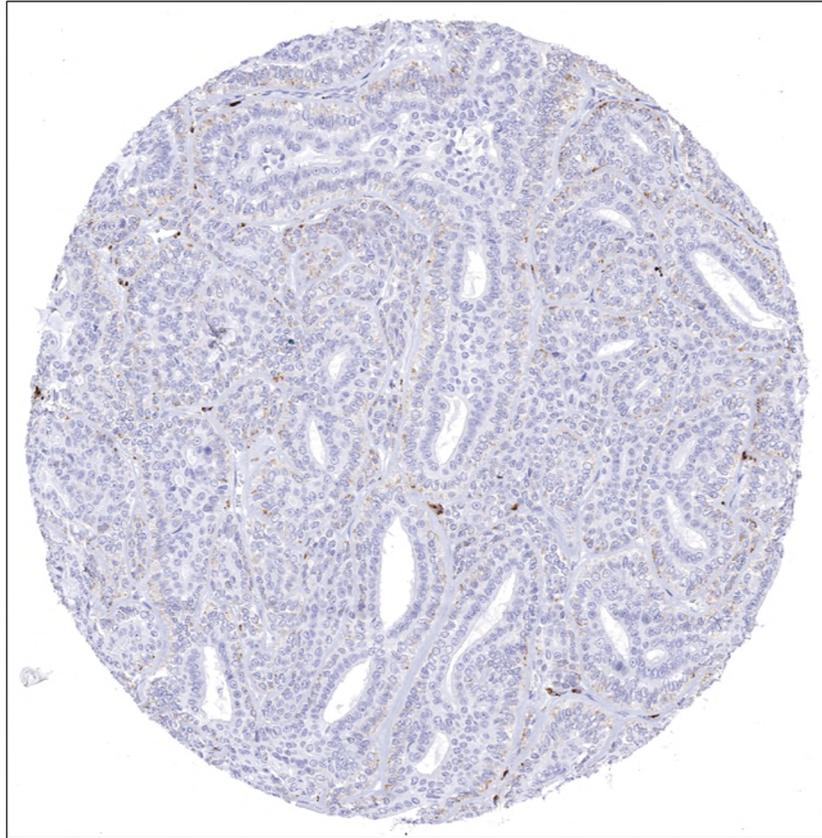


Abbildung 37: Basalzelladenom der Speicheldrüse mit schwacher UPK1A Positivität in 40% der Tumorzellen.

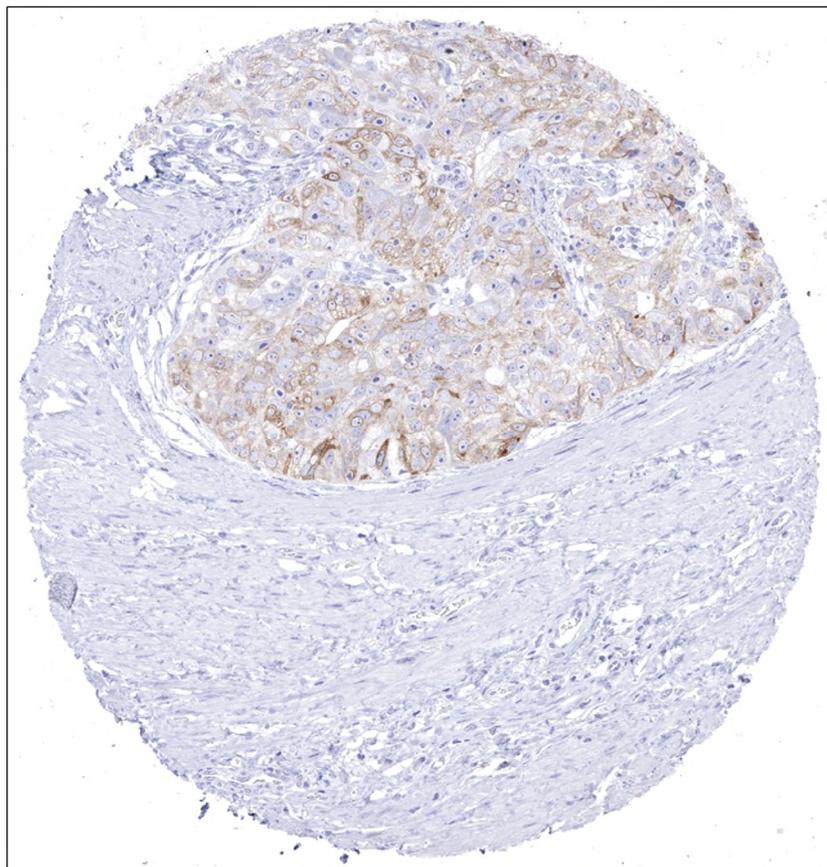


Abbildung 38: Adenokarzinom der Prostata (Gleason 4+4=8) mit mäßiger UPK1A Positivität in 90% der Tumorzellen.

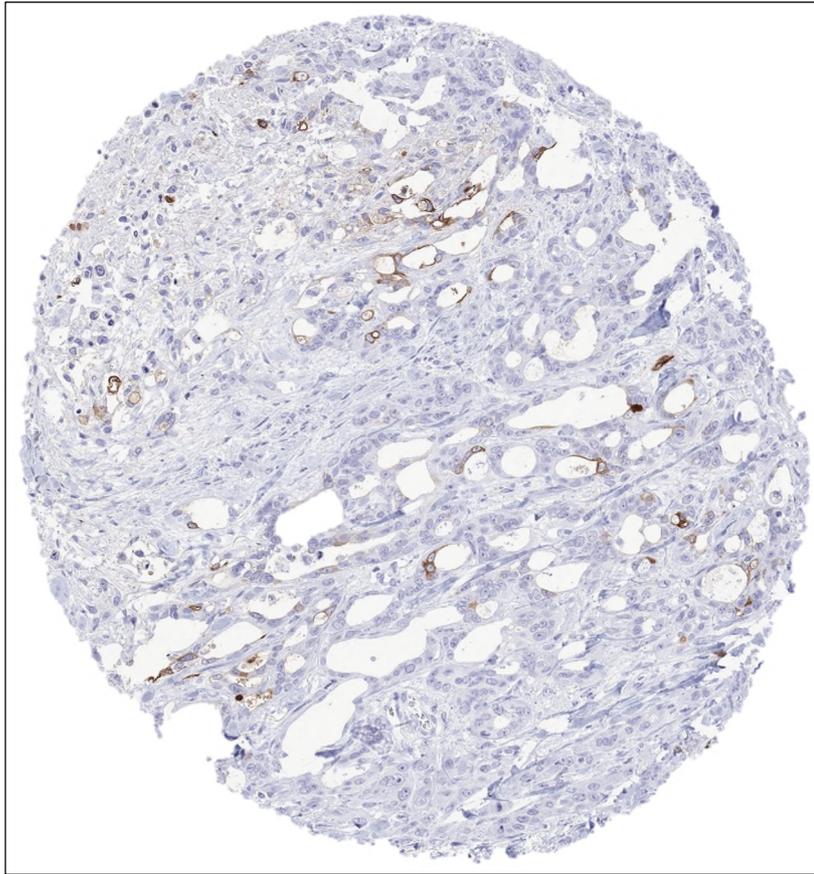


Abbildung 39: Plattenepithelkarzinom des Larynx mit mäßiger UPK1A Positivität in 40% der Tumorzellen.

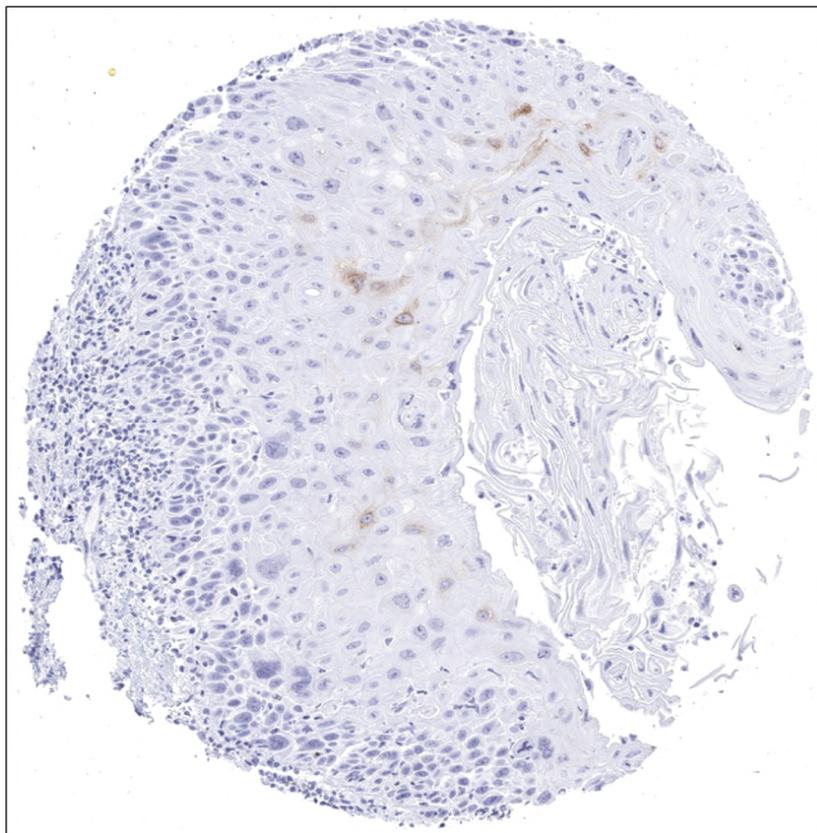


Abbildung 40: Plattenepithelkarzinom des Penis mit schwacher UPK1A Positivität in 5% der Tumorzellen.

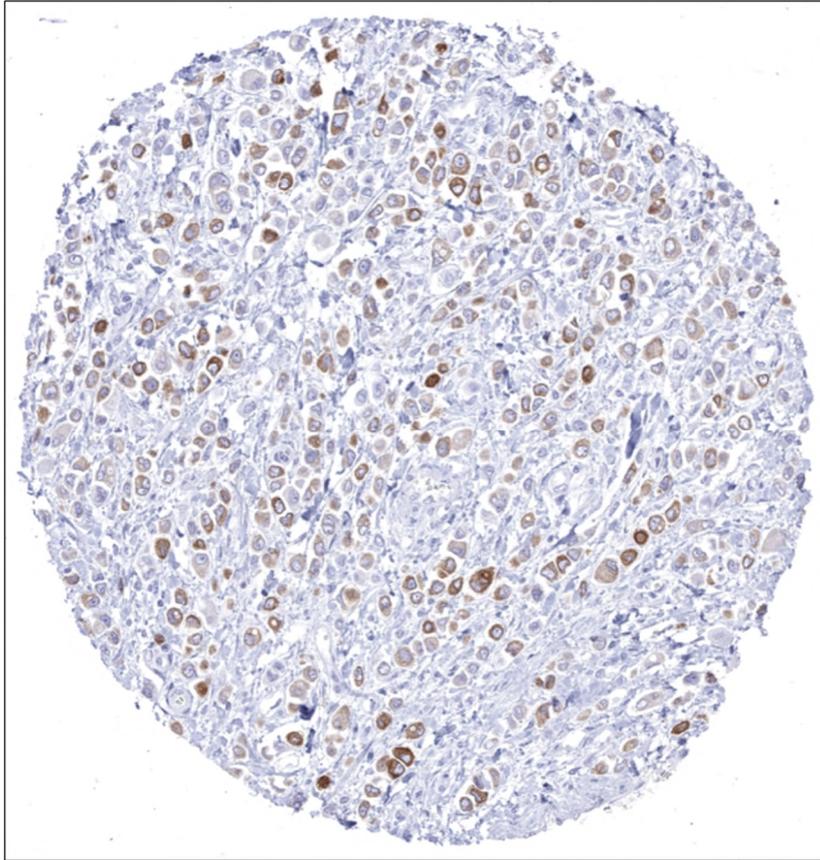


Abbildung 41: **Adenokarzinom des Magens vom diffusen Typ mit starker UPK1A Positivität in 90% der Tumorzellen.**

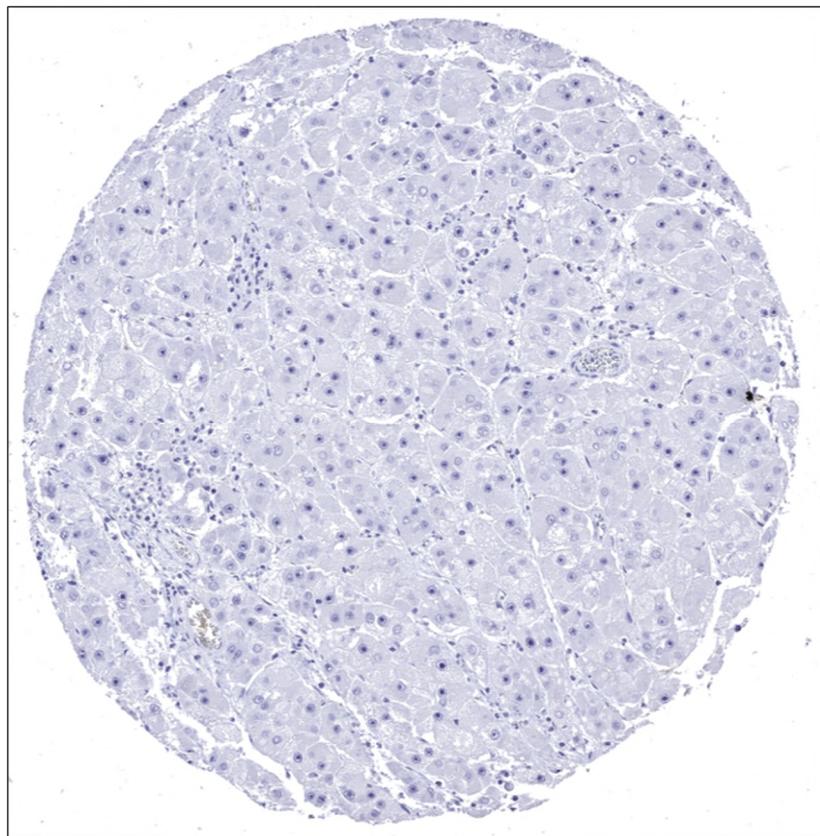


Abbildung 42: **Hepatozelluläres Karzinom. Keine UPK1A Färbung.**

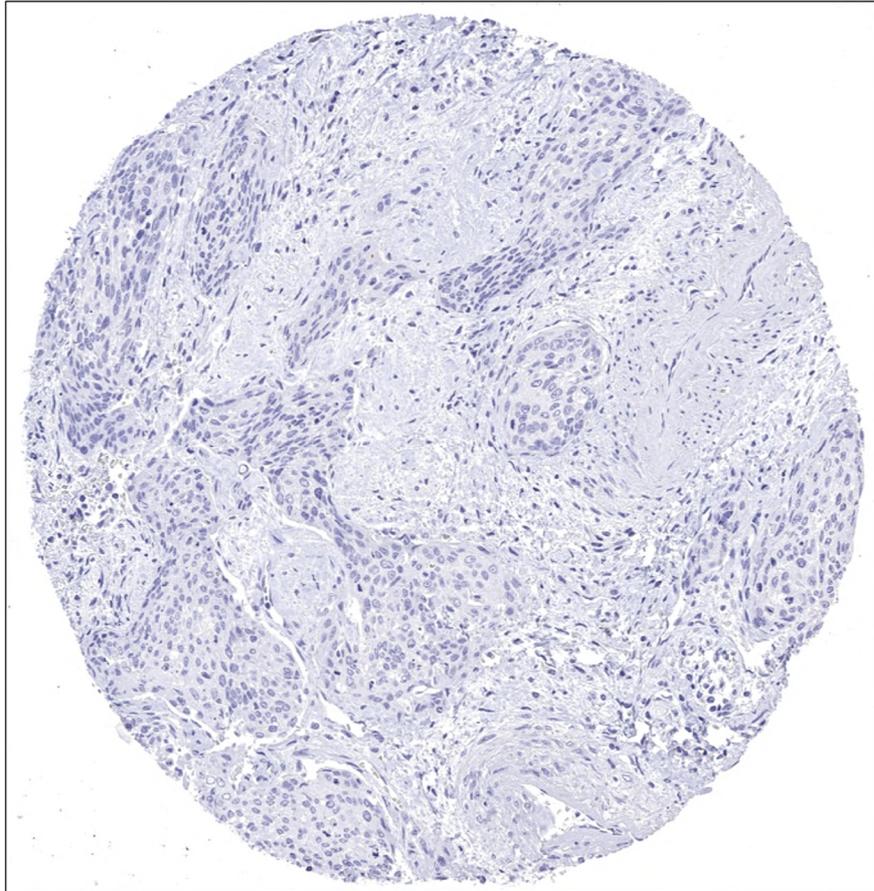


Abbildung 43: **Plattenepithelkarzinom der Vagina.** Keine UPK1A Färbung.

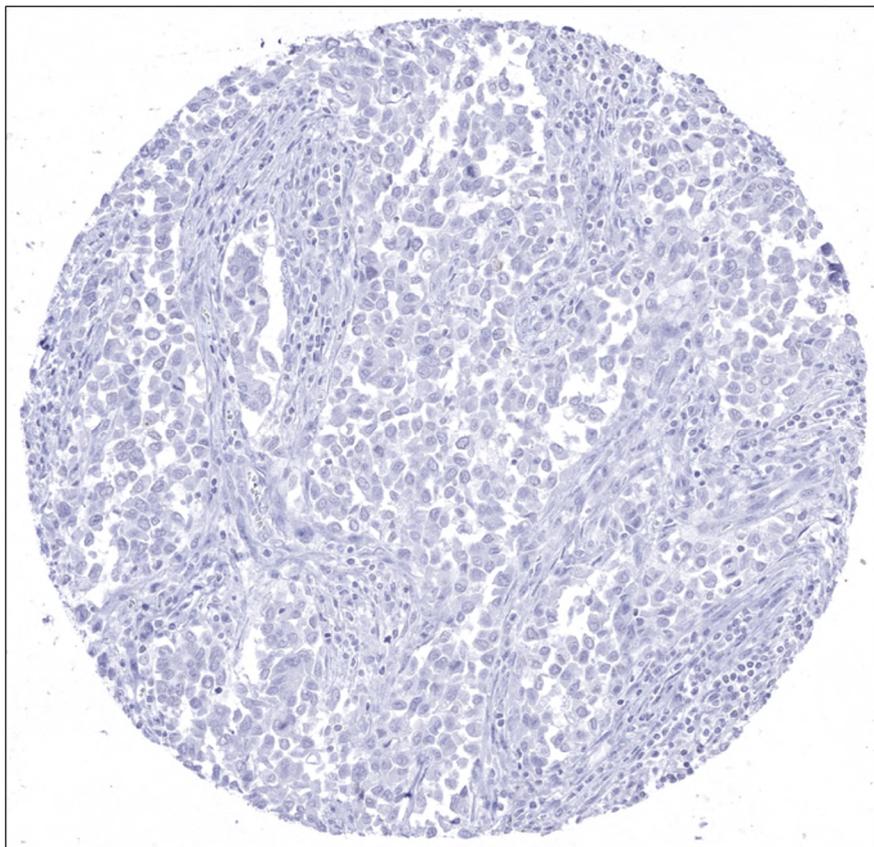


Abbildung 44: **Mammakarzinom.** Keine UPK1A Färbung.

### 3.4 Uroplakin 1A und Tumorphänotyp beim Harnblasenkarzinom

Die Beziehung der Uroplakin 1A Expression zu dem Grad, pT-Stadium und Nodalstatus beim Urothelkarzinom ist in Tabelle 9 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass die meisten pTa-Tumoren (>90%) Uroplakin 1A positiv sind, wobei von pTa G2 low zu pTa G3 eine graduelle Reduktion der Expressionsstärke zu beobachten ist ( $p = 0,012$ ). Eine deutliche Verminderung der Uroplakin 1A Expression fand sich hingegen bei muskelinvasiven Karzinomen, wo fast 60% der Tumoren immunhistochemisch Uroplakin 1A negativ waren und eine starke Positivität nur in 17-30% auftrat. Innerhalb der Gruppe der muskelinvasiven Tumoren war die UPK1A Expression weder mit dem Nodalstatus ( $p = 0,1954$ ) noch mit der Patientenprognose ( $p = 0,2866$ ) assoziiert.

Tabelle 9: Ergebnisse der Uroplakin 1A Immunhistochemie für Urothelkarzinome verschiedener Phänotypen.

	UPK1A/MSVA-735M					p	
	auswertbar	negativ	schwach	moderat	stark		
alle Tumoren	565	25.0	14.7	14.3	46.0		
pTa, G2 low	117	6.0	11.1	23.1	59.8	<0.0001	
pTa, G2 high	98	2.0	19.4	12.2	66.3		
pTa, G3	111	9.9	22.5	16.2	51.4		
pT2-4	205	58.5	9.8	8.8	22.9		
pTa, G2 low	117	6.0	11.1	23.1	59.8	0.012	
pTa, G2 high	98	2.0	19.4	12.2	66.3		
pTa, G3	111	9.9	22.5	16.2	51.4		
pT2	47	51.1	10.6	8.5	29.8	0.4720	
pT3	111	64.9	9.9	8.1	17.1		
pT4	47	51.1	8.5	10.6	29.8		
G2	13	38.5	7.7	23.1	30.8	0.2866	nur pT≥2
G3	192	59.9	9.9	7.8	22.4		
pN0	122	61.5	10.7	9.8	18.0	0.1954	
pN+	170	52.5	8.8	7.5	31.3		

## 4. Diskussion

In dieser Studie wurden insgesamt 6.929 Tumoren von 115 verschiedenen Tumorentitäten immunhistochemisch untersucht. Angesichts der großen Zahl der zu untersuchenden Tumoren, wurde zunächst ein besonderes Augenmerk auf die Validierung des gewählten experimentellen Ansatzes gelegt. Die internationale Arbeitsgruppe für Antikörpervalidierung (International Working Group for Antibody Validation, IWGAV) hat gezeigt, dass bei der Validierung von Antikörpern eine methodenspezifische Validierung erfolgen muss. Es genügt nicht mittels ELISA, Western-Blot oder Protein-Microarrays zu zeigen, dass der Antikörper an unfixiertem Gewebe ausschließlich das erwartete Zielprotein bindet (Edfors et al. 2018). Aufgrund der ausgedehnten, durch die Formalinfixierung ausgelösten Modifikationen der Proteine in histologischen Präparaten, muss die Validierung von Antikörpern für die Immunhistochemie aufzeigen, dass an in Formalin fixierten Geweben die erwarteten Strukturen gebunden werden. Gemäß IWGAV gibt es hierfür nur zwei prinzipielle Mechanismen. Entweder müssen die mit einem Antikörper erzielten Ergebnisse mit den Ergebnissen einer anderen unabhängigen Methode für die Expressionsanalyse übereinstimmen oder es muss gezeigt werden, dass ein anderer, unabhängiger Antikörper für das gleiche Protein zu identischen Ergebnissen führt (Uhlen et al. 2016). Beide von der IWGAV vorgeschlagenen Validierungsmethoden wurden in dieser Studie zur Anwendung gebracht. Darüber hinaus wurde durch die Analyse einer sehr umfassenden Palette von 76 verschiedenen Normalgewebe-Kategorien sichergestellt, dass die meisten bei adulten Menschen in irgendeinem Gewebe exprimierten Proteine, dem Antikörper für eine mögliche Bindung auch „angeboten“ werden konnten. Zum Zweck einer vergleichenden Untersuchung der Expression mit einer unabhängigen zweiten Methode wurden Datenbanken zur RNA-Expression von UPK1A in verschiedenen Normalgeweben herangezogen. Drei verschiedene, öffentlich zugängliche RNA-Screening-Datenbanken wurden hierfür genutzt, einschließlich des Human Protein Atlas, RNAseq-Tissue-Datensatzes (Fagerberg et al. 2014), des FANTOM5 Projektes (Noguchi et al. 2017; Lizio et al. 2015) und des Genotype Tissue Expression Projektes (GTEx) (The Genotype-Tissue Expression project 2013), welche alle im Human Protein Atlas zusammengefasst dargestellt sind (UPK1A protein expression summary - The Human Protein Atlas 2021). Der Vergleich mit diesen RNA Daten zeigte, dass eine UPK1A RNA-Expression fast ausschließlich in Organen gefunden wurde, welche entweder Urothel enthalten (Harnblase, Prostata) oder aber von Plattenepithel bedeckt werden (Ösophagus, Vagina, Zervix, Haut). Zusätzlich war eine UPK1A RNA-Expression in glatter Muskulatur beschrieben worden, welche sich durch den verwendeten Antikörper nicht immunhistochemisch bestätigen ließ. Da mehrere glattemuskuläre Organe entweder von Urothel oder von Plattenepithel bedeckt sind, könnte dieser Befund durch eine Verunreinigung einzelner Proben bedingt sein. Die vergleichende

Untersuchung mit einem zweiten unabhängigen Antikörper für Uroplakin 1A (UPK1A/2923, NeoBiotechnologies) bestätigte alle mit MSVA-735M identifizierten Färbungen von Urothel, Plattenepithel beziehungsweise einzelnen Proben von Samenblase und Prostata. Die Unabhängigkeit des zweiten evaluierten Antikörpers wird durch eine fibrilläre Färbung in Hirnproben bestätigt, welche nur mit dem Klon UPK1A/2923, aber nicht mit MSVA-735M nachgewiesen wurden. Aufgrund dieses Befundes ist davon auszugehen, dass diese fibrilläre Hirnfärbung eine antikörperspezifische Kreuzreaktion darstellt und nicht einer echten Uroplakin 1A Expression entspricht. Der Einsatz der TMA-Technik und insbesondere das Vorhandensein einer sehr großen Sammlung von TMA-Blöcken mit Tumoren aller Art, erlaubte die Durchführung einer Studie an 6.929 Tumoren in weniger als einer Woche. Das starke Überwiegen einer Uroplakin 1A Positivität in Urotheltumoren identifiziert unseren Antikörper als eine nützliche Ergänzung zu bisher für die Abgrenzung eines Urothelkarzinoms von anderen Tumorentitäten verwendeten Antikörpern. Im Gegensatz zu anderen histologischen Tumortypen ist das Urothelkarzinom durch ein völliges Fehlen von charakteristischen morphologischen Merkmalen charakterisiert. Im Vergleich mit Adenokarzinomen fehlt eine Drüsenbildung und anders als bei Plattenepithelkarzinomen kommt es weder zu einer Verhornung noch zu einer Ausbildung von Interzellularbrücken (Fulker et al. 1971; Koss 1977). Das Urothelkarzinom stellt sich als uncharakteristische solide Neoplasie dar, welche in Abwesenheit von charakteristischen präkanzerösen Urothelveränderungen in der Tumorumgebung nie eindeutig einem urothelialen Ursprung zugeordnet werden kann (Samaratunga und Delahunt 2012). Die typischen, bisher normalerweise verwendeten Urothelmarker beinhalten GATA3, p63, S100P und Thrombomodulin (Chuang et al. 2007). Zumindest GATA3 und p63 sind beim, diagnostisch am häufigsten Probleme bereitenden, muskelinvasiven Urothelkarzinomen häufiger positiv als Uroplakin 1A, aber auch bedeutend weniger spezifisch. P63 ist bei der überwiegenden Mehrzahl aller Plattenepithelkarzinome kräftig positiv und GATA3 wird auch bei der Mehrzahl der Mammakarzinome, eines anderen häufig uncharakteristischen soliden Tumortyps, welcher auch in die Harnblase metastasieren kann und auch bei Nierenzellkarzinomen häufig exprimiert (Steurer et al. 2021; Miettinen et al. 2014). S100P ist ebenfalls bei vielen Urothelkarzinomen exprimiert, doch auch bei zahlreichen anderen Tumoren wie bei Adenokarzinomen des Kolons, anderen Adenokarzinomen und bei vielen Plattenepithelkarzinomen (Suryavanshi et al. 2017). Thrombomodulin wird in circa 61% der muskelinvasiven Urothelkarzinome exprimiert, aber beispielweise auch in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, Mammakarzinomen und Lymphomen (Parker et al. 2003; Kim et al. 1997). Das weitgehende Fehlen einer insbesondere kräftigen Uroplakin 1A Expression in vielen Tumortypen, welche differentialdiagnostisch häufig von Urothelkarzinomen abgegrenzt werden müssen wie Prostatakarzinome,

Nierenzellkarzinome oder Mammakarzinome spricht dafür, dass Uroplakin 1A ein wichtiger weiterer Bestandteil bei der Evaluation von Tumoren sein dürfte, bei denen ein Urothelkarzinom eine diagnostische Option darstellt. Das Ergebnis, dass Schilddrüsentumoren nach Urothel-Neoplasien die zweithäufigste Ursache für eine UPK1A Expression darstellen war unerwartet, hatte sich doch in normalen Schilddrüsen keine Uroplakin 1A Immunfärbung dargestellt. Auch die Durchsicht der ICGC/TCGA-Datenbank zur RNA Expression in Tumoren, hatte für Uroplakin 1A keine Expression in Schilddrüsentumoren erwarten lassen. Insbesondere angesichts des kompletten Fehlens einer Uroplakin 1A RNA-Expression in Schilddrüsenkarzinomen, muss in dieser Situation trotz erfolgreich durchgeführter Spezifitätstestung unseres Antikörpers an Normalgewebe, die Möglichkeit einer Antikörper Kreuzreaktivität erwogen werden. Das überwiegend zytoplasmatische Auftreten der Uroplakin 1A Immunfärbung in Schilddrüsenkarzinomen ist ein weiteres Argument für eine unspezifische Färbung, da die normale Uroplakin-Lokalisation an der Zellmembran liegt und sowohl in normalem Urothel als auch in Urothelkarzinomen meistens eine membranöse Akzentuierung der Uroplakin 1A Färbung zu beobachten war. Anzumerken ist, dass auch der Einsatz des unabhängigen Validierungsantikörpers (UPK1A/2923) in Schilddrüsentumoren zu einer ähnlichen Färbung geführt hatte (Daten nicht gezeigt), was auch die Möglichkeit einer echten Färbung möglich erscheinen lässt. Der Vorteil der Antikörperevaluation an einer umfassenden Kollektion von Tumoren aller Art liegt darin, dass der diagnostische Nutzen eines Antikörpers zuverlässig evaluiert wird, wobei diese unabhängig davon ist, ob Färbeergebnisse spezifisch oder unspezifisch sind. Mehrere diagnostische Antikörper welche IVD (in-vitro diagnostic devices) zertifiziert sind und weltweit diagnostisch genutzt werden, färben unspezifische oder unbekannte Antigene. Beispielsweise gilt eine Melan-A Positivität als charakteristisches Merkmal für Tumoren der Nebennierenrinde (Loy et al. 2002). Allerdings wird in der Nebennierenrinde kein Melan-A exprimiert und die wahrgenommene „Expression“ stellt eine Kreuzreaktivität von mindestens einem Melan-A Klon (Klon A103) dar, während andere Melan-A Klone (z. B. M2-7C10) tatsächlich Melan-A spezifisch sind und nur Melanozyten aber keine Nebennierenrindengewebe darstellen (Busam et al. 1998; Fetsch et al. 1999). Der DOG1 Antikörper-Klon SP31 färbt nicht nur DOG1 exprimierende Cajal- und andere Zellen, sondern auch Spermatozyten, welche von anderen DOG1 Antikörpern aber nicht dargestellt werden (Osman et al. 2016). Obwohl die Spermatozytenfärbung von DOG1 Klon SP31 eine Kreuzreaktivität darstellt, wurde empfohlen, dass diese zur Beurteilung von Hodenbiopsien diagnostisch genutzt werden könnte (Salama et al. 2019; Dhakal et al. 2019). Der Antikörper Hepatocyte (Hep Par1) wird weltweit zur Unterscheidung von Lebertumoren (oder normalen Lebergeweben) von anderen Tumorarten beziehungsweise in die Leber metastasierten Tumoren verwendet.

Dieser Antikörper wurde durch die Beimpfung eines Labortiers mit einem Extrakt aus in Paraffin eingebettetem, zuvor abgestoßenem humanem Lebertransplantat gewonnen und obwohl sein eigentliches Zielprotein nicht bekannt ist, wird der Antikörper erfolgreich seit vielen Jahren diagnostisch angewendet (Wennerberg et al. 1993). Für Uroplakin 1A ist es gesichert, dass der Antikörper offensichtlich bei einem Teil der Schilddrüsentumoren zu einer zytoplasmatischen Anfärbung führt, was der diagnostischen Bedeutung des Antikörpers aber nicht schadet, da Schilddrüsentumoren keine übliche Differentialdiagnose in der Abgrenzung von Urothelkarzinomen darstellen und es zudem einige gute Antikörper gibt, wie beispielsweise Thyreoglobulin, um einen thyroidalen Ursprung eines Uroplakin 1A positiven Tumors gegebenenfalls auszuschließen (Gremel et al. 2014). Allerdings kann es letztlich aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass einige andere in unserem Kollektiv positive Tumoren mit einer überwiegenden zytoplasmatischen Uroplakin 1A Positivität durch eine ähnliche Kreuzreaktivität bedingt sein könnten. Da unsere Studienpopulation insgesamt 565 Urothelkarzinome beinhaltete, war es möglich, auch die potentielle klinisch/prognostische Bedeutung der Uroplakin 1A Expression bei Urothelkarzinomen weiter zu untersuchen. Die deutliche Zunahme der UPK1A negativen oder nur schwach positiven Tumoren vom Stadium pTa zum Stadium des muskelinvasiven Tumors zeigt, dass Uroplakin 1A im Rahmen der Tumorprogression beim Urothelkarzinom häufig verloren geht. Das Fehlen einer prognostischen Bedeutung innerhalb der Untergruppe der 205 zystektomierten Patient:innen mit einem muskelinvasiven Urothelkarzinom zeigt aber, dass innerhalb der muskelinvasiven Tumoren dem Uroplakin 1A Verlust keine gesonderte klinische Bedeutung zukommt. Diese Beobachtung passt ebenfalls gut zur postulierten Funktion von Uroplakin 1A (Wu et al. 2009; Zhu et al. 2015). Unter Annahme einer primären Funktion als Stabilisator des Urothels, welche insbesondere bei stark ausgedehnter, gefüllter Blase zum Tragen kommt, ist eine Steigerung der Aggressivität von Tumoren durch den Verlust ihrer mechanischen Resistenz nicht zu erwarten. Vielmehr ist davon auszugehen, dass diese mechanische Resistenz bei invasiv wachsenden Urothelkarzinomzellen nicht mehr benötigt wird, sodass der Verlust dieser Zellfunktion ein Dedifferenzierungsmerkmal ist, welches offensichtlich die Vitalität und Funktionalität einer Tumorzelle nicht negativ beeinflussen sollte. Die Evaluation der diagnostischen Relevanz von Uroplakin 1A in dieser Studie ist aus unserer Sicht ein Paradebeispiel wie diagnostische Marker evaluiert werden sollten. Bei vielen anderen immunhistochemischen Markern verlief die Evaluation ihrer diagnostischen Bedeutung historisch so, dass eine immer größere Zahl verschiedener Tumortypen zur Untersuchung gelangte, sodass immer wieder neue Erkenntnisse zu zusätzlichen gelegentlich oder häufig positiven Tumorarten hinzukamen. Ursprünglich als tumorspezifisch postulierte diagnostische Marker wurden im Verlauf der Jahre deswegen immer „unspezifischer“. Beispiele hierfür sind die neuronenspezifische

Enolase (NSE) oder Mesothelin. Die beiden Proteine wurden ursprünglich als spezifisch für neuraldifferenzierte Gewebe oder Mesothel beschrieben. Heute ist bekannt, dass beide Marker bei sehr vielen verschiedene Tumortypen exprimiert werden können (Mjønes et al. 2017; Weidemann et al. 2021). Lediglich 5 Studien hatten früher Uroplakin 1A an einer limitierten Zahl von 445, 22, 125, 186 und 17 Tumoren untersucht und dabei von einer UPK1A Expression in Urothelkarzinomen, in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus, in Adenokarzinomen des Magens, in kolorektalen Karzinomen und in hepatozellulären Karzinomen berichtet (Zheng et al. 2014; Kageyama et al. 2002; He et al. 2014; Kong et al. 2010; Song et al. 2020). Die ausführliche von uns vorgenommene Evaluation umfasste einen Großteil der vorkommenden malignen Neoplasien des Menschen, sodass nicht anzunehmen ist, dass die Zahl der in einem relevanten Anteil der Fälle Uroplakin 1A positiven Tumorentitäten weiter ansteigen wird. Vielmehr wäre es möglich, dass weitere Antikörper gegen Uroplakin 1A etabliert werden, welche die mögliche Kreuzreaktivität gegen Schilddrüsentumorgewebe nicht mehr aufweisen und somit noch spezifischer für Urotheltumoren sein könnten als MSVA-735M.

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Untersuchung, dass Uroplakin 1A ganz überwiegend in urothelialen Tumoren zur Expression gelangt und somit ein wichtiger diagnostischer Marker ist, der die existierenden Panels zur Diagnose eines Urotheltumors ergänzen kann. Das Vorliegen eines sehr großen Archivs von Tissue-Microarrays ist optimal dafür geeignet, die diagnostische Bedeutung immunhistochemischer Marker schnell und zuverlässig zu klären.

## 5. Zusammenfassung

Uroplakin 1A (UPK1A) ist ein zur Stabilisierung der Epithelzellen der Harnblase essentielles Protein. Es verhindert ein Rupturieren der Urothelzellen während der Distension. In Studien, die die RNA Expression von UPK1A untersuchten, fand man heraus, dass Uroplakin 1A nur in einer limitierten Anzahl von Normal- und Tumorgeweben exprimiert wird. Um den potentiellen diagnostischen und prognostischen Nutzen der UPK1A Immunhistochemie umfassend zu evaluieren, wurde eine Tissue-Microarray-Studie mit 6.929 Gewebeproben von 115 unterschiedlichen Tumortypen und Subtypen, sowie 608 Proben von 76 verschiedenen Normalgeweben analysiert.

Eine Uroplakin 1A Positivität fand sich in 34 (29,6%) verschiedenen Tumortypen inklusive 9 (7,8%) Tumortypen mit mindestens einem stark positiven Fall. Die höchsten Raten an UPK1A Positivität fanden sich in verschiedenen Kategorien der Neoplasien urothelialen Ursprungs (42,6-98%) inklusive Brenner Tumoren des Ovars (64,9%) gefolgt von Schilddrüsentumoren (10,4-33,3%). In Tumoren des Urothels dominierte die Uroplakin 1A Färbung in den Zellmembranen mit einer moderat bis starken Intensität. Die Färbung in Neoplasien der Schilddrüse war häufig rein zytoplasmatisch mit einer schwach bis moderaten Intensität. Eine UPK1A Positivität zeigte sich in bis zu 15% der Fälle in 25 zusätzlichen Tumorkategorien, die Färbeintensität wurde hier zumeist als schwach und selten als moderat eingestuft. Innerhalb der Gruppe der nicht-invasiven (pTa) Tumoren zeigte sich eine herabgesetzte UPK1A Positivität von 94% in pTa G2 (low grade) bis 90,1% in pTa G3 ( $p = 0,012$ ) und zeigte sich noch schwächer in muskelinvasiven Karzinomen (41,5%;  $p < 0,001$ ). Innerhalb der Gruppe der muskelinvasiven Karzinome fand sich kein Zusammenhang zwischen Lymphknotenmetastasen ( $p = 0,195$ ) und der Patientenprognose ( $p < 0,05$ ). Zusammenfassend lässt sich UPK1A als potenziell nützlicher diagnostischer Marker für die Unterscheidung von Urothelkarzinomen von anderen Neoplasien einsetzen. Seine Sensitivität hingegen liegt bei weniger als 50% in muskelinvasiven Karzinomen, da die Expression von UPK1A mit Progression des Urothelkarzinoms sinkt.

## 6. English Summary

Uroplakin 1A (UPK1A) protein is relevant for stabilizing and strengthening epithelial cells that line the bladder. It helps to prevent urothelial cells from rupturing during bladder distension. Based on RNA expression studies UPK1A is expressed in a limited number of normal tissues and tumors. To comprehensively evaluate the potential diagnostic and prognostic utility of UPK1A immunohistochemistry, a tissue microarray containing 6.929 samples from 115 different tumor types and subtypes and 608 samples of 76 different normal tissue types was analyzed.

UPK1A positivity was found in 34 (29,6%) different tumor types including 9 (7,8%) tumor types with at least one strongly positive case. The highest rates of UPK1A positivity were seen in various categories of urothelial neoplasms (42,6-98%) including Brenner tumors of the ovary (64,9%) followed by neoplasms of the thyroid (10,4-33,3%). In urothelial tumors, UPK1A staining predominated at the cell membranes and staining intensity was moderate to strong. In thyroidal neoplasms the staining was often purely cytoplasmic and of low to moderate intensity. UPK1A positivity was also seen in up to 15% of cases in 25 additional tumor categories but the staining intensity was usually judged as weak and only rarely as moderate. Within non-invasive (pTa) tumors, the UPK1A positivity rate decreased from 94% in pTa G2 (low grade) to 90,1% in pTa G3 ( $p=0,012$ ) and was even lower in muscle-invasive carcinomas (41,5%;  $p<0.0001$  vs pTa G3). Within muscle invasive carcinomas the UPK1A was unrelated to nodal metastasis ( $p=0.195$ ) and patient outcome ( $p<0,05$ ). In conclusion, our data identify UPK1A as a potentially useful diagnostic marker for the distinction of urothelial carcinomas from other neoplasms. However, its sensitivity is less than 50% in muscle-invasive cancers because UPK1A expression decreases during grade and stage progression.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
AUM	Asymmetric unit membrane
CCG	Cytosin-Cytosin-Guanin, Abfolge von Aminosäuren
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
DAB	3,3'Diaminobenzidin, Chromogen
DV	Diskoidale Vesikel
EC1/EC2	Extrazelluläre Schleife 1 / Extrazelluläre Schleife 2
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCC	Esophageal squamous cell carcinoma
FPKM	Fragments per kilobase of exon per million reads
GTE <sub>x</sub>	Genotype Tissueexpression Projekt
HCC	Hepatocellular carcinoma,
HE	Hämatoxylin – Eosin – Färbung
Hepa1	Hepatocyte, Antikörper
HGH	Human growth hormone
HIER	Heat induced-epitope-retrieval
HIF 1	Hypoxia inducible factor 1
HPA	The Human Protein Atlas
HRE	Hypoxie-responsives Element
IHC	Immunhistochemie
IVD	In-Vitro Diagnostikum, in-vitro diagnostic devices
IWGAV	International Working Group for Antibody Validation
kDa	Kilodalton
mm	Millimeter
MTA	Medizinischtechnische/r Assistent:in
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
NX	NX Consensus Normalized eXpression
pT	Ausdehnung und Verhalten des Tumors, TNM-Klassifikation
qRT-PCR	real time quantitative polymerase chain reaction
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20, Puffer
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TEM	tetraspanin enriched microdomains
TMA	Tissue – Microarray
TS	Tetraspanine
TSPAN21	Gen zur Expression von Uroplakin 1A
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
UPK	Uroplakin/e
UPK1A	Uroplakin 1A
UPK1B	Uroplakin 1B
UPK2	Uroplakin 2
UPK3A	Uroplakin 3A
UPK3B	Uroplakin 3B
VHL	Von – Hippel – Lindau Protein

## 8. Literaturverzeichnis

Aboushwareb, Tamer; Zhou, Ge; Deng, Fang-Ming; Turner, Chanda; Andersson, Karl-Erik; Tar, Moses et al. (2009): Alterations in bladder function associated with urothelial defects in uroplakin II and IIIa knockout mice. In: *Neurourology and urodynamics* 28 (8), S. 1028–1033. DOI: 10.1002/nau.20688.

Adachi, W.; Okubo, K.; Kinoshita, S. (2000): Human uroplakin Ib in ocular surface epithelium. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 41 (10), S. 2900–2905.

Al Kuraya, Khawla; Simon, Ronald; Sauter, Guido (2004): Tissue microarrays for high-throughput molecular pathology. In: *Annals of Saudi medicine* 24 (3), S. 169–174. DOI: 10.5144/0256-4947.2004.169.

Apodaca, G.; Balestreire, E.; Birder, L. A. (2007): The uroepithelial-associated sensory web. In: *Kidney international* 72 (9), S. 1057–1064. DOI: 10.1038/sj.ki.5002439.

Birder, Lori A.; Groat, William C. de (2007): Mechanisms of disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction. In: *Nature clinical practice. Urology* 4 (1), S. 46–54. DOI: 10.1038/ncpuro0672.

Bordeaux, Jennifer; Welsh, Allison; Agarwal, Seema; Killiam, Elizabeth; Baquero, Maria; Hanna, Jason et al. (2010): Antibody validation. In: *BioTechniques* 48 (3), S. 197–209. DOI: 10.2144/000113382.

Bostrom, Jenny; Lee, Chingwei V.; Haber, Lauric; Fuh, Germaine (2009): Improving antibody binding affinity and specificity for therapeutic development. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 525, 353-76, xiii. DOI: 10.1007/978-1-59745-554-1\_19.

Busam, K. J.; Iversen, K.; Coplan, K. A.; Old, L. J.; Stockert, E.; Chen, Y. T. et al. (1998): Immunoreactivity for A103, an antibody to melan-A (Mart-1), in adrenocortical and other steroid tumors. In: *The American journal of surgical pathology* 22 (1), S. 57–63. DOI: 10.1097/00000478-199801000-00007.

Camp, R. L.; Charette, L. A.; Rimm, D. L. (2000): Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 80 (12), S. 1943–1949. DOI: 10.1038/labinvest.3780204.

Carpenter, Ashley R.; Becknell, M. Brian; Ching, Christina B.; Cuaresma, Edward J.; Chen, Xi; Hains, David S.; McHugh, Kirk M. (2016): Uroplakin 1b is critical in urinary tract development and urothelial differentiation and homeostasis. In: *Kidney international* 89 (3), S. 612–624. DOI: 10.1016/j.kint.2015.11.017.

Chlapowski, F. J.; Bonneville, M. A.; Staehelin, L. A. (1972): Lumenal plasma membrane of the urinary bladder. II. Isolation and structure of membrane components. In: *The Journal of cell biology* 53 (1), S. 92–104. DOI: 10.1083/jcb.53.1.92.

Chuang, Ai-Ying; DeMarzo, Angelo M.; Veltri, Robert W.; Sharma, Rajni B.; Bieberich, Charles J.; Epstein, Jonathan I. (2007): Immunohistochemical differentiation of high-grade prostate carcinoma from urothelial carcinoma. In: *The American journal of surgical pathology* 31 (8), S. 1246–1255. DOI: 10.1097/PAS.0b013e31802f5d33.

Croxen, Matthew A.; Finlay, B. Brett (2010): Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. In: *Nature reviews. Microbiology* 8 (1), S. 26–38. DOI: 10.1038/nrmicro2265.

Dalghi, Marianela G.; Montalbetti, Nicolas; Carattino, Marcelo D.; Apodaca, Gerard (2020): The Urothelium: Life in a Liquid Environment. In: *Physiological reviews* 100 (4), S. 1621–1705. DOI: 10.1152/physrev.00041.2019.

- Deng, F. M.; Ding, M.; Lavker, R. M.; Sun, T. T. (2001): Urothelial function reconsidered: a role in urinary protein secretion. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (1), S. 154–159. DOI: 10.1073/pnas.98.1.154.
- Deng, Fang-Ming; Liang, Feng-Xia; Tu, Liyu; Resing, Katheryn A.; Hu, Ping; Supino, Mark et al. (2002): Uroplakin IIIb, a urothelial differentiation marker, dimerizes with uroplakin Ib as an early step of urothelial plaque assembly. In: *The Journal of cell biology* 159 (4), S. 685–694. DOI: 10.1083/jcb.200204102.
- Detchokul, S.; Williams, E. D.; Parker, M. W.; Frauman, A. G. (2014): Tetraspanins as regulators of the tumour microenvironment: implications for metastasis and therapeutic strategies. In: *British journal of pharmacology* 171 (24), S. 5462–5490. DOI: 10.1111/bph.12260.
- Dhakai, Hari P.; Coleman, Jennifer; Przybycin, Christopher G. (2019): A Novel Dual Immunostain to Characterize Sloughed Cells in Testicular Biopsies for Infertility. In: *The American journal of surgical pathology* 43 (8), S. 1123–1128. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001281.
- Edfors, Fredrik; Hober, Andreas; Linderbäck, Klas; Maddalo, Gianluca; Azimi, Alireza; Sivertsson, Åsa et al. (2018): Enhanced validation of antibodies for research applications. In: *Nature communications* 9 (1), S. 4130. DOI: 10.1038/s41467-018-06642-y.
- Expression of UPK1A in cancer - Summary - The Human Protein Atlas (2021). Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105668-UPK1A/pathology>, zuletzt aktualisiert am 15.10.2021, zuletzt geprüft am 15.10.2021.
- Fagerberg, Linn; Hallström, Björn M.; Oksvold, Per; Kampf, Caroline; Djureinovic, Dijana; Odeberg, Jacob et al. (2014): Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 13 (2), S. 397–406. DOI: 10.1074/mcp.M113.035600.
- Fetsch, P. A.; Marincola, F. M.; Abati, A. (1999): The new melanoma markers: MART-1 and Melan-A (the NIH experience). In: *The American journal of surgical pathology* 23 (5), S. 607–610. DOI: 10.1097/00000478-199905000-00017.
- Fu, Fangmei; Yang, Xudong; Zheng, Mingyong; Zhao, Qi; Zhang, Kexin; Li, Zugui et al. (2020): Role of Transmembrane 4 L Six Family 1 in the Development and Progression of Cancer. In: *Frontiers in molecular biosciences* 7, S. 202. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00202.
- Fulker, M. J.; Cooper, E. H.; Tanaka, T. (1971): Proliferation and ultrastructure of papillary transitional cell carcinoma of the human bladder. In: *Cancer* 27 (1), S. 71–82. DOI: 10.1002/1097-0142(197101)27:1<71::aid-cnrcr2820270112>3.0.co;2-e.
- Gancberg, D.; Di Leo, A.; Rouas, G.; Järvinen, T.; Verhest, A.; Isola, J. et al. (2002): Reliability of the tissue microarray based FISH for evaluation of the HER-2 oncogene in breast carcinoma. In: *Journal of clinical pathology* 55 (4), S. 315–317. DOI: 10.1136/jcp.55.4.315.
- Gremel, Gabriela; Bergman, Julia; Djureinovic, Dijana; Edqvist, Per-Henrik; Maindad, Vikas; Bharambe, Bhavana M. et al. (2014): A systematic analysis of commonly used antibodies in cancer diagnostics. In: *Histopathology* 64 (2), S. 293–305. DOI: 10.1111/his.12255.
- He, Yongzhong; Kong, Fandong; Du, Hanpeng; Wu, Mingjian (2014): Decreased expression of uroplakin Ia is associated with colorectal cancer progression and poor survival of patients. In: *International journal of clinical and experimental pathology* 7 (8), S. 5031–5037.
- Hemler, M. E. (2001): Specific tetraspanin functions. In: *The Journal of cell biology* 155 (7), S. 1103–1107. DOI: 10.1083/jcb.200108061.

- Hemler, Martin E. (2005): Tetraspanin functions and associated microdomains. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 6 (10), S. 801–811. DOI: 10.1038/nrm1736.
- Hicks, R. M. (1965): The fine structure of the transitional epithelium of rat ureter. In: *The Journal of cell biology* 26 (1), S. 25–48. DOI: 10.1083/jcb.26.1.25.
- Hoos, A.; Urist, M. J.; Stojadinovic, A.; Mastorides, S.; Dudas, M. E.; Leung, D. H. et al. (2001): Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. In: *The American journal of pathology* 158 (4), S. 1245–1251. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64075-8.
- Hu, Chih-Chi Andrew; Liang, Feng-Xia; Zhou, Ge; Tu, Liyu; Tang, Chih-Hang Anthony; Zhou, Jessica et al. (2005): Assembly of urothelial plaques: tetraspanin function in membrane protein trafficking. In: *Molecular biology of the cell* 16 (9), S. 3937–3950. DOI: 10.1091/mbc.e05-02-0136.
- Hu, P.; Deng, F. M.; Liang, F. X.; Hu, C. M.; Auerbach, A. B.; Shapiro, E. et al. (2000): Ablation of uroplakin III gene results in small urothelial plaques, urothelial leakage, and vesicoureteral reflux. In: *The Journal of cell biology* 151 (5), S. 961–972. DOI: 10.1083/jcb.151.5.961.
- Huang, Hong-Ying; Shariat, Shahrokh F.; Sun, Tung-Tien; Lepor, Herbert; Shapiro, Ellen; Hsieh, Jer-Tsong et al. (2007): Persistent uroplakin expression in advanced urothelial carcinomas: implications in urothelial tumor progression and clinical outcome. In: *Human pathology* 38 (11), S. 1703–1713. DOI: 10.1016/j.humpath.2007.04.003.
- Hudoklin, Samo; Jezernik, Kristijan; Neumüller, Josef; Pavelka, Margit; Romih, Rok (2011): Urothelial plaque formation in post-Golgi compartments. In: *PloS one* 6 (8), e23636. DOI: 10.1371/journal.pone.0023636.
- Im, Kyuseok; Mareninov, Sergey; Diaz, M. Fernando Palma; Yong, William H. (2019): An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1897, S. 299–311. DOI: 10.1007/978-1-4939-8935-5\_26.
- Kageyama, Susumu; Yoshiki, Tatsuhiro; Isono, Takahiro; Tanaka, Tsutomu; Kim, Chol Jang; Yuasa, Takeshi; Okada, Yusaku (2002): High expression of human uroplakin Ia in urinary bladder transitional cell carcinoma. In: *Japanese journal of cancer research : Gann* 93 (5), S. 523–531. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2002.tb01287.x.
- Kallin, B.; Martin, R. de; Etzold, T.; Sorrentino, V.; Philipson, L. (1991): Cloning of a growth arrest-specific and transforming growth factor beta-regulated gene, TI 1, from an epithelial cell line. In: *Molecular and cellular biology* 11 (10), S. 5338–5345. DOI: 10.1128/mcb.11.10.5338-5345.1991.
- Kątnik-Prastowska, Iwona; Lis, Jolanta; Matejuk, Agata (2014): Glycosylation of uroplakins. Implications for bladder physiopathology. In: *Glycoconjugate journal* 31 (9), S. 623–636. DOI: 10.1007/s10719-014-9564-4.
- Kim, S. J.; Shiba, E.; Ishii, H.; Inoue, T.; Taguchi, T.; Tanji, Y. et al. (1997): Thrombomodulin is a new biological and prognostic marker for breast cancer: an immunohistochemical study. In: *Anticancer research* 17 (3C), S. 2319–2323.
- Kong, Kar Lok; Kwong, Dora L.; Fu, Li; Chan, Tim Hon Man; Chen, Leilei; Liu, Haibo et al. (2010): Characterization of a candidate tumor suppressor gene uroplakin 1A in esophageal squamous cell carcinoma. In: *Cancer research* 70 (21), S. 8832–8841. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0779.
- Kong, Xiang-Tian; Deng, Fang-Ming; Hu, Ping; Liang, Feng-Xia; Zhou, Ge; Auerbach, Anna B. et al. (2004): Roles of uroplakins in plaque formation, umbrella cell enlargement, and urinary tract diseases. In: *The Journal of cell biology* 167 (6), S. 1195–1204. DOI: 10.1083/jcb.200406025.

- Kononen, J.; Bubendorf, L.; Kallioniemi, A.; Bärlund, M.; Schraml, P.; Leighton, S. et al. (1998): Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. In: *Nature medicine* 4 (7), S. 844–847. DOI: 10.1038/nm0798-844.
- Koss, L. G. (1977): Some ultrastructural aspects of experimental and human carcinoma of the bladder. In: *Cancer research* 37 (8 Pt 2), S. 2824–2835.
- Lang, Thorsten; Hochheimer, Nikolas (2020): Tetraspanins. In: *Current biology : CB* 30 (5), R204–R206. DOI: 10.1016/j.cub.2020.01.007.
- Lee, Gilho (2011): Uroplakins in the lower urinary tract. In: *International neurourology journal* 15 (1), S. 4–12. DOI: 10.5213/inj.2011.15.1.4.
- Lekishvili, Tamara; Fromm, Elisa; Mujoomdar, Michelle; Berditchevski, Fedor (2008): The tumour-associated antigen L6 (L6-Ag) is recruited to the tetraspanin-enriched microdomains: implication for tumour cell motility. In: *Journal of cell science* 121 (Pt 5), S. 685–694. DOI: 10.1242/jcs.020347.
- Liang, F. X.; Riedel, I.; Deng, F. M.; Zhou, G.; Xu, C.; Wu, X. R. et al. (2001): Organization of uroplakin subunits: transmembrane topology, pair formation and plaque composition. In: *The Biochemical journal* 355 (Pt 1), S. 13–18. DOI: 10.1042/0264-6021:3550013.
- Lizio, Marina; Harshbarger, Jayson; Shimoji, Hisashi; Severin, Jessica; Kasukawa, Takeya; Sahin, Serkan et al. (2015): Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas. In: *Genome biology* 16, S. 22. DOI: 10.1186/s13059-014-0560-6.
- Lobban, E. D.; Smith, B. A.; Hall, G. D.; Harnden, P.; Roberts, P.; Selby, P. J. et al. (1998): Uroplakin gene expression by normal and neoplastic human urothelium. In: *The American journal of pathology* 153 (6), S. 1957–1967. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65709-4.
- Loy, Timothy S.; Phillips, Roy W.; Linder, Chadwick L. (2002): A103 immunostaining in the diagnosis of adrenal cortical tumors: an immunohistochemical study of 316 cases. In: *Archives of pathology & laboratory medicine* 126 (2), S. 170–172. DOI: 10.5858/2002-126-0170-AITDO.
- Maecker, H. T.; Todd, S. C.; Levy, S. (1997): The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11 (6), S. 428–442.
- Miettinen, Markku; McCue, Peter A.; Sarlomo-Rikala, Maarit; Rys, Janusz; Czapiewski, Piotr; Wazny, Krzysztof et al. (2014): GATA3: a multispecific but potentially useful marker in surgical pathology: a systematic analysis of 2500 epithelial and nonepithelial tumors. In: *The American journal of surgical pathology* 38 (1), S. 13–22. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3182a0218f.
- Min, Guangwei; Wang, Huaibin; Sun, Tung-Tien; Kong, Xiang-Peng (2006): Structural basis for tetraspanin functions as revealed by the cryo-EM structure of uroplakin complexes at 6-Å resolution. In: *The Journal of cell biology* 173 (6), S. 975–983. DOI: 10.1083/jcb.200602086.
- Mirlacher, Martina; Kasper, Marlis; Storz, Martina; Knecht, Yvonne; Dürmüller, Ursula; Simon, Ronald et al. (2004): Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 17 (11), S. 1414–1420. DOI: 10.1038/modpathol.3800208.
- Mjønes, Patricia; Sagatun, Liv; Nordrum, Ivar S.; Waldum, Helge L. (2017): Neuron-Specific Enolase as an Immunohistochemical Marker Is Better Than Its Reputation. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 65 (12), S. 687–703. DOI: 10.1369/0022155417733676.
- Moch, H.; Schraml, P.; Bubendorf, L.; Mirlacher, M.; Kononen, J.; Gasser, T. et al. (1999): High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA

microarray screening in renal cell carcinoma. In: *The American journal of pathology* 154 (4), S. 981–986. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65349-7.

Moll, R.; Wu, X. R.; Lin, J. H.; Sun, T. T. (1995): Uroplakins, specific membrane proteins of urothelial umbrella cells, as histological markers of metastatic transitional cell carcinomas. In: *The American journal of pathology* 147 (5), S. 1383–1397.

Nocito, A.; Bubendorf, L.; Tinner, E. M.; Süess, K.; Wagner, U.; Forster, T. et al. (2001): Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. In: *The Journal of pathology* 194 (3), S. 349–357. DOI: 10.1002/1096-9896(200107)194:3<349::AID-PATH887>3.0.CO;2-D.

Noguchi, Shuhei; Arakawa, Takahiro; Fukuda, Shiro; Furuno, Masaaki; Hasegawa, Akira; Hori, Fumi et al. (2017): FANTOM5 CAGE profiles of human and mouse samples. In: *Scientific data* 4, S. 170112. DOI: 10.1038/sdata.2017.112.

Ogawa, K.; Johansson, S. L.; Cohen, S. M. (1999): Immunohistochemical analysis of uroplakins, urothelial specific proteins, in ovarian Brenner tumors, normal tissues, and benign and neoplastic lesions of the female genital tract. In: *The American journal of pathology* 155 (4), S. 1047–1050. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65206-6.

Olsburgh, Jonathon; Harnden, Patricia; Weeks, Robert; Smith, Barbara; Joyce, Adrian; Hall, Geoffrey et al. (2003): Uroplakin gene expression in normal human tissues and locally advanced bladder cancer. In: *The Journal of pathology* 199 (1), S. 41–49. DOI: 10.1002/path.1252.

Osman, Hany; Cheng, Liang; Ulbright, Thomas M.; Idrees, Muhammad T. (2016): The utility of CDX2, GATA3, and DOG1 in the diagnosis of testicular neoplasms: an immunohistochemical study of 109 cases. In: *Human pathology* 48, S. 18–24. DOI: 10.1016/j.humpath.2015.09.028.

Pan, Szu-Yu; Chiang, Wen-Chih; Chen, Yung-Ming (2021): The journey from erythropoietin to 2019 Nobel Prize: Focus on hypoxia-inducible factors in the kidney. In: *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 120 (1 Pt 1), S. 60–67. DOI: 10.1016/j.jfma.2020.06.006.

Parker, Douglas C.; Folpe, Andrew L.; Bell, Julie; Oliva, Esther; Young, Robert H.; Cohen, Cynthia; Amin, Mahul B. (2003): Potential utility of uroplakin III, thrombomodulin, high molecular weight cytokeratin, and cytokeratin 20 in noninvasive, invasive, and metastatic urothelial (transitional cell) carcinomas. In: *The American journal of surgical pathology* 27 (1), S. 1–10. DOI: 10.1097/00000478-200301000-00001.

Porter, K. R.; Kenyon, K.; Badenhansen, S. (1967): Specializations of the unit membrane. In: *Protoplasma* 63 (1), S. 262–274.

Ramos-Vara, J. A. (2005): Technical aspects of immunohistochemistry. In: *Veterinary pathology* 42 (4), S. 405–426. DOI: 10.1354/vp.42-4-405.

Ramos-Vara, J. A.; Miller, M. A. (2014): When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. In: *Veterinary pathology* 51 (1), S. 42–87. DOI: 10.1177/0300985813505879.

Riedel, I.; Czernobilsky, B.; Lifschitz-Mercer, B.; Roth, L. M.; Wu, X. R.; Sun, T. T.; Moll, R. (2001): Brenner tumors but not transitional cell carcinomas of the ovary show urothelial differentiation: immunohistochemical staining of urothelial markers, including cytokeratins and uroplakins. In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 438 (2), S. 181–191. DOI: 10.1007/s004280000315.

Rimm, D. L.; Camp, R. L.; Charette, L. A.; Costa, J.; Olsen, D. A.; Reiss, M. (2001): Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. In: *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 7 (1), S. 24–31.

- Rubin, Mark A.; Dunn, Rodney; Strawderman, Myla; Pienta, Kenneth J. (2002): Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. In: *The American journal of surgical pathology* 26 (3), S. 312–319. DOI: 10.1097/00000478-200203000-00004.
- Ruiz, Christian; Seibt, Silvia; Al Kuraya, Khawla; Siraj, Abdul K.; Mirlacher, Martina; Schraml, Peter et al. (2006): Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. In: *International journal of cancer* 118 (9), S. 2190–2194. DOI: 10.1002/ijc.21581.
- Salama, Rasha; Al-Obaidy, Khaleel I.; Perrino, Carmen M.; Grignon, David J.; Ulbright, Thomas M.; Idrees, Muhammad T. (2019): DOG1 immunohistochemical staining of testicular biopsies is a reliable tool for objective assessment of infertility. In: *Annals of diagnostic pathology* 40, S. 18–22. DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2019.02.015.
- Samaratunga, Hemamali; Delahunt, Brett (2012): Recently described and unusual variants of urothelial carcinoma of the urinary bladder. In: *Pathology* 44 (5), S. 407–418. DOI: 10.1097/PAT.0b013e3283560172.
- Saper, Clifford B. (2009): A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 57 (1), S. 1–5. DOI: 10.1369/jhc.2008.952770.
- Schlomm, Thorsten; Iwers, Liv; Kirstein, Patrick; Jessen, Birte; Köllermann, Jens; Minner, Sarah et al. (2008): Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 21 (11), S. 1371–1378. DOI: 10.1038/modpathol.2008.104.
- Semenza, Gregg L. (2007): Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. In: *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2007 (407), cm8. DOI: 10.1126/stke.4072007cm8.
- Shi, S. R.; Key, M. E.; Kalra, K. L. (1991): Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 39 (6), S. 741–748. DOI: 10.1177/39.6.1709656.
- Song, Yang; Wang, Hui; Zou, Xue-Jing; Zhang, Ya-Xuan; Guo, Ze-Qin; Liu, Li et al. (2020): Reciprocal regulation of HIF-1 $\alpha$  and Uroplakin 1A promotes glycolysis and proliferation in Hepatocellular Carcinoma. In: *Journal of Cancer* 11 (22), S. 6737–6747. DOI: 10.7150/jca.48132.
- Sternberger, L. A.; Hardy, P. H.; Cuculis, J. J.; Meyer, H. G. (1970): The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 18 (5), S. 315–333. DOI: 10.1177/18.5.315.
- Steurer, Stefan; Riemann, Claudia; Büscheck, Franziska; Luebke, Andreas M.; Kluth, Martina; Hube-Magg, Claudia et al. (2021): p63 expression in human tumors and normal tissues: a tissue microarray study on 10,200 tumors. In: *Biomarker research* 9 (1), S. 7. DOI: 10.1186/s40364-021-00260-5.
- Sun, T. T.; Zhao, H.; Provet, J.; Aebi, U.; Wu, X. R. (1996): Formation of asymmetric unit membrane during urothelial differentiation. In: *Molecular biology reports* 23 (1), S. 3–11. DOI: 10.1007/BF00357068.
- Suryavanshi, Moushumi; Sanz-Ortega, Julian; Sirohi, Deepika; Divatia, Mukul K.; Ohe, Chisato; Zampini, Claudia et al. (2017): S100P as a Marker for Urothelial Histogenesis: A Critical Review and Comparison With Novel and Traditional Urothelial

- Immunohistochemical Markers. In: *Advances in anatomic pathology* 24 (3), S. 151–160. DOI: 10.1097/PAP.000000000000150.
- The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project (2013). In: *Nature genetics* 45 (6), S. 580–585.
- Torhorst, J.; Bucher, C.; Kononen, J.; Haas, P.; Zuber, M.; Köchli, O. R. et al. (2001): Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. In: *The American journal of pathology* 159 (6), S. 2249–2256. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63075-1.
- Truschel, Steven T.; Wang, Edward; Ruiz, Wily G.; Leung, Som-Ming; Rojas, Raul; Lavelle, John et al. (2002): Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. In: *Molecular biology of the cell* 13 (3), S. 830–846. DOI: 10.1091/mbc.01-09-0435.
- Tu, Liyu; Sun, Tung-Tien; Kreibich, Gert (2002): Specific heterodimer formation is a prerequisite for uroplakins to exit from the endoplasmic reticulum. In: *Molecular biology of the cell* 13 (12), S. 4221–4230. DOI: 10.1091/mbc.e02-04-0211.
- Uhlen, Mathias; Bandrowski, Anita; Carr, Steven; Edwards, Aled; Ellenberg, Jan; Lundberg, Emma et al. (2016): A proposal for validation of antibodies. In: *Nature methods* 13 (10), S. 823–827. DOI: 10.1038/nmeth.3995.
- UPK1A protein expression summary - The Human Protein Atlas (2021). Online verfügbar unter [https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105668-UPK1A#gene\\_information](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105668-UPK1A#gene_information), zuletzt aktualisiert am 15.11.2021, zuletzt geprüft am 15.11.2021.
- Wan, Qian; Xiong, Geng; Liu, Guihua; Shupe, Thomas D.; Wei, Guanghui; Zhang, Deying et al. (2018): Urothelium with barrier function differentiated from human urine-derived stem cells for potential use in urinary tract reconstruction. In: *Stem cell research & therapy* 9 (1), S. 304. DOI: 10.1186/s13287-018-1035-6.
- Weidemann, Sören; Gagelmann, Pauline; Gorbokon, Natalia; Lennartz, Maximilian; Menz, Anne; Luebke, Andreas M. et al. (2021): Mesothelin Expression in Human Tumors: A Tissue Microarray Study on 12,679 Tumors. In: *Biomedicines* 9 (4). DOI: 10.3390/biomedicines9040397.
- Wennerberg, A. E.; Nalesnik, M. A.; Coleman, W. B. (1993): Hepatocyte paraffin 1: a monoclonal antibody that reacts with hepatocytes and can be used for differential diagnosis of hepatic tumors. In: *The American journal of pathology* 143 (4), S. 1050–1054.
- Wu, X. R.; Lin, J. H.; Walz, T.; Häner, M.; Yu, J.; Aebi, U.; Sun, T. T. (1994): Mammalian uroplakins. A group of highly conserved urothelial differentiation-related membrane proteins. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (18), S. 13716–13724.
- Wu, X. R.; Medina, J. J.; Sun, T. T. (1995): Selective interactions of UPLa and UPLb, two members of the transmembrane 4 superfamily, with distinct single transmembrane-domained proteins in differentiated urothelial cells. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (50), S. 29752–29759. DOI: 10.1074/jbc.270.50.29752.
- Wu, X. R.; Sun, T. T. (1993): Molecular cloning of a 47 kDa tissue-specific and differentiation-dependent urothelial cell surface glycoprotein. In: *Journal of cell science* 106 (Pt 1), S. 31–43.
- Wu, Xue-Ru; Kong, Xiang-Peng; Pellicer, Angel; Kreibich, Gert; Sun, Tung-Tien (2009): Uroplakins in urothelial biology, function, and disease. In: *Kidney international* 75 (11), S. 1153–1165. DOI: 10.1038/ki.2009.73.
- Xie, Bo; Zhou, Ge; Chan, Shiu-Yung; Shapiro, Ellen; Kong, Xiang-Peng; Wu, Xue-Ru et al. (2006): Distinct glycan structures of uroplakins Ia and Ib: structural basis for the selective binding of FimH adhesin to uroplakin Ia. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (21), S. 14644–14653. DOI: 10.1074/jbc.M600877200.

- Yu, J.; Lin, J. H.; Wu, X. R.; Sun, T. T. (1994): Uroplakins Ia and Ib, two major differentiation products of bladder epithelium, belong to a family of four transmembrane domain (4TM) proteins. In: *The Journal of cell biology* 125 (1), S. 171–182. DOI: 10.1083/jcb.125.1.171.
- Zellweger, Tobias; Ninck, Christoph; Bloch, Michael; Mirlacher, Martina; Koivisto, Pasi A.; Helin, Heikki J. et al. (2005): Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer. In: *International journal of cancer* 113 (4), S. 619–628. DOI: 10.1002/ijc.20615.
- Zhang, DaoHai; Salto-Tellez, Manuel; Putti, Thomas Choudary; Do, Elaine; Koay, Evelyn Siew-Chuan (2003): Reliability of tissue microarrays in detecting protein expression and gene amplification in breast cancer. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 16 (1), S. 79–84. DOI: 10.1097/01.MP.0000047307.96344.93.
- Zheng, Yan; Wang, Dan-dan; Wang, Wei; Pan, Ke; Huang, Chun-yu; Li, Yuan-fang et al. (2014): Reduced expression of uroplakin 1A is associated with the poor prognosis of gastric adenocarcinoma patients. In: *PloS one* 9 (4), e93073. DOI: 10.1371/journal.pone.0093073.
- Zhou, G.; Mo, W. J.; Sebbel, P.; Min, G.; Neubert, T. A.; Glockshuber, R. et al. (2001): Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic Escherichia coli: evidence from in vitro FimH binding. In: *Journal of cell science* 114 (Pt 22), S. 4095–4103.
- Zhu, Haiyan; Tang, Yuxin; Zhang, Xiangyang; Jiang, Xianzhen; Wang, Yong; Gan, Yu; Yang, Jianfu (2015): Downregulation of UPK1A suppresses proliferation and enhances apoptosis of bladder transitional cell carcinoma cells. In: *Medical oncology (Northwood, London, England)* 32 (3), S. 84. DOI: 10.1007/s12032-015-0541-y.

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Guido Sauter und Herrn Prof. Dr. Ronald Simon für die gemeinsame Zusammenarbeit und die Ermöglichung dieser Arbeit bedanken. Dieser Dank gilt auch den anderen Mitarbeitern und den Doktoranden des Instituts für Pathologie, die mich in den vergangenen Monaten tatkräftig unterstützt haben. Speziell möchte ich außerdem Gonca dafür danken, dass sie mich dazu ermutigt hat dieses Projekt anzugehen.

Ein weiterer ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern für die Begleitung und Unterstützung auf meinem Weg und all die schöne Zeit, die ich mit Euch erleben darf.

Ich bedanke mich außerdem bei Tim und Felix für die aufwendigen Korrekturen, bei Charlotte, Caspar, Hannah Paul und Sharon für die gemeinsamen entspannten Abende während meiner Doktorandenzeit und auch bei all den anderen lieben Menschen, die nie an mir zweifeln und immer für mich da sind.

## 10. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutztechnischen Gründen entfernt.

## 11. Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Unterschrift: .....