

Aus dem Institut für Pathologie
des Universitätskrankenhaus Hamburg Eppendorf
Albertinenpathologie
Leitender Arzt: Prof. Dr. med. T. Löning

Differentielle Expression von basalen und
luminalen Keratinen sowie dem myoepithelialen
Marker smooth-muscle Aktin in
Mammatumoren vom Speicheldrüsentyp

In-situ Triple Immunfluoreszenz und quantitative
RNA-Analysen

Dissertation

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

vorgelegt von
Alina Kerstin Lange
geb. in Hamburg

Hamburg 2014

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.03.2015**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. T. Löning

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. med. W. Böcker

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. med. V. Müller

Inhalt

1	Einleitung	3
1.1	Einleitende Bemerkungen	3
1.2	Histologie des normalen Mammagewebes	3
1.3	Histologie des normalen Speicheldrüsengewebes	4
1.4	Histologie der untersuchten Läsionen	5
1.4.1	Adenomyoepithelialer Tumor (AMT)	5
1.4.2	Pleomorphes Adenom (PA)	5
1.4.3	Adenoid-zystisches Karzinom (ACC)	6
1.4.4	Syringomatöses Adenom der Mamille	6
1.4.5	Adeno-squamöses Karzinom (AdSC)	7
1.4.6	Mukoepidermoidkarzinom (MEC)	7
1.4.7	Plattenepithelkarzinom (PEC)	7
1.4.8	Basalzelladenom (BCA)	8
1.5	Progenitorzellkonzept	8
1.6	Zielsetzung	9
2	Material und Methode	9
2.1	Material und Untersuchungsaufbau	9
2.2	Methode	12
2.2.1	Schnittherstellung	12
2.2.2	Antigendemaskierung	12
2.2.3	Antikörper	13
2.2.4	Antigennachweis in der Immunfluoreszenztechnik	14
2.2.5	Färbemethodik	15
2.3	Auswertung der Immunfluoreszenzschnitte	18
2.4	Quantitative Real Time - PCR (qPCR)	19

3	Ergebnisse	19
3.1	Pleomorphes Adenom (PA)	20
3.1.1	Pleomorphes Adenom der Mamma	20
3.1.2	Pleomorphes Adenom der Speicheldrüse	22
3.2	Adenomyoepitheliale Tumoren (AMT)	25
3.2.1	Adenomyoepithelialer Tumor der Mamma	25
3.2.2	Epithelial-myotheliales Karzinom der Speicheldrüse	27
3.3	Basalzelladenom (BCA)	29
3.3.1	Basalzelladenom der Mamma	29
3.3.2	Basalzelladenom der Speicheldrüse	31
3.4	Adenoid-zystisches Karzinom (ACC)	32
3.4.1	Adenoid-zystisches Karzinom der Mamma	32
3.4.2	Adenoid-zystisches Karzinom der Speicheldrüse	34
3.5	Plattenepithelkarzinom (PEC)	36
3.6	Syringom der Mamille	36
3.7	Adenosquamöses Karzinom (AdSC)	41
3.8	Mukoepidermoidkarzinom (MEC)	45
3.9	qPCR Analysen	46
4	Diskussion	49
5	Zusammenfassung	54
6	Tabellenverzeichnis	56
7	Abbildungsverzeichnis	57
8	Literaturverzeichnis	58
9	Danksagung	63
10	Eidesstattliche Versicherung	64

1 Einleitung

1.1 Einleitende Bemerkungen

Brustkrebs ist die häufigste bösartige Neubildung bei Frauen. Schätzungsweise jede elfte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs (WHO 2004). Der überwiegende Anteil von Tumoren der Mamma zeigt eine Ähnlichkeit zum normalen Mammaparenchym. Eine kleine Gruppe von Tumoren weist jedoch Merkmale auf, die häufig bei Tumoren der Speicheldrüse gefunden werden. Diese Tumoren werden daher auch als Tumoren vom Speicheldrüsentyp bezeichnet. Es handelt sich um das pleomorphe Adenom, adenomyoepitheliale Tumoren, das adenoid-zystische Karzinom, das Basalzelladenom, das adeno-squamöse Karzinom, das Mukoepidermoidkarzinom und der syringomatöse Tumor. Aus konzeptionellen Gründen wird das Plattenepithelkarzinom in der vorliegenden Studie mit einbezogen. Die Histogenese der Tumoren vom Speicheldrüsentyp ist bisher weitgehend ungeklärt (Pia-Foschini et al., 2003).

Basierend auf dem Progenitorzellkonzept der Mamma sollen in dieser Arbeit mittels der in-situ Triple Immunfluoreszenz (is-TIF) Methode die benannten Läsionen untersucht werden. Diese Immunfluoreszenzmethode ermöglicht eine simultane Darstellung von drei verschiedenen Proteinen in einem Gewebeschnitt (Buchwalow and Boecker, 2010). Von besonderer Bedeutung sind hierbei die verschiedenen Intermediärfilamente, die sich im Zytoplasma der Zelle als Stützgerüst finden. Sie bestehen aus unterschiedlichen, aber verwandten Proteinen, die bei der Bestimmung des epithelialen Phänotyps vorrangig eingesetzt werden. In Epithelzellen sind es Zytokeratine, in Fibroblasten und verwandten Zellen ist es Vimentin (Welsch 2006; Moll et al., 1982).

In dieser Arbeit wurden die basalen Keratine K5, 6 und 14, die linienspezifischen glandulären Keratine K7, 8 und 18, das plattenepitheltypische Keratin K10, sowie für den Nachweis der myoepithelialen Differenzierung smooth muscle actin (SMA) eingesetzt.

1.2 Histologie des normalen Mammagewebes

Der Drüsenkörper stellt den Hauptbestandteil der Mamma dar und setzt sich aus 15 bis 20 tubulär verzweigten Einzeldrüsen zusammen. Die epithelialen Drüsenstrukturen sind in bindegewebige Septen eingebettet, welche die Brustdrüse unterteilen. Jede Einzeldrüse besitzt einen eigenständigen Ausführungsgang, der an der Oberfläche der Mamille mündet. Unterteilt wird das Drüsengewebe in das Gangsystem und in Läppchen. Die darin liegenden Azini bilden die sekretorische Komponente des Parenchyms. Zusammen mit dem terminalen Gangsegment bildet das Läppchen die terminale dukto-lobuläre Einheit (TDLE). Der terminale Gang mündet über intermediäre in größere Gangabschnitte

und schließlich über den Sinus lactiferus in den Ductus excretorius (Bässler 1978). Die Einzeldrüsen weisen häufig Anastomosen zu benachbarten Drüsen auf, was bei der Ausbreitung von Tumorzellen von entscheidender Bedeutung ist (Böcker et al. 2006). Das Epithel des Brustparenchyms besitzt einen zwei- bis dreischichtigen Aufbau in den größeren Milchgängen, mit einer bis zwei luminal gelegenen glandulären Zellschicht, einer basal gelegenen Myoepithelschicht und einer Basalmembran, welche das Epithel vom Stroma abgrenzt. In kleineren und mittelgroßen Gangsegmenten findet man hingegen nur noch eine einreihige, luminal gelegene glanduläre Zellschicht, welche aus kubischen Zellen aufgebaut ist. Das Stroma kann in ein interlobuläres, straffes, relativ zellarmes Bindegewebe mit Kollagenfasern und ein intralobuläres Bindegewebe eingeteilt werden. Das intralobuläre Bindegewebe enthält Fibroblasten, Lympho- und Histozyten, sowie Plasma- und Mastzellen. Im Vergleich mit dem interlobulären Stroma ist das Bindegewebe in der Nähe der Läppchen faserarm. Zudem enthält das Stroma auch Fettgewebe (Welsch 2006).

1.3 Histologie des normalen Speicheldrüsengewebes

Die Speicheldrüsen des Menschen lassen sich in zwei Gruppen gliedern: Die kleinen und die großen Speicheldrüsen. Die kleinen Speicheldrüsen liegen in der Mukosa der Mundschleimhaut.

Zu den großen Speicheldrüsen werden drei Drüsen gezählt: die Glandula parotis (Ohrspeicheldrüse), Glandula submandibularis (Unterkieferdrüse) und die Glandula sublingualis (Unterzungendrüse). Sie unterscheiden sich vor allem durch die Beschaffenheit des Sekretes, welches sie sezernieren. Ihr histologischer Aufbau ist recht ähnlich.

Jede Drüse ist in Läppchen gegliedert, welche durch Bindegewebssepten voneinander getrennt sind. Die sekretbildenden Endstücke oder Azini der Läppchen sind über ein komplexes Ausführungsgangsystem mit der Mundhöhle verbunden. Dabei liegen die an die Azini anschließenden Schaltstücke, und die darauf folgenden Streifenstücke intralobulär, die Ausführungsgänge hingegen extra- bzw. interlobulär. Im Verlauf werden die Gänge weitlumiger und das Epithel höher. So besitzen die von Bindegewebe umgebenen Ausführungsgänge schließlich ein zweireihiges, zweischichtiges, oder sogar mehrschichtiges Epithel. Die Streifenstücke und die Ausführungsgänge enthalten basal liegende K5/14+ Progenitorzellen, aus denen sich nach neueren Untersuchungen Drüsenepithelien und Myoepithel entwickeln. Die sekretorischen Zellen der Azini lassen sich in seröse und muköse Zellen einteilen. Muköse Zellen besitzen einen basal sitzenden, abgeflachten Kern. Das Zytoplasma erscheint im HE-Präparat hell, da es überwiegend Schleimgranula enthält. Seröse Zellen sitzen entweder als halbmondförmige Kappen auf den mukösen Azini auf (sogenannte Von Ebner Halbmonde), oder sie sind selbst in Form von basophilen Azini angeordnet. Ihre Kerne sind rund und innerhalb der Zelle mittig bis basal liegend. Im Bereich der sekretorischen Zellen und der Schaltstücke liegen stets auch

kontraktile Myoepithelzellen, die sich am Aufbau der Basalmembran beteiligen, sowie Fettzellen in unterschiedlich starker Ausprägung (Welsch 2006).

1.4 Histologie der untersuchten Läsionen

1.4.1 Adenomyoepithelialer Tumor (AMT)

Der Adenomyoepitheliale Tumor stellt eine seltene epithelial-myotheliale Läsion dar, die sowohl in der Mamma, als auch in der Speicheldrüse vorkommt. Da in der Speicheldrüse nur maligne Varianten des AMT bekannt sind, wird der Tumor hier als epithelial-myotheliales Karzinom (EMC) bezeichnet. In der Mamma verhält sich der AMT hingegen überwiegend benigne. Meist finden sich multiple Tumoren von 1 bis 10 cm Durchmesser, wobei oft ein Hauptknoten von mehreren Satellitenknoten umgeben ist. Invasives Wachstum besteht in der Regel nicht. Die Bildung von Mikrokalk ist möglich (Pia-Foschini et al. 2003; Foschini and Eusebi 2009; Foschini and Krausz 2010). Histologisch dominiert beim AMT die Proliferation von phänotypisch variablen Myoepithelzellen, die sich um Drüsenzellen formatieren. Die Morphologie der myoepithelialen Zellen reicht von spindelzellig bis polygonal, das Plasma ist eosinophil bis hyalin. Die Zellen liegen oft mehrschichtig trabekulär oder ordnen sich in großen Nestern an. Somit entstehen im Tumor große Flächen von ausschließlich myoepithelialen Zellen. Zwischen den Zellen finden sich häufig Ablagerungen des von ihnen gebildeten basalmembranartigen, hyalinen Materiales. In den Drüsen des Tumors können sebazöse oder squamöse Metaplasien auftreten (Pia-Foschini et al. 2003). Der AMT lässt sich in einen biphasischen und in einen monophasischen Typ einteilen. Dabei ist der biphasische ein gut differenzierter, benigner, überwiegend tubulär oder lobulär aufgebauter Tumor, der oft von einer Pseudokapsel umgeben ist. Der monophasische Tumor ist hingegen ein wenig differenzierter, meist spindelzelliger Tumor mit fehlender oder geringer glandulärer Differenzierung im HE-Schnittpräparat. Diese Tumoren zeigen häufig Ablagerungen von hyalinem Material, welches immunhistologisch Kollagen IV enthält (Böcker et al. 2006).

1.4.2 Pleomorphes Adenom (PA)

Das in der Mamma äußerst selten vorkommende pleomorphe Adenom wird von einigen Autoren als Variante der AMT erachtet und unterscheidet sich von diesen durch die Anwesenheit einer charakteristischen, myxoiden Matrix mit chondroiden und ossären Metaplasien (Pia-Foschini et al. 2003; Foschini and Eusebi 2009; Foschini and Krausz 2010). Der stärker ausgeprägte epitheliale Anteil formiert sich bandartig, tubulär oder in soliden sowie retikulären Nestern. Der myoepitheliale Anteil ist

allerdings im Gegensatz zum AMT meist gering (Böcker 2012). Das PA ist benigne und wird in der Regel von einer Pseudokapsel umgeben. In der Mamma ist es oft retromamillär lokalisiert und stellt sich in Form eines wenige Zentimeter messenden, solitären Knotens dar. Seltener kommt es zu einem multifokalen Auftreten. In der Glandula parotis stellt das PA die häufigste Tumorart dar. Es gleicht histologisch dem PA der Mamma (Pia- Foschini et al. 2003).

1.4.3 Adenoid-zystisches Karzinom (ACC)

Das ACC ist ein seltener Tumor, der einen Anteil von ca. 0,1% aller Mammakarzinome ausmacht. Histologisch entsprechen diese Tumoren denen der Speicheldrüse (Hamper et al. 1990; Kasami et al. 1998; Holst et al. 1999; Trendell-Smith et al. 1999; Shin and Rosen 2002; Marchio et al. 2010; Wetterskog et al. 2012). Bei niedrig-malignem Potenzial stellt sich das ACC makroskopisch als zu- meist scharf begrenzter Tumor von 0,7 bis 12 cm Größe dar. Die mikroskopische Ausbreitung ist oft- mals größer, als die makroskopisch sichtbare Läsion. Drei verschiedene Wachstumsmuster werden beim ACC beschrieben: cribriform, trabekulär-tubulär oder solide. Der Tumor zeigt sowohl glanduläre als auch myoepitheliale Differenzierungen. Die spindelförmigen Myoepithelzellen besitzen runde bis ovale Zellkerne mit ein bis zwei Nukleolen, sowie einen schmalen Zytoplasmasaum. Sie bilden globuläre Basalmembran-ähnliche Ablagerungen, aus myxoidem, teils eosinophil-hyalinem Material (Kollagen 4). Das Kollagen 4 befindet sich in runden oder bandförmigen Pseudolumina, um welche sich das Myoepithel formatiert (Pia-Foschini et al. 2003). Die größeren glandulären Zellen, mit runden Kernen und breitem, eosinophilem Zytoplasmasaum, umgeben die Drüsenlumina, in welchen sich PAS-positives mukoides Material befindet. Das Stroma kann locker, desmoplastisch, myxoid und lipomatös sein (Ellis et al. 2003). Im Vergleich zu den adenoid-zystischen Karzinomen der Speichel- drüsen kommen sebazöse und squamöse Metaplasien bei denen der Mamma häufiger, perineurale Ausbreitungsformen jedoch seltener vor (Tavassoli und Norris 1986).

1.4.4 Syringomatöser Tumor der Mamille

Der syringomatöse Tumor, oder Syringom, ist ein periareolär wachsender Tumor von 1,5 bis 8 cm Größe. (Slaughter et al. 1992; Biernat and Jablkowski 2000; Rosen 2009; Carter and Dyess 2004; Ku et al. 2004; Oo and Xiao 2009). Trotz invasiven Wachstums zeigt er keine Metastasierung.

In der Histologie des Tumors finden sich kurze trabekuläre, tubuläre, teils kleinlumige und komma- förmige Zellverbände neben winzigen soliden Tumorzellnestern, in einem Fibromatose-ähnlichen Stroma. Innerhalb der überwiegend basalzelligen Verbände kommt es zu fokalen glandulären und squamösen, selten auch zu sebazösen Differenzierungen. Im Stroma sind ossäre und kartilaginäre Metaplasien möglich. Aufgrund der Ähnlichkeit zu syringomatösen Tumoren der Haut wurde die The-

se vertreten, dass sich diese Läsionen aus den Schweißdrüsen­gängen der Mamillenhaut entwickeln. Nach neueren Untersuchungen dürften sie sich aber eher von Progenitorzellen der Mamillenausführungsgänge ableiten (Boecker et al. 2012).

1.4.5 Adeno-squamöses Karzinom (AdSC)

Das adeno-squamöse Karzinom wird nach seinem Malignitätsgrad in low grade (LGAdSC) und high grade (HGAdSC) unterteilt. Das LGAdSC ähnelt histologisch stark dem Syringom der Mamille (Rosen and Ernsberger 1987; Van Hooven et al. 1993; Geyer et al. 2010; Soo and Tan 2012). Es ist jedoch im Gegensatz zum Syringom, welches in der Mamillenregion lokalisiert ist, in der Drüsenperipherie zu finden. Seine Größe beträgt meist 1,5 bis 8 cm. Histologisch stellt sich in der Regel ein basalzelliger Tumor mit teils glandulärer, teil squamöser Differenzierung dar (Foschini and Krausz 2010). Ossäre und kartilaginäre Metaplasien sind möglich (Tavassoli und Devilee 2003).

Das hochmaligne HGAdSC weist im Gegensatz zum LGAdSC deutliche Malignitätskriterien auf (Lee et al. 1999). Neben polymorphen Zellverbänden und desmoplastischen Stromareaktionen sind Invasion und Metastasierungsfähigkeit charakteristisch.

1.4.6 Mukoepidermoidkarzinom (MEC)

Das Mukoepidermoidkarzinom stellt einen der häufigsten malignen Tumoren der Speicheldrüse dar, der in der Brustdrüse extrem selten vorkommt (Dardick et al. 1990; Di Tommaso et al. 2004; Luna 2006; Weinreb et al. 2009; Garcia et al. 2011). In der Literatur wird allerdings von einigen Autoren das MEC häufig mit dem adeno-squamösen Karzinom gleichgestellt. So verwendet beispielsweise Tavassoli (1999) die beiden Begriffe synonym. Histologisch präsentiert der Tumor basaloide, epidermoide und squamöse, sowie per definitionem muzinös differenzierte Zellen, die sich nest- und ballenförmig formatieren. Daneben finden sich zahlreiche Zysten, welche mit einem muzinösen Material ausgefüllt sind und teilweise mehr als 50% des Tumolvolumens ausmachen. Das gut differenzierte MEC ist meist scharf begrenzt und überwiegend zystisch strukturiert, das schlecht differenzierte imponiert hingegen eher solide und unscharf in der Begrenzung (Di Tommaso et al. 2004).

1.4.7 Plattenepithelkarzinom (PEC)

Das in der Brustdrüse selten vorkommende Plattenepithelkarzinom stellt sich in der Regel als herdförmiger Tumor mit plattenepithelialer Differenzierung dar. Häufig liegen zystische Degenerationen vor, Nekrosen und Einblutungen sind möglich. Die Tumorzellen sind meist gut differenziert und können partiell oder komplett spindelzellig vorliegen (Tavassoli und Devilee 2003).

1.4.8 Basalzelladenom (BCA)

Basalzelladenome sind seltene, benigne Tumoren. Sie werden durch uniforme Basalzellen, welche sich scharf vom umgebenden Stroma abgrenzen, charakterisiert. Die epithelialen Strukturen werden häufig durch eine eosinophile, hyaline basalmembranartige Membran begrenzt. Im Tumor finden sich papilläre sowie trabekuläre Strukturen, glanduläre, myoepitheliale und z.T. auch plattenepitheliale Differenzierungen können vorkommen (Böcker und Kettritz 2006). Das BCA der Brust ist extrem selten und wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Im Rahmen dieser Studie konnten wir jeweils einen Fall von BCA der Mamma bzw. der Speicheldrüse untersuchen.

1.5 Progenitorzellkonzept

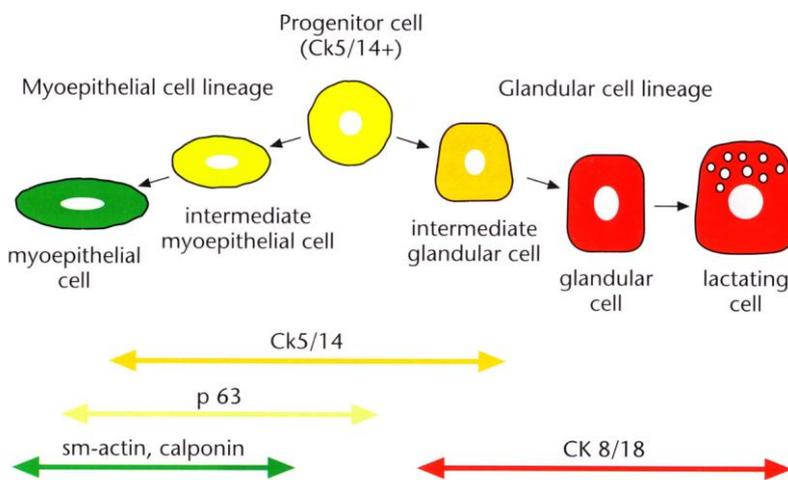


Abb. 1: Das Progenitorzellkonzept. Aus: *Preneoplasia of the Breast: A New Conceptual Approach to Proliferative Breast Disease*. Böcker W. Saunders W B Co. 08/2006: 5. Die durch Keratin K5/14 charakterisierten Progenitorzellen differenzieren sich über dual-exprimierende intermediäre Zellen entweder zu ausgereiften glandulären Zellen (K8/18 - hier rot) oder zu reifen myoepithelialen Zellen (sm-actin, calponin – hier grün).

Sowohl die epitheliale Regeneration des normalen Mammagewebes, als auch die Differenzierung der benignen und malignen epithelialen proliferativen Erkrankungen basieren nach neuestem Erkenntnisstand auf sogenannten Progenitorzellen. Die Progenitorzelle stellt eine somatische Stammzelle (Progenitor- oder Ursprungszelle) des Epithels dar, die sich sowohl in glanduläre, als auch in myoepitheliale Richtung ausdifferenzieren kann. Sie exprimiert die Zytokeratine K5 und K14, sowie den Stammzellmarker p63. Ihr Differenzierungsprozeß vollzieht sich über die Intermediärzellen. Diese enthalten neben K5/14 bereits die für die jeweilige Zelllinie spezifischen Antigene, nämlich Keratin K8/18 auf glandulärer und SMA auf myoepithelialer Seite. Die terminalen myoepithelialen Zellen, die eher selten vorkommen, exprimieren schließlich nur noch SMA.

Das Bild der luminalen Zellschicht wird in der Gangstruktur von Progenitorzellen und intermediären glandulären Zellen geprägt. Dazwischen liegen ausgereifte glanduläre Zellen. In der basalen Zellschicht dominieren intermediäre, neben den seltener vorkommenden reifen Myoepithelzellen. Die TDLEs enthalten in unterschiedlichem Ausmaß intermediäre bzw. glanduläre Zellen, dagegen keine oder nur wenige Progenitorzellen (Boecker 2006).

1.6 Zielsetzung

Tumoren vom Speicheldrüsentyp kommen per Definitionem sowohl in den Speicheldrüsen, als auch in der Brustdrüse vor (Pia-Foschini et al. 2003). Da sie zu den selteneren Läsionen der Mamma gehören, ist bisher wenig über ihre Histogenese bekannt. In dieser Studie soll der zelluläre Aufbau der Tumoren untersucht und mit den Subtypen des Mamma- und Speicheldrüsenepithels verglichen werden. Als Methode der Wahl wird eine Mehrfach-Immunfluoreszenz-Methode (is-TIF) eingesetzt, mit dem Ziel, das Expressionsmuster basaler Keratine K5/14, glandulärer Keratine K8/18 und des plattenepithelialen Keratins K10, sowie schließlich von sm-Aktin, als myoepithelialen Marker und von Vimentin, als mesenchymalen Marker, in den Tumorzellen zu analysieren.

Von den Ergebnissen erwarten wir Aufschlüsse über die zellulären Differenzierungswege in den Tumoren und mögliche Rückschlüsse auf die Entstehung dieser Tumoren.

2 Material und Methode

2.1 Material und Untersuchungsaufbau

Durchgeführt wurde diese Studie anhand von archiviertem Material des Gerhard-Domagk-Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Münster, sowie des Hamburger Speicheldrüsenregisters.

Ausgewählt wurden die zu untersuchenden Fälle anhand von HE-Schnittpräparaten. Die Gewebeproben lagen als Paraffinblöcke vor. Es wurden insgesamt 38 Patienten in die Studie eingeschlossen. Bei 27 Fällen handelt es sich um Läsionen der Mamma, bei elf Fällen handelt es sich um Speicheldrüsentumoren (siehe Tabelle 1 und 2).

Tabelle 1 a. Material: Läsionen der Mamma.

Mamma	Fall	Geschl.	Geb.	Diagnose, Bemerkungen
PA	33426/04	Weiblich		Pleomorphes Adenom
	27718/08	Weiblich		Pleomorphes Adenom
	36373/07	Weiblich	1933	Pleomorphes Adenom
AMT	15233/08	Weiblich	1943	Adenomyothelialer Tumor, benigne, duktale Hyperplasie
	3406/06	Weiblich	1939	Adenomyotheliales Karzinom, maligne
BCA	35641/06	Weiblich		Basalzelladenom
ACC	18251/08	Weiblich	1952	Adenoid-zystisches Karzinom
	26285/08	Weiblich		Adenoid-zystisches Karzinom
	P10/1438	Weiblich	1958	Adenoid-zystisches Karzinom
PEC	17086/05	Weiblich		Plattenepithelkarzinom
	17441/07	Weiblich		Plattenepithelkarzinom
	6465/02	Weiblich		Plattenepithelkarzinom, + DCIS
Syringom	30307/03	Weiblich	1942	Syringom der Mamille
	31072/05	Weiblich	1980	Syringom der Mamille
	23492/07	Weiblich	1959	Syringom der Mamille
	32924/05	Weiblich	1949	Syringom der Mamille, sklerosierende Adenose
	32927/05	Weiblich	1980	Syringom der Mamille
	26887/03	Weiblich		Syringom der Mamille

Tabelle 1 b. Material: Läsionen der Mamma.

Adeno-squamöses Karzinom	25946/04	Weiblich	1933	Low grade adeno-squamöses Karzinom
	P09/1133	Weiblich	1953	Low grade adeno-squamöses Karzinom
	19880/06	Weiblich	1949	Low grade adeno-squamöses Karzinom
	1161/03	Weiblich		Low grade adeno-squamöses Karzinom
	21952/08	Weiblich		Low grade adeno-squamöses Karzinom
	24437/05	Weiblich	1953	High grade adeno-squamöses Karzinom, G3, DCIS
	9534/07	Weiblich	1951	High grade adeno-squamöses Karzinom, G2
	M10/5462	Weiblich	1939	High grade adeno-squamöses Karzinom, G3, DCIS
	A08/20538	Weiblich	1934	High grade adeno-squamöses Karzinom

Tabelle 2. Material: Läsionen der Speicheldrüse.

Speicheldrüse	Fall	Geschl.	Geboren	Diagnose, Bemerkungen
PA	P09/1003	Männlich	1964	Pleomorphes Adenom, Gl. parotis, Rezidiv
	P09/1706	Männlich	1954	Pleomorphes Adenom, Gl. submandibularis
	P09/2150	Weiblich	1983	Pleomorphes Adenom, Gaumen
	G10/3553	Männlich	1956	Pleomorphes Adenom, Gl. parotis
	G10/3285	Männlich	1935	Pleomorphes Adenom, Gl. parotis
EMC	P10/308	Männlich	1943	Epithelial-myotheliales Karzinom, Nasenhaupthöhle
	P10/914	Männlich	1932	Epithelial-myotheliales Karzinom, Gl. parotis
BCA	P07/754	Weiblich	1938	Basalzelladenom, Gl. parotis
ACC	6153/06			Adenoid-zystisches Karzinom, Mundschleimhaut
	P10/115	Männlich	1942	Adenoid-zystisches Karzinom, Vestibulum Sinus maxillaris, neurale Invasion
MEC	P10/285	Männlich	1961	Mukoepidermoidkarzinom, Gl. parotis, G3, angioinvasiv, DCIS

2.2 Methode

2.2.1 Schnittherstellung

4µm dünne Schnitte wurden mit dem Rotationsmikrotom (Micron, Walldorf, Deutschland) hergestellt, in ein auf 55°C erhitztes Wasserbad zur Schnittstreckung überführt und anschließend auf Objektträger (UltraFrost, Langenbrinck, Deutschland) aufgezogen. Die Trocknung erfolgte im Trockenschrank bei 56°C. Des Weiteren wurde das zur Fixierung verwendete Paraffin aus den Schnitten herausgelöst. Dazu wurden die Objektträger zunächst für zweimal fünf Minuten in ein Xylolbad eingetaucht und anschließend in Alkoholtauchbädern mit Konzentrationen von 99% (zweimal fünf Minuten) und 95% (drei Minuten) rehydriert. Zur Entfernung des Alkohols wurden die Schnitte abschließend fünf Minuten in destilliertem Wasser geschwenkt.

2.2.2 Antigendemaskierung

Die Immunfluoreszenz beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörperreaktion. Antikörper binden hierbei spezifisch an die zu untersuchenden Proteinstrukturen des Zielgewebes. Durch die Fixation und Einbettung der Gewebeproben in Paraffin kann es zur Maskierung spezifischer Epitope der Proteinmakromoleküle kommen, somit verändert sich die Antigenität der Proben. Für ein unverfälschtes Färbemuster ist eine Renaturierung der Gewebeproben notwendig. Durch die Hochtemperaturerhitzungsmethode kommt es zur Antigendemaskierung und folglich zu einer Verbesserung der immunzytochemischen Signale (Buchwalow et al. 2006). Die Schnitte werden also vor der Immunfluoreszenzfärbung vorbehandelt. Hierzu werden die Objektträger zunächst in eine Glasküvette mit 10-mM-Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 gestellt. Anschließend kommt die Glasküvette mit den Schnitten für 35 Minuten in einen Dampfgerar (Braun, Deutschland), der das Gewebe auf 90°-110° erhitzt. Danach werden die Schnitte für einige Minuten durch Wasserkühlung auf Raumtemperatur abgekühlt. Durch Umfahren des gewebehaltigen Bereiches des Objektträgers mit dem DAKO Papp-Pen, wird das Austreten von Flüssigkeit bei der späteren Färbung verhindert und der für die Immunfluoreszenzfärbung wichtige Bereich gekennzeichnet.

Die Vorbehandlung aller Schnitte wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (2x 5 min)
2. Rehydratisierung in 100% Ethanol (2x 5 min), anschließend in 95% Ethanol (1x 3 min)
3. Vollständige Alkoholentfernung durch Spülen in destilliertem Wasser
4. Antigendemaskierung:
 - a) Spülung der Schnitte in Citratpuffer (pH 6,0)
 - b) Erhitzung im Steamer für 35 min auf zirka 95°C
 - c) Abkühlung auf Raumtemperatur im Wasserbad
 - d) Umfahren des Gewebes mit dem Dako Pap-Pen

2.2.3 Antikörper

Nachfolgend sind die in dieser Studie verwendeten Antikörper aufgelistet (Tabelle 3).

Tabelle 3. Primärantikörper

Immunogen	Art	Verdünnung	Klon	Isotyp	Firma
K 5/6	monoklonal, Maus	1:50		IgG1	Dako
K 5	polyklonal, Kaninchen	1:100		IgG3	Medac
K 14	monoklonal, Maus	1:300		IgG3	Dianova
K 8/18	monoklonal, Maus	1:50	5D3	IgG1	SIGMA
K 18-FITC	monoklonal, Maus; FITC- konjugiert	1:25	CY-90	IgG2	SIGMA
SMA	polyklonal, Kaninchen	1:200			Abcam
K 10	monoklonal, Maus	1:50	DE- K10	IgG1	Dako
Vimentin	monoklonal, Maus	1:100	V9	IgG1	Dako

Tabelle 4. Sekundärantikörper

Antikörper	Fluorochrom/Farbe	Verdünnung	Firma
Ziege-anti-Maus (GAM) geg. IgG	Cy3 / rot	1:200	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen (GAR) geg. IgG	Alexa-Fluor-647 / pink	1:200	Invitrogen
Ziege-anti-Kaninchen (GAR) geg. IgG	Cy3 / rot	1:200	Dianova
Ziege-anti-Maus (GAM)	Alexa Fluor ® 488 / grün	1:100	Molecular Probes
Ratte-anti-Maus (RAM) biotinyliert IgG3		1:25	Pharmingen
Streptavidin	Alexa Fluor 488 / grün	1:200	Molecular Probes
Streptavin	Dylight 549	1:50	Dianova

2.2.4 Antigennachweis in der Immunfluoreszenztechnik

Bei der multiplen Immunfluoreszenzmarkierung ist es möglich, verschiedene Antigene in ein und derselben Zelle zeitgleich darzustellen. Dabei können sich die Antigene sogar im gleichen Zellkompartiment befinden (Buchwalow et al. 2006). Zur Detektion der Antigene in Schnittpräparaten gibt es zwei grundlegende Techniken, die als direkte und indirekte Methode bezeichnet werden.

Bei der direkten Methode wird ein Antikörper in nur einem Färbeschritt mit einem Marker (z.B. Fluorophor) inkubiert. Dieser konjugierte Antikörper bindet direkt an das gesuchte Antigen im Schnitt, was fluoreszenzmikroskopisch sichtbar wird.

Bei der indirekten Methode wird hingegen zunächst ein unkonjugierter Primärantikörper auf den Schnitt aufgetragen. Dieser bindet an das entsprechende Antigen. In einem zweiten Schritt wird ein bereits fluorophor-markierter Sekundärantikörper, der sich gegen den Primärantikörper richtet, hinzugefügt. Der entstehende Antigen-Antikörperkomplex kann auch hier mit dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden (Buchwalow und Böcker 2010).

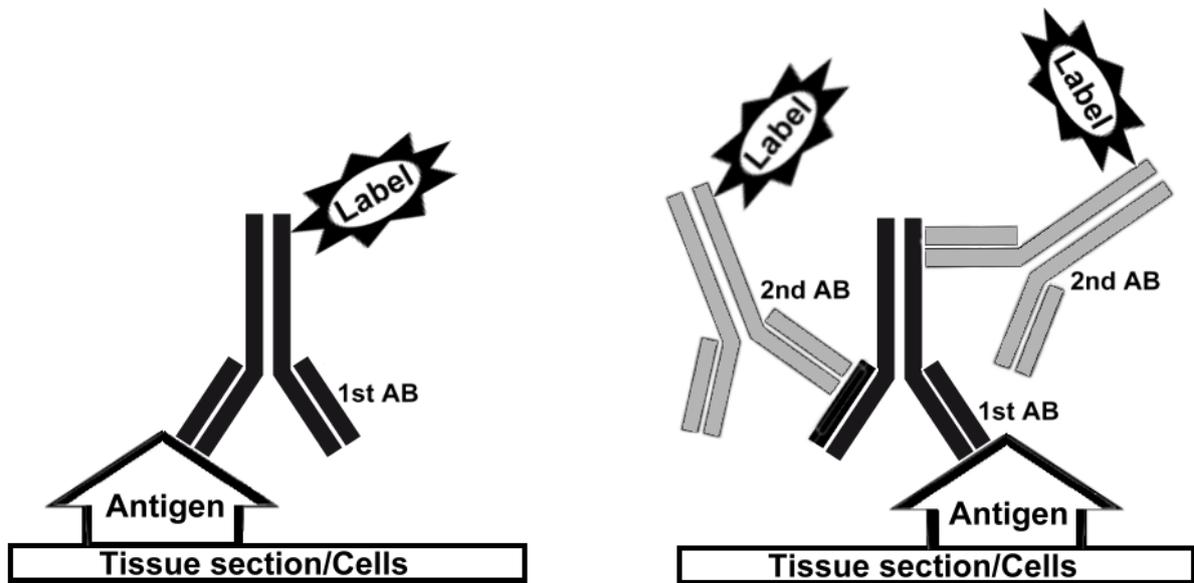


Abb.2: Direkte (l.) und indirekte (r.) Immunfluoreszenztechnik. Aus: *Immunhistochemistry: Basics and Methods*. Buchwalow und Böcker. 2010.

Bei den Versuchen wurden simultan die direkte Methodik für die Keratine K8/18 und die indirekte Technik für Antikörper gegen K5/6 und SMA verwendet.

Besondere Aufmerksamkeit musste bei den Dreifachmarkierungen auf die Auswahl der verwendeten Antikörper gelegt werden, um Kreuzreaktionen der Primärantikörper der ersten Stufe mit Sekundärantikörpern der zweiten Stufe zu vermeiden. Daher wurden bei der indirekten Färbetechnik immer Primärantikörper aus zwei verschiedenen Tierspezies, dem Kaninchen und der Maus, verwendet. Die Sekundärantikörper stammten beide aus der Ziege und waren gegen die spezifische Tierspezies des Primärantikörpers unterschiedlich konjugiert. So kamen Sekundärantikörper der Kombinationen Goat anti Rabbit und Goat anti Mouse zum Einsatz.

2.2.5 Färbemethodik

Als grundlegende Immunfärbung dieser Arbeit ist eine Triplefärbung, bestehend aus den markierten Antikörpern gegen die Zytokeratine K5 und K8/18, sowie gegen SMA anzusehen. Da die verschiedenen Läsionen zum Teil in unterschiedliche Zelllinien differenzieren, wurden darüber hinaus auch andere linienspezifische Antikörper angewendet. Hierbei ist vor allem der Nachweis des mesenchymalen Markers Vimentin und des squamösen Markers Keratin 10 zu nennen. Neben den Triplefärbungen wurden auch Doppelfärbungen durchgeführt.

Die Lösungen der Primär- und Sekundärantikörper wurden entsprechend den Bestimmungen mit PBS-Puffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die für die jeweiligen Antikörper verwendeten

Konzentrationen sind den oben aufgeführten Tabellen (Primär- und Sekundärantikörper) zu entnehmen.

Sämtliche Fälle wurden anhand von Hämatoxylin-Eosin-Färbungen untersucht. Diese Standardfärbemethode dient der grundsätzlichen histologischen Beurteilung der Präparate und wird mit Hilfe eines Färbeautomaten durchgeführt (Tissue Stainer COT 20 der Firma medite).

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Folgende Arbeitsschritte laufen im Automaten ab:

1. Xylol 4x 1,15 min
2. 99% Ethanol 2x 1,15 min
3. 70% Ethanol 1x 1,15 min
4. Aqua dest. 1x 1,15 min
5. Hämatoxylin nach Meyer 4x 1,15 min
6. Fließend wässern 2x 1,15 min
7. Eosinlösung 2x 1,15 min
8. Aqua dest. 1x 1,15 min
9. 70% Ethanol 1x 1,15 min
10. 99% Ethanol 3x 1,15 min
11. Xylol 2x 1,15 min

Zusammensetzung der Lösungen:

Tabelle 5. Eosinlösung

Reagenz	Menge
Eosin-Stammlösung (10 g Eosin auf 1000 ml 70%igem Ethanol)	100 ml
70%iges Ethanol	500 ml
Eisessig	0,2 ml

Tabelle 6. Hämatoxylin nach Meyer

Reagenz	Menge	Bemerkungen
Hämatoxylin	4 g	in ca. 3000 ml Aqua dest. lösen
Natriumjodat	0,8 g	unter Erwärmen zugeben
Aluminium-Kaliumsulfat	200 g	unter Erwärmen zugeben
Chloralhydrat	200g	unter Erwärmen zugeben
krist. Citronensäure	4 g	unter Erwärmen zugeben
Aqua dest.	auf 4000 ml	auffüllen

Von den gefärbten Präparaten wurden nach lichtmikroskopischer Begutachtung Fotos erstellt.

Geeignete Fälle wurden anschließend mit den Immunfluoreszenzlösungen gefärbt. Als Standardfärbung diente hier eine Triplefärbung mit Darstellung der basalen Keratine K5/6, der luminalen Keratine K8/18, sowie des myoepithelialen markers SMA.

Im ersten Färbeschritt wurden hierbei die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur mit den Primärantikörpern gegen K 5 und gegen K 8/18 inkubiert. Nach ausgiebigem Spülen mit PBS-Puffer für dreimal fünf Minuten wurden die spezifischen, mit Fluorophoren konjugierten Sekundärantikörper aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation wurde auch hier wieder für dreimal fünf Minuten mit PBS-Puffer gewaschen.

Als zweite Färbestufe folgte der Nachweis von SMA. Die Schnitte wurden hierfür zunächst für 15 Minuten mit 10% Rabbit-Serum behandelt. Es folgte die einstündige Inkubation mit einem biotinierten Primärantikörper gegen SMA, sowie die anschließende Waschung mit PBS-Puffer für dreimal fünf Minuten. In einem weiteren Färbeschritt wurde der fluorophorkonjugierte Sekundärantikörper aufgetragen. Nach 30 Minuten wurde erneut dreimal mit PBS-Puffer gewaschen.

Für die folgende Kerngegenfärbung wurden die Schnitte für 20 Sekunden mit 1:10000 PBS-verdünntem DAPI inkubiert. Auch hiernach wurde wieder dreimal fünf Minuten lang mit PBS gespült.

Im letzten Schritt wurde, zur Fixierung der Schnitte, 4% Formalinlösung für drei bis fünf Minuten aufgetragen. Es folgten drei letzte Spülungen mit PBS-Puffer.

Zur Eindeckung der Schnitte wurde Vecktashield (Linaris, Deutschland) verwendet, wovon jeweils zwei Tropfen pro Schnitt mit einem Deckgläschen (Langenbrinck, Deutschland) abgedeckt wurden.

Als Grundlage für alle Färbereien diene folgendes Basisprotokoll:

Immunmarkierung

1. Primärantikörper:
Anti-CK5 (Rabbit polyclonal, 1:100) + Anti-Ck8/18 (Mouse IgG1, 1:50)
über Nacht (+ 2Std) bei Raumtemperatur
2. PBS-Puffer 3x 5 min
3. Sekundärantikörper:
Alexa-Fluor-647-Goat-anti-Rabbit IgG (1:100) + Alexa-Fluor-488-GAM IgG (1:100)
1Std
4. PBS-Puffer 3x 5 min
5. 10% Rabbit-Serum 15 min
6. Primärantikörper:
Anti-SMA-biotin (1:7) 1Std
7. PBS-Puffer 3x 5 min
8. Sekundärantikörper:
Streptavin DyLight 549 conjugate (1:50) 30 min
9. PBS-Puffer 3x 5 min
10. Kerngegenfärbung:
DAPI (1:10000 auf 5ug/ml mit PBS verdünnt) 20 sek
11. PBS-Puffer 3x 5 min
12. Fixierung:
4% Formalinlösung 3-5 min
13. PBS-Puffer 3x 5 min
14. Eindeckung:
2 Tropfen Vecktashield + Deckgläschen

2.3 Auswertung der Immunfluoreszenzschnitte

Die Analyse der Immunfluoreszenzpräparate erfolgte mit dem Axio Imager (Zeiss, Deutschland). Hierbei handelt es sich um ein modulares Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskop mit Netzwerkanbindung und integrierter Digitalkamera (Axio Cam HR, Zeiss, Deutschland). Zur Darstellung der Fluoreszenzfarbstoffe besitzt das Mikroskop vier unterschiedliche Filteransätze. Die Exzitations- und Emissionsrate bestimmt hierbei die jeweilige Spezifität für das verwendete Fluorophor. Für die Darstellung werden folgende Filteransätze verwendet:

- Filteransatz zur Visualisierung von DAPI, 358nm Exzitation und 461nm Emission
- Filteransatz zur Visualisierung von FITC, 490nm Exzitation und 520nm Emission
- Filteransatz zur Visualisierung von Alexa 647, 650nm Exzitation und 668nm Emission
- Filteransatz zur Visualisierung von Cy3, 552nm Exzitation und 565nm Emission

Angeschlossen wurde das Mikroskop an einen Windows XP Professional-basierten Computer. Zur Erstellung der Fotos und der abschließenden Auswertung wurde die AxioVision-Software (Zeiss, Deutschland) verwendet. Mithilfe dieser Software ist es dem Untersuchenden möglich, bei der Live-Betrachtung des Präparates die vier unterschiedlichen Filteransätze getrennt zu beurteilen und anschließend Kombinationsbilder der verschiedenen Fluorophore mit der Digitalkamera zu erstellen. Zusätzlich kann jedes Fluorophor auch einzeln dargestellt und als Digitalfoto abgespeichert werden. Nach einer anfänglichen mikroskopischen Beurteilung einer jeden Färbung, wurden die Schnitte zunächst mit dem 10x Objektiv begutachtet, um ein grobes Verteilungsmuster der Antigene abschätzen zu können. Anschließend wurde jedes Präparat mäanderförmig mit dem 20x Objektiv untersucht und geeignete Bereiche mit der Digitalkamera aufgenommen. In einigen Fällen wurde eine 40-fache Vergrößerung gewählt, da so die Expression der spezifischen Antigene in den Zellen besser dargestellt werden konnte.

Für die Auswertung wurden Vergleichsbilder hergestellt. AxioVision bietet hier die Möglichkeit, das Kompositionsbild und die Darstellung von einzelnen Antigenen nebeneinander zu stellen. So kann jede einzelne Zelle auf ihre Antigenexpression hin untersucht werden.

2.4 Quantitative Real Time –Polymerase Chain Reaction

Umschriebene Areale von Tumorgewebe wurden manuell mikrodissiziert. Für die Extraktion der RNA vom mikrodissizierten Gewebe wurde das RNeasy FFPE kit (Qiagen, Germany) verwendet. mRNA für Keratine K5, K14, K7, K8, K18 und K10, sowie ACTA2 (alpha 2 smooth muscle actin) wurden mit Hilfe des OneStep RT-PCR kit (Qiagen, Germany) revers transskribiert und amplifiziert. Die RNA-Expression wurde quantifiziert mittels der real time fluorescence detection of amplified cDNA (ABI life technologies StepOne® system) unter Verwendung von MGB-Proben. Die Gen-Expressionen wurden gemittelt zwischen zwei absoluten Messergebnissen (gene of interest / *HPRT* endogenous reference).

3 Ergebnisse

Die Anteile der Antigen-positiven Zellen wurden in Prozent abgeschätzt, wobei Werte von oder unter 5 % als negativ gedeutet wurden. Folgende Einteilung liegt zugrunde:

- <5% = negativ
- + >5% - 20 %
- ++ > 20% – 50 %
- +++ > 50 %

Die Immunfluoreszenzfärbungen werden im Folgenden zur Vereinfachung als isTIF (in-situ Triple-Immunfluorescence) bezeichnet.

3.1 Pleomorphes Adenom (PA)

3.1.1 Pleomorphes Adenom der Mamma

Drei Fälle von pleomorphen Adenomen der Mamma wurden untersucht. Es konnten Differenzierungen der Tumorzellen in glanduläre, myoepitheliale, plattenepitheliale und mesenchymale Richtung beobachtet werden. Die überwiegende Anzahl der Zellen zeigt eine Ko-Expression von Keratin K5/6 und einem der anderen linienspezifischen Marker. Darüber hinaus wurden auch rein K5/6-positive Zellen gefunden, welche sich meist in kleinen Nestern formatieren. In den Fällen 33426/04 und 36373/07 sind mit 90% bzw. 80% nahezu alle neoplastischen Zellen K5/6-positiv.

Glanduläre (K8/18) und myoepitheliale (SMA) Marker sind in mäßigem Umfang in allen Fällen nachweisbar. Es sind sowohl in Differenzierung befindliche, als auch ausgereifte linienspezifische Zellen zu beobachten. Letztere zeichnen sich dadurch aus, dass sie Keratin K5/6 bereits herunter reguliert haben und allein Keratin K8/18, SMA bzw. Vimentin exprimieren.

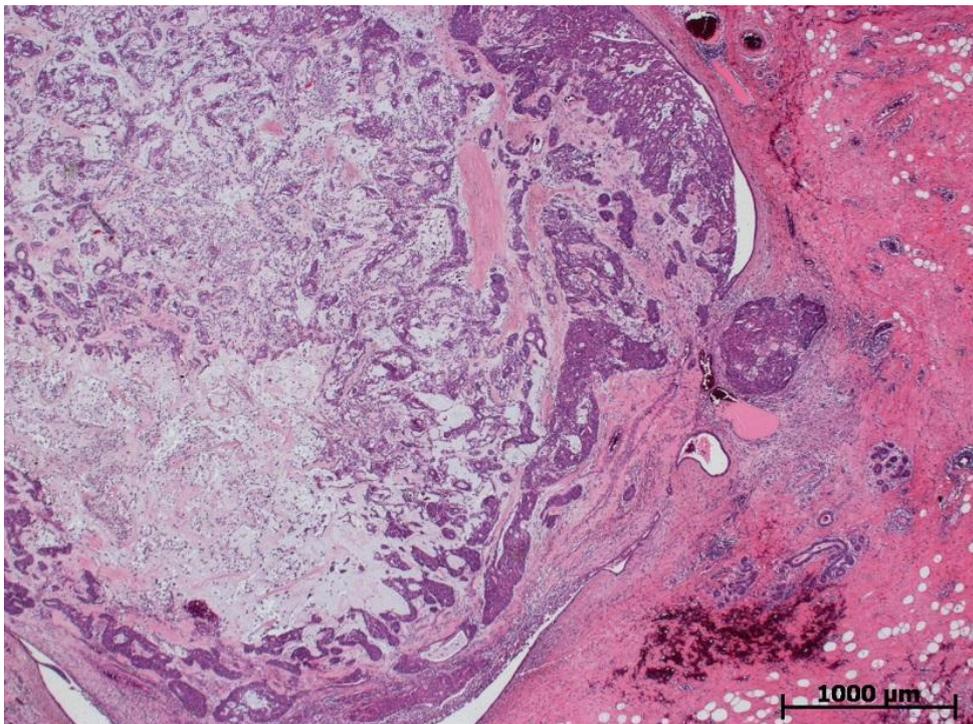


Abb. 3. Pleomorphes Adenom der Mamma. Die H/E-Färbung zeigt die typische chondromyxoid Matrix des Tumors. Im rechten Bildanteil ist normales Mammagewebe zu erkennen.

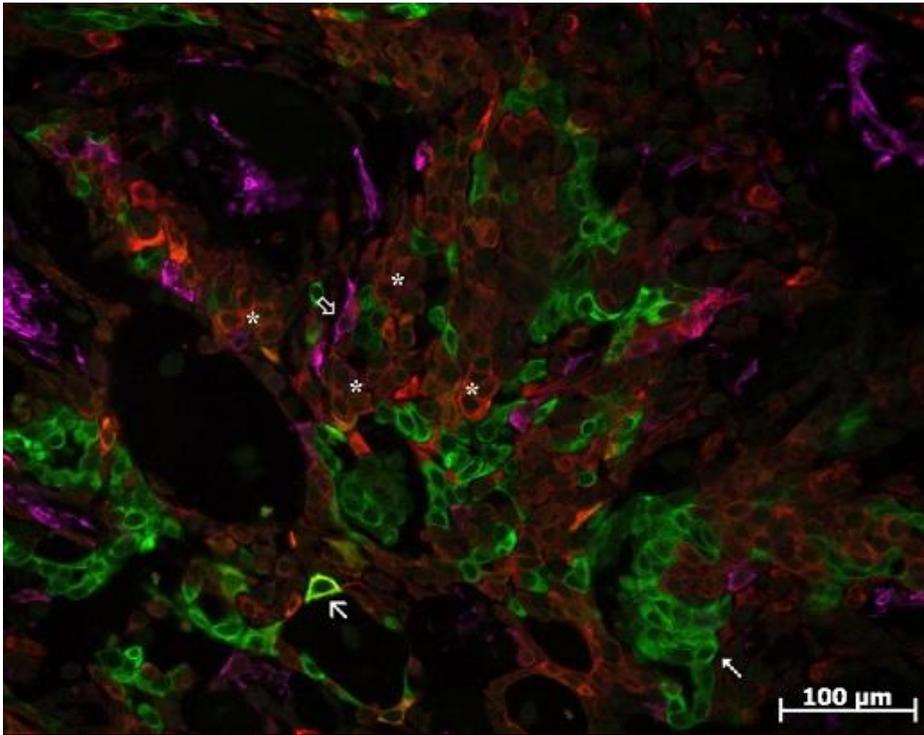


Abb. 4. Pleomorphes Adenom der Mamma. *isTIF*: K5 rot; K7 grün; SMA pink; Es zeigen sich ausschließlich K5 exprimierende Progenitorzellen (Stern), ausgereifte glanduläre Zellen (kleiner Pfeil) mit Expression von K7, sowie intermediäre Zellen mit Expression von zum einen K5 und K7 (großer Pfeil), zum anderen K5 und SMA (doppelter Pfeil).

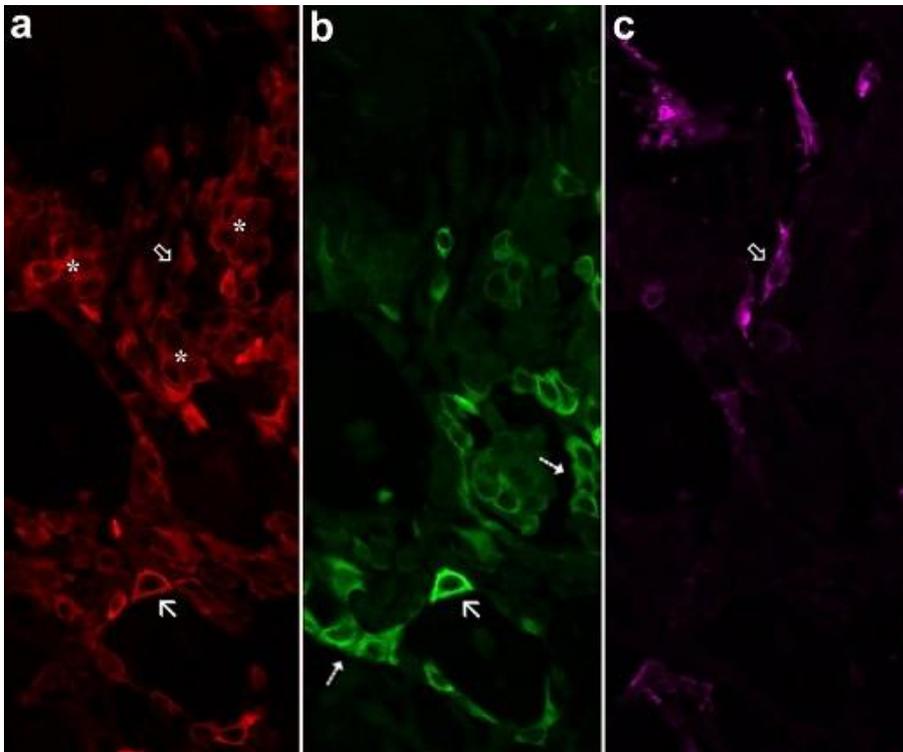


Abb. 5. Pleomorphes Adenom der Mamma. *isTIF*: K5 rot; K7 grün; SMA pink; Reine Progenitorzellen mit alleiniger K5-Expression (Stern), ausgereifte glanduläre Zellen mit ausschließlicher K7-Expression (kleiner Pfeil), intermediäre glanduläre (großer Pfeil), sowie intermediäre myoepitheliale Zellen (doppelter Pfeil).

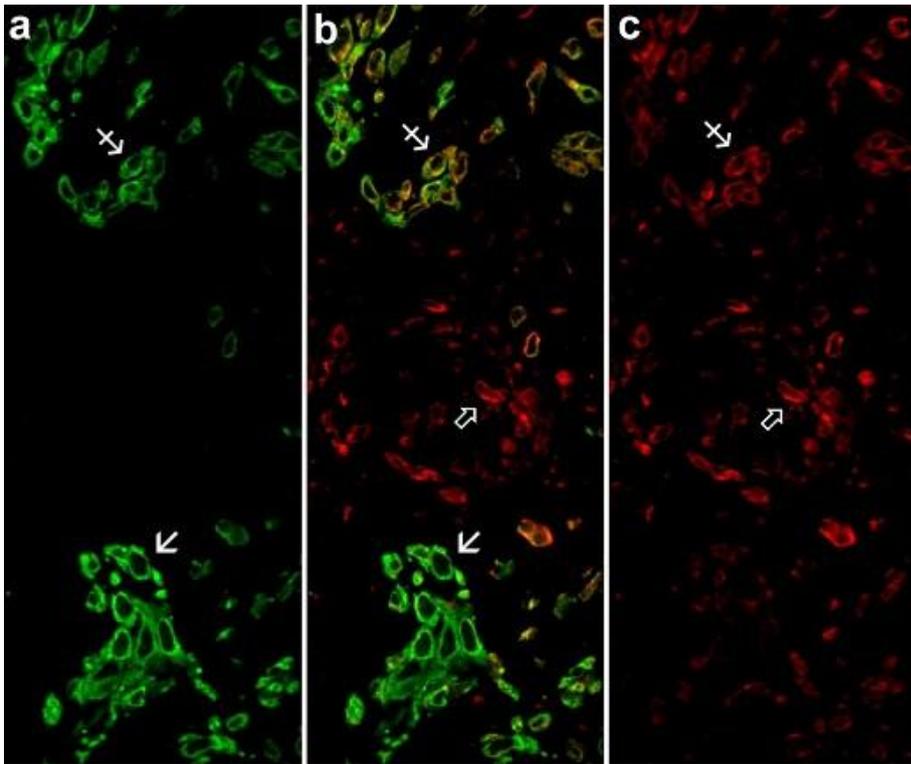


Abb. 6. Pleomorphes Adenom der Mamma. *isTIF*: K14 grün; Vimentin rot; Es zeigen sich sowohl Progenitorzellen (großer Pfeil), als auch intermediäre (gekreuzter Pfeil) und rein chondroide Zellen, mit alleiniger Vimentin-Expression (doppelter Pfeil).

Tabelle 7. Pleomorphes Adenom der Mamma

	Fall	K5/6	K8/18	K10	SMA	Anmerkung
Pleomorphes Adenom	33426/04	+++	+	+	+	Chondroide Matrix, plattenepitheliale Metaplasie, P63 +++ Vimentin +++
	27718/08	++	++	-	+	
	36373/07	+++	++	-	++	Myxoide, chondroosteoide Matrix Vimentin +

3.1.2 Pleomorphes Adenom der Speicheldrüse

Es wurden fünf Fälle von pleomorphen Adenomen der Speicheldrüse untersucht. Die Patienten waren im Alter von 26 bis 75 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 51 Jahre. Vier von fünf Patienten waren männlich. In allen fünf Fällen liegt eine deutliche Expression von K5/6 vor. Dabei weisen in zwei Fällen (P09/1003; P09/1706), mit ca. 90% Positivität, nahezu alle Tumorzellen diese basalen Keratine auf. Die Tumoren sind myoepithelzellreich, was sich in der vermehrten SMA-Expression widerspie-

gelt (ca.40%). Die anderen drei Fälle (P09/2150; G10/3553; G10/3285) ähneln sich in ihrer Keratin K5/6- (ca.30-50%), sowie in ihrer eher mäßigen SMA-Expression (ca. 15%). Es handelt sich bei ihnen um zwei klassische, pleomorphe Adenome der Parotis, sowie um ein pleomorphes Adenom des Gaumens.

Glanduläre Keratine werden in drei der Fälle (P09/1706; P09/2150; G10/3285) mit ca. 60% deutlich exprimiert. Morphologisch zeigen sich hier dazu passend in der konventionellen H/E-Färbung viele drüsige Zellverbände. Diese sind ebenfalls im Fall G10/3553 zu sehen, obgleich hier die K8/18-Expression mit ca. 20% verhältnismäßig gering ist. Der Fall P09/1003 zeigt ein überwiegend basalzelliges Zellbild, wobei die glandulären Keratine nur fokal (ca. 5%) zu finden sind.

Vimentin ist in allen untersuchten Fällen mit 30-40% etwa gleich stark ausgeprägt und verdeutlicht die teilweise chondroide Differenzierung der pleomorphen Adenome. Es sind sowohl Mesenchymzellen mit reiner Vimentin-Expression, als auch mit Ko-Expression von Vimentin und K5/6 zu finden. Keratin K10 ist in vier Fällen negativ. Lediglich Fall G10/3285 zeigt eine fokale (ca. 10%) Expression.

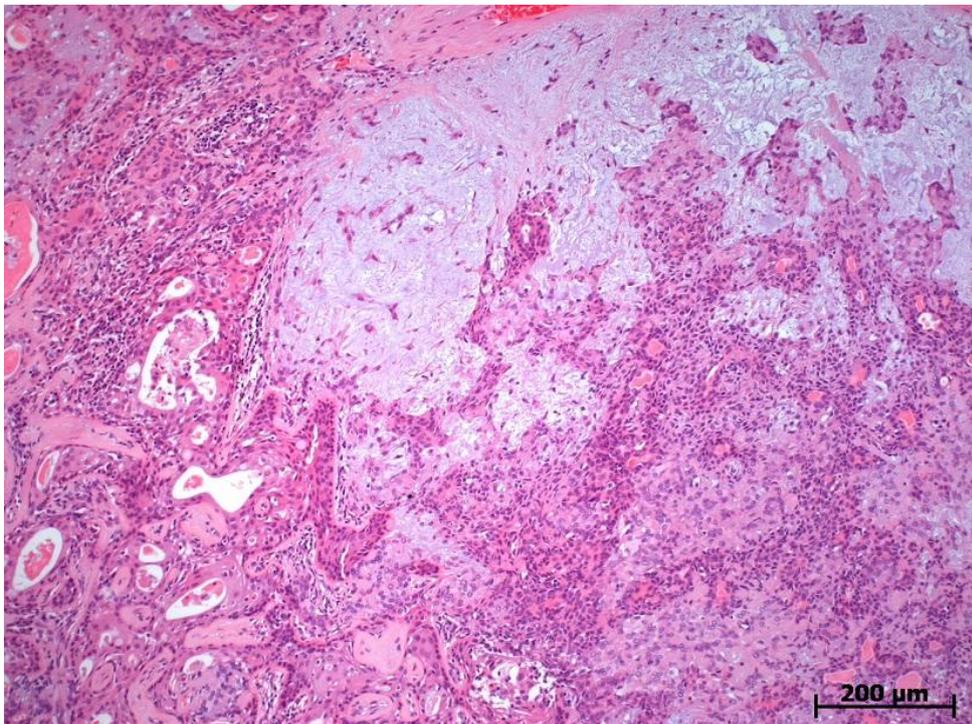


Abb. 7. Pleomorphes Adenom der Speicheldrüse. H/E-Färbung mit epithelialen und myoepithelialen Proliferaten, sowie typischer chondromyxoider Matrix des Tumors.

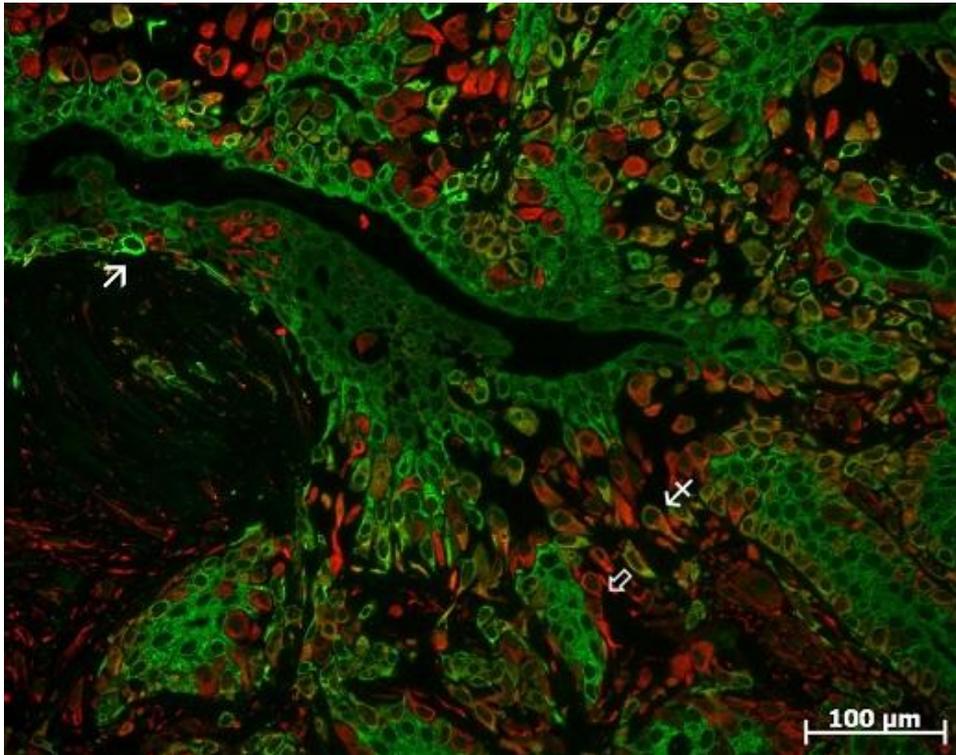


Abb. 8. Pleomorphes Adenom der Speicheldrüse. isTIF: K14 grün; Vimentin rot; Zu erkennen sind rein K14-positive Progenitorzellen (großer Pfeil), intermediäre Zellen (gekreuzter Pfeil), sowie rein Vimentin-positive Zellen (doppelter Pfeil).

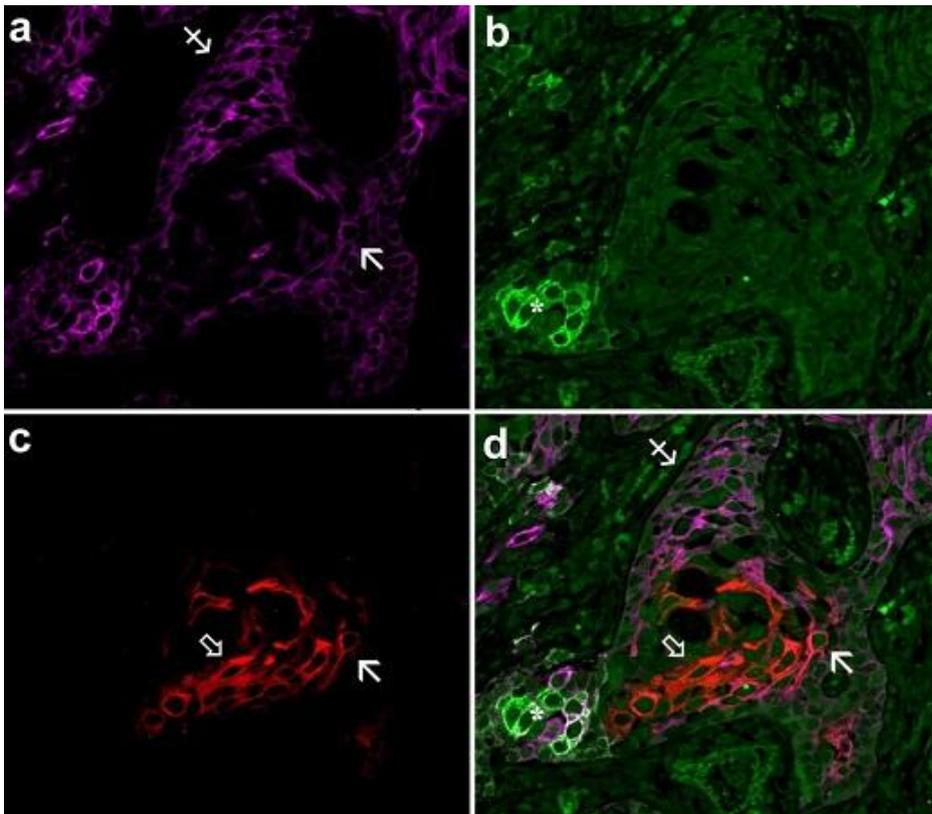


Abb. 9. Pleomorphes Adenom der Speicheldrüse. isTIF: K5 pink; K14 grün; K10 rot; Es zeigen sich reichlich K5-positive Progenitorzellen (gekreuzter Pfeil), sowie wenige mit gleichzeitiger Expression von K14 (Stern). Im Inneren des Verbandes liegt eine plattenepitheliale Differenzierung vor. Es finden sich sowohl intermediäre Zellen mit Expression von K5 und K10 (großer Pfeil), als auch Zellen mit reiner K10-Expression (doppelter Pfeil).

Tabelle 8. Pleomorphes Adenom der Speicheldrüse

	Fall	K5/6	K8/18	K10	SMA	Anmerkung
Pleomorphes Adenom	P09/1003	+++	+	-	++	Gl. parotis, myoepithelzellreiche Variante, fokal myxoid + plattenepitheliale Metaplasie, Vimentin: ++
	P09/1706	+++	+++	-	++	Gl. submandibularis Vimentin: ++
	P09/2150	+++	+++	-	+	Gaumen Vimentin: ++
	G10/3553	++	+	-	+	Gl. parotis, chondromyxoid, Vimentin: ++
	G10/3285	++	+++	+	+	Gl. parotis, chondromyxoid, Vimentin: ++

3.2 Adenomyoepitheliale Tumoren (AMT)

3.2.1 Adenomyoepithelialer Tumor der Mamma

Bei den adenomyoepithelialen Tumoren wurde jeweils eine maligne und eine benigne Variante untersucht. In beiden Fällen handelt es sich um weibliche Patienten im Alter von 65 bzw. 67 Jahren.

Das maligne myoepitheliale Karzinom (3406/06) weist eine überwiegend myoepitheliale Differenzierung auf. Mehr als 90% der Zellen exprimieren SMA, 60% K14. Die basalen Keratine K5/6 zeigen sich hingegen nur bei ca. 5% der Tumorzellen. K8/18 ist in den Stromazellen nicht nachweisbar, die wenigen drüsigen Verbände exprimieren es hingegen zu 90%.

Der zweite Fall (15233/08) stellt sich als klassischer benigner, biphasisch differenzierter AMT dar. Die neoplastischen Zellen sind überwiegend Keratin K5/6-positiv (ca. 60%). Sowohl K14, als auch SMA werden von ca. 40-50% der Zellen exprimiert, was eine nicht unerhebliche myoepitheliale Differenzierung des Tumors verdeutlicht. Die drüsigen Formationen, mit überwiegend tubulären Strukturen, weisen im Vergleich zu den übrigen Tumorzellen nur fokal K5/6 auf. Mehr als 90% dieser Zellen exprimieren die glandulären Keratine K8/18. Es handelt sich somit um reifes glanduläres Gewebe.

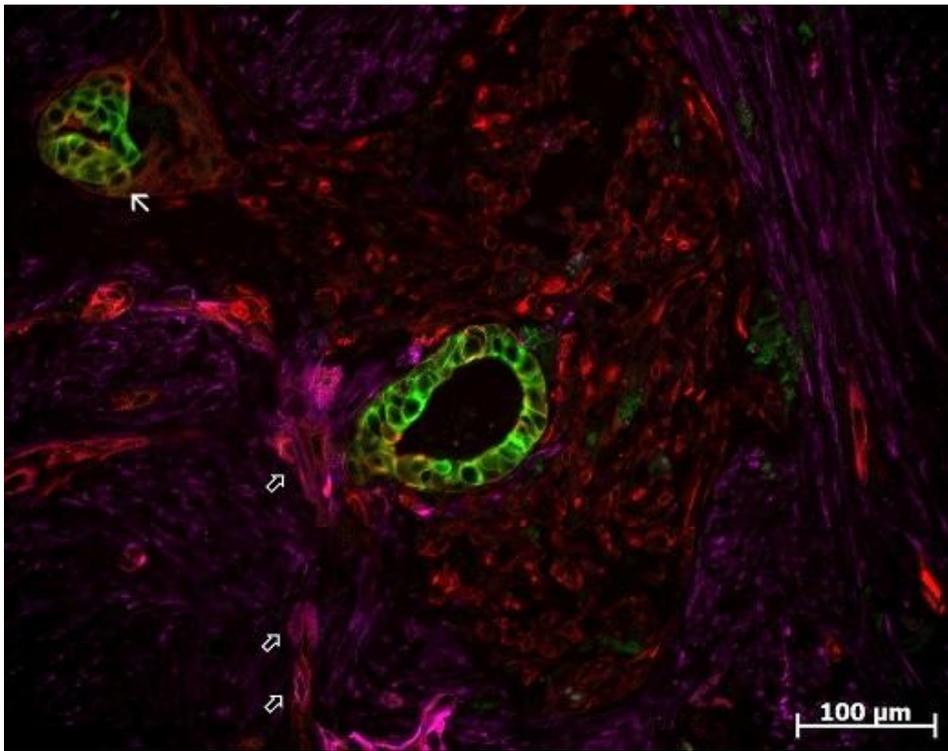


Abb. 10. Adenomyoepithelialer Tumor der Mamma, benigne mit biphasischer Differenzierung. *isTIF*: K5 rot; K7 grün; SMA pink; Der Tumor weist eine Differenzierung in myoepitheliale und glanduläre Richtung auf. Es zeigen sich entsprechend Intermediärzellen mit Expression von K5 und SMA (doppelter Pfeil), sowie K5- und K7-positive Intermediärzellen (großer Pfeil).

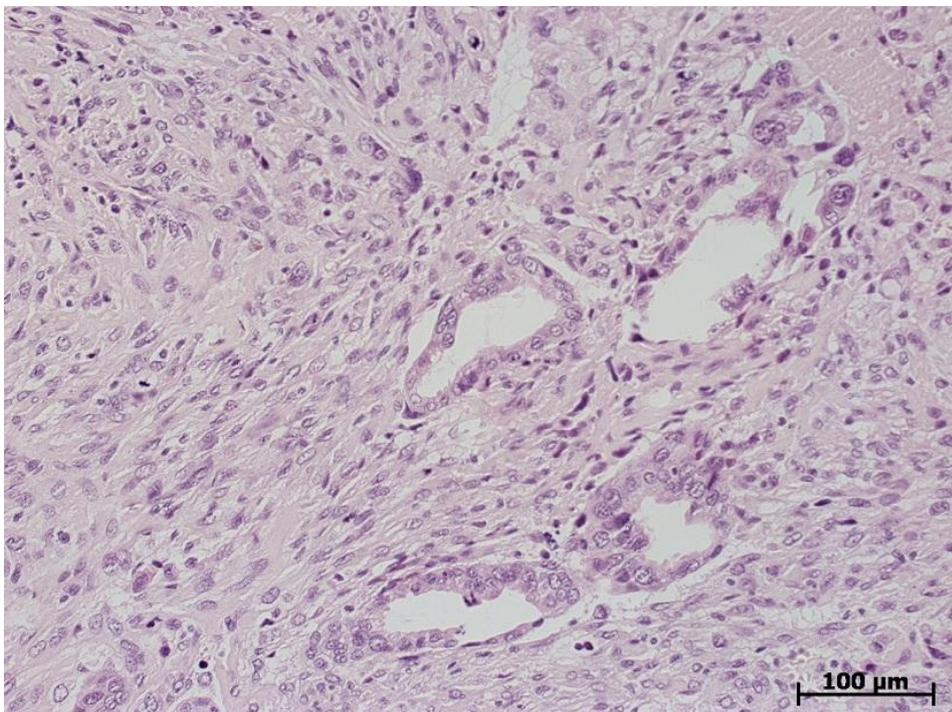


Abb. 11. Myoepitheliales Karzinom (malignes Adenomyoepitheliom) der Mamma. H/E-Färbung. Zahlreiche spindelförmige bis polygonale Myoepithelzellen, dazwischen vereinzelte glanduläre Strukturen.

Tabelle 9. Adenomyoepithelialer Tumor der Mamma

	Fall	K5/6	K14	K8/18	SMA	Anmerkung
Adeno- myoepithelialer Tumor	3406/06	+	++	Gland: +++ Myoethel: -	Gland: - Myoethel: +++	Myoepitheliales Karzinom, G3, überwiegend myoepitheliale Differenzierung, Vimentin: +++ (Stroma), P63 +++
	15233/08	++	++	Gland: +++ Myoethel: -	++	AMT, benigne, biphasische Differenzierung, P63 +++

3.2.2 Epithelial-myotheliales Karzinom der Speicheldrüse

Es wurden zwei Fälle von epithelial-myothelialen Karzinomen (EMC) der Speicheldrüse untersucht. In beiden Fällen handelt es sich um männliche Patienten im Alter von 67 und 78 Jahren. Beide Neoplasien erwiesen sich als klassische, biphasisch differenzierte EMCs. 20-40% der Tumorzellen exprimieren die basalen Keratine K5/6, mehr als 90% SMA. Die fokalen drüsigen Zellverbände zeigten keine SMA-, dagegen jedoch eine deutliche K8/18-Expression.

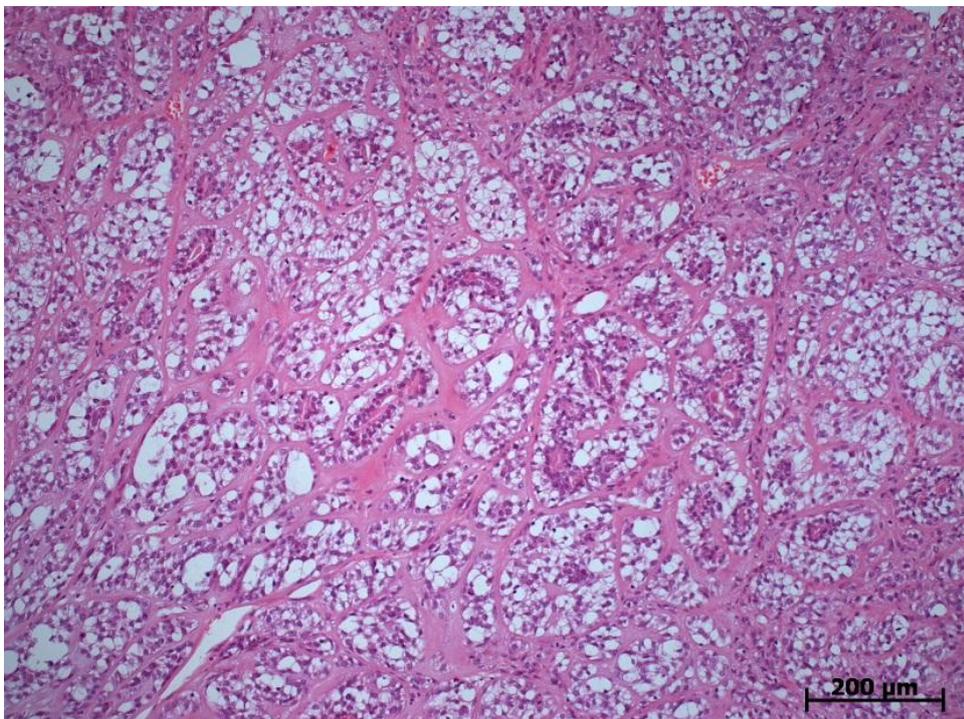


Abb. 12. Epithelial-myotheliales Karzinom der Speicheldrüse. H/E-Färbung mit biphasischer Differenzierung, wobei der glanduläre Anteil des Tumors sich tubulär darstellt. Der myoepitheliale Anteil fällt durch das klare Zytoplasma der Zellen auf.

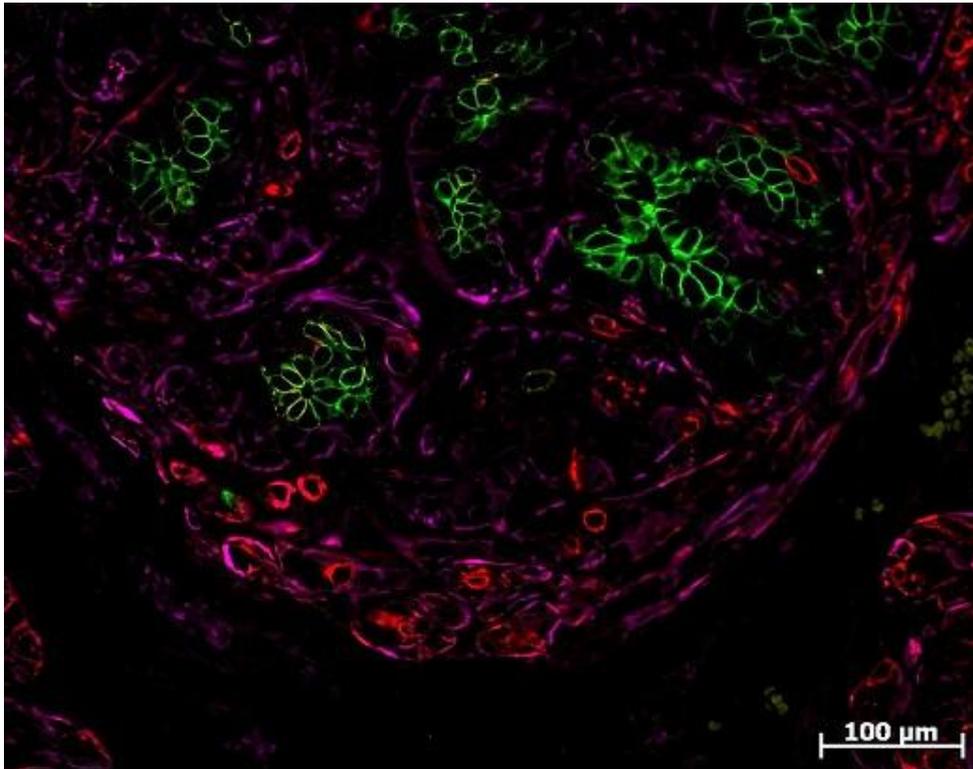


Abb. 13. Epithelial-myotheliales Karzinom der Speicheldrüse. IsTIF:K5 rot; K7 grün; SMA pink; Es zeigen sich drüsige tubuläre Zellverbände mit Expression von K7, welche von SMA-positiven Myoepithelzellen umgeben sind. Vor allem in der Peripherie finden sich reichlich K5-positive Progenitorzellen, sowie myoepitheliale Intermediärzellen mit Expression von K5 und SMA.

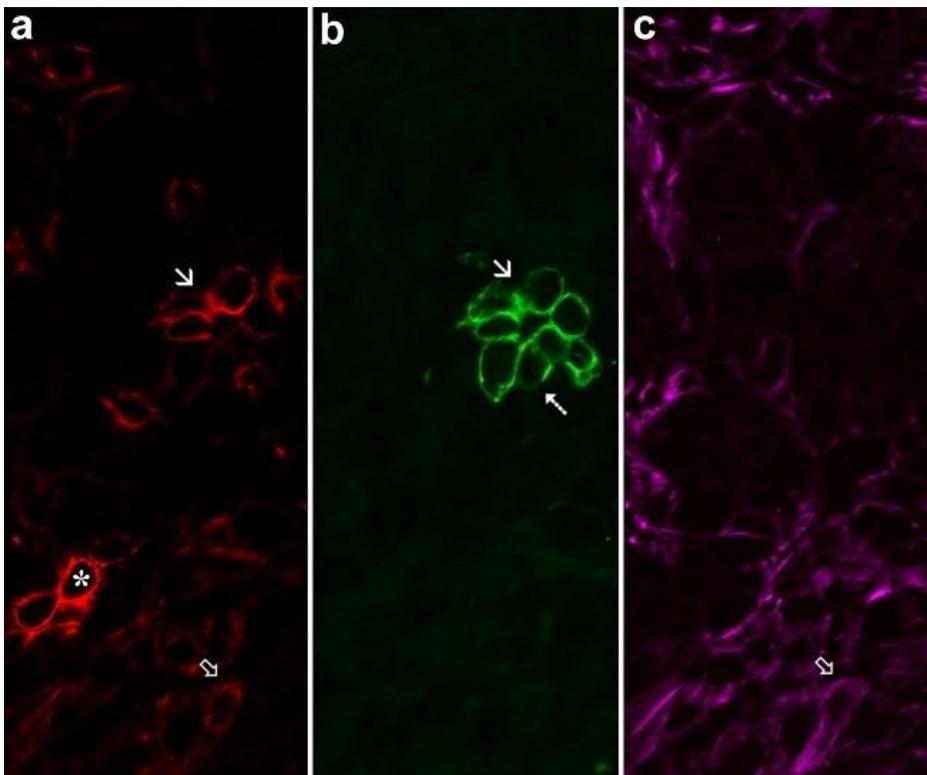


Abb. 14. Epithelial-myotheliales Karzinom der Speicheldrüse. IsTIF:K5 rot; K7 grün; SMA pink; Neben Progenitorzellen mit reiner K5-Expression (Stern), zeigen sich Intermediärzellen mit Expression von K5 und SMA (doppelter Pfeil), bzw. K5 und K7 (großer Pfeil), sowie glanduläre Zellen mit alleiniger K7-Expression (gestrichelter Pfeil).

Tabelle 10. Epithelial-myotheliales Karzinom der Speicheldrüse

	Fall	K5/6	K8/18	SMA	Anmerkung
Epithelial-myotheliales Karzinom	P10/914	+	Gland: +++	Gland: - Myothenel: +++	Biphasische Differenzierung, myotheliale Expansion
	P10/308	++	Gland: +++ Myothenel: +	Gland: - Myothenel: +++	Biphasische Differenzierung

3.3 Basalzellenadenom (BCA)

3.3.1 Basalzellenadenom der Mamma

Das Basalzellenadenom ist ein extrem seltener Tumor der Mamma. Für die Studie lag uns ein Fall vor. Die uniformen Basalzellen des scharf umschriebenen Tumors formatieren sich überwiegend in trabekulären Zellverbänden. Dabei ist eine Schichtung von Zellen mit unterschiedlicher Proteinexpression zu beobachten. Keratin K14 überwiegt in den neoplastischen Zellen mit ca. 70% Positivität deutlich gegenüber Keratin K5/6 (ca. 10%). In der äußeren Zellschicht stellt sich eine Ko-Expression von K14 und SMA dar. In der inneren Schicht liegen wenige intermediäre Zellen mit Expression von K5/6, bzw. K14 und K8/18, sowie fokale rein glanduläre Zellen, welche nur noch Keratin K8/18 aufweisen. In diesen Bereichen mit drüsiger Differenzierung ordnen sich die Zellen in Form duktaler Lumina an.

Tabelle 11. Basalzellenadenom der Mamma

	Fall	K5/6	K14	K8/18	SMA	Anmerkung
Basalzellenadenom	35641/06	+	+++	++	Myothenel: pos	

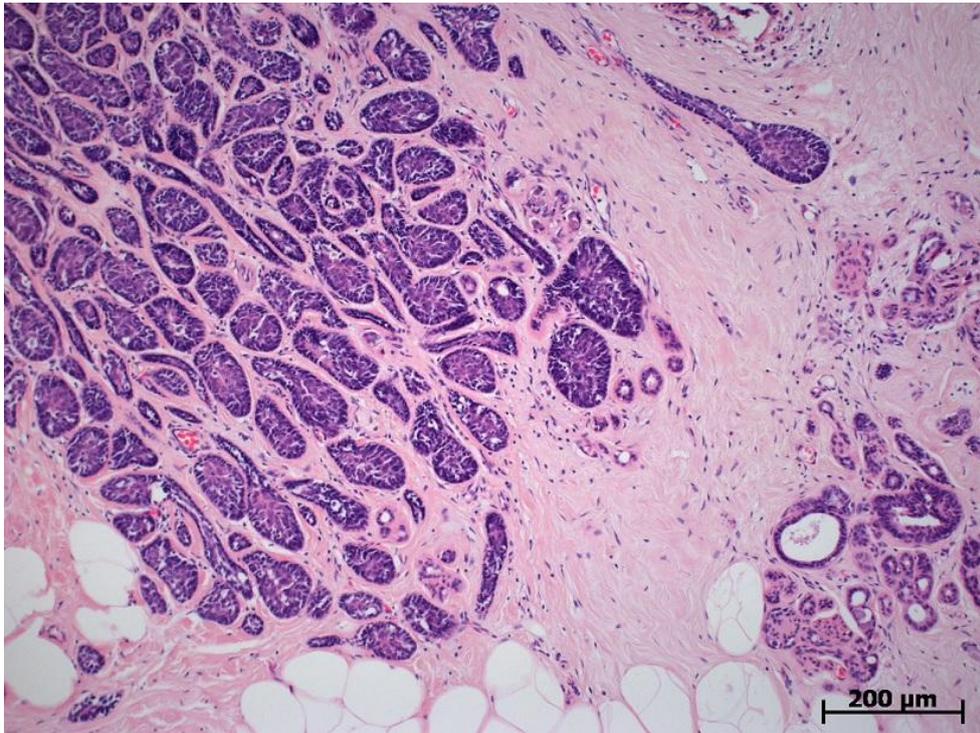


Abb. 15. Basalzelladenom der Mamma. H/E-Färbung mit charakteristischen, trabekulär angeordneten Basalzellen. In der rechten Bildhälfte ist normales Mammagewebe erkennbar.

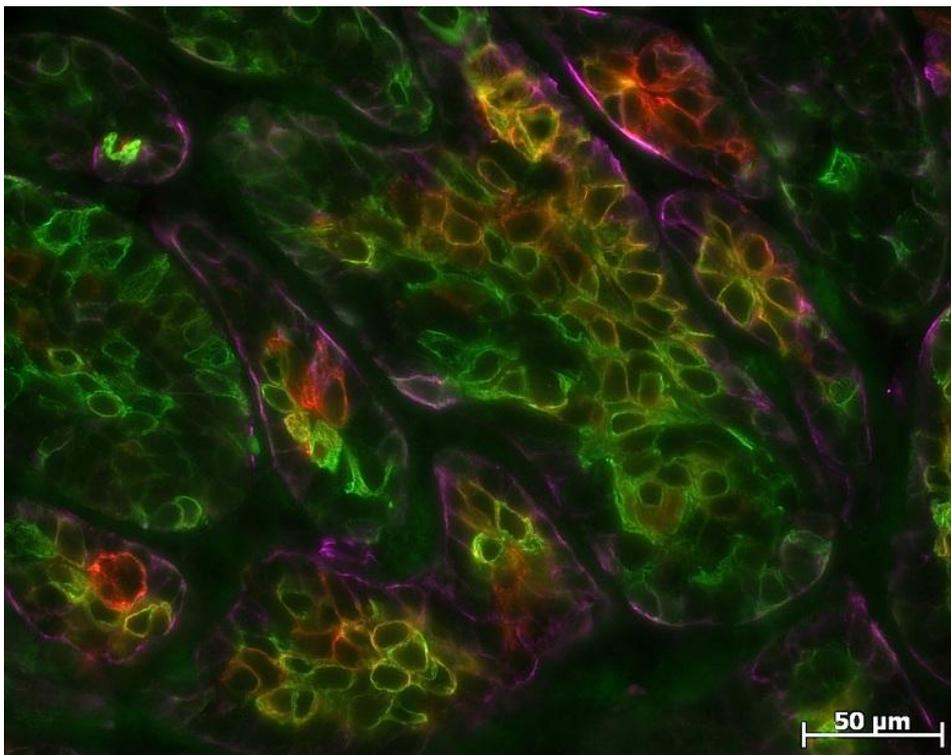


Abb. 16. Basalzelladenom der Mamma. iSTIF: K14 grün; SMA pink; K18 rot;

3.3.2 Basalzelladenom der Speicheldrüse

Das BCA der Speicheldrüse wurde bei einer 69 jährigen Patientin beobachtet. Der Tumor war in der Glandula parotis lokalisiert und enthielt zahlreiche Satellitenknoten.

Mehr als 90% der trabekulär angeordneten neoplastischen Zellen exprimieren die basalen Keratine K5/6. Überwiegend in der Außenzone des Tumors finden sich Myoepithelzellen, die zu 90% SMA aufweisen. Die inneren Schichten aus glandulären Zellen sind zu über 90% K8/18-positiv. Basal- und Myoepithelzellen exprimieren diese glandulären Keratine hingegen nicht. Eine Ko-Expression von basalen Keratinen und linienspezifischen Proteinen ist häufig zu beobachten.

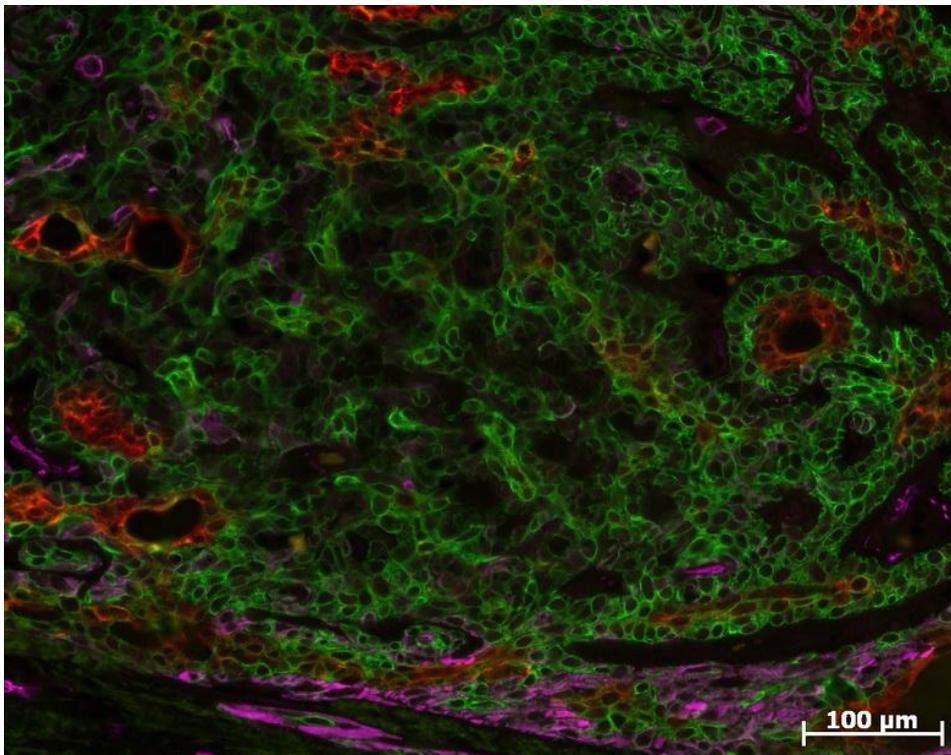


Abb. 17. Basalzelladenom der Speicheldrüse. *isTIF*: K5 grün; K7 rot; SMA pink.

Tabelle 12. Basalzelladenom der Speicheldrüse

	Fall	K5/6	K8/18	SMA	Anmerkung
Basalzelladenom	P07/754	+++	Gland: +++ Myoethel: -	Myoethel: +++	

3.4 Adenoid-zystisches Karzinom (ACC)

3.4.1 Adenoid-zystisches Karzinom der Mamma

Drei Fälle wurden als adenoid-zystischen Karzinoms der Mamma diagnostiziert. Alle Patienten waren weiblich und durchschnittlich 53 Jahre alt.

Ein Fall (18251/08) stellt sich überwiegend kribriform und solide dar. Im epithelialen Anteil des Tumors exprimieren mit über 90%, nahezu alle Zellen die basalen Keratine K5/6. Im basal-myothelialen Anteil sind es 60%. In einem sehr ähnlichen Verhältnis stellt sich die K5/6-Expression in den anderen beiden Fällen dar. Auch hier zeigen sich die basalen Keratine am stärksten in den glandulären Strukturen und etwas schwächer in basal-myothelialen Bereichen. K8/18 wird in allen untersuchten Fällen fast ausschließlich in den drüsigen Verbänden exprimiert. In zwei Fällen (18251/08 und P10/1438) sind 90% dieser Zellen K8/18-positiv.

Die basal-myothelialen Tumorzellen zeigen sich in allen drei Fällen überwiegend SMA-positiv, wobei die Ausprägung in einem Fall (18251/08) mit 90% deutlich höher ist als in den anderen beiden Fällen (ca. 50%). Auffällig ist zudem die Anordnung dieser Zellen. Durch ihre Formation entstehen Lumina, in welchen Basalmembran-ähnliches Material, welches Kollagen 4 enthält, beobachtet wird. Kollagen 4 ist in allen untersuchten Neoplasien nachweisbar.

Die Anzahl von rein K5/6-positiven Zellen ist insgesamt relativ gering. Bei den meisten Zellen liegt eine Ko-Expression von Keratin K5/6 mit Keratin K8/18 oder häufiger SMA vor.

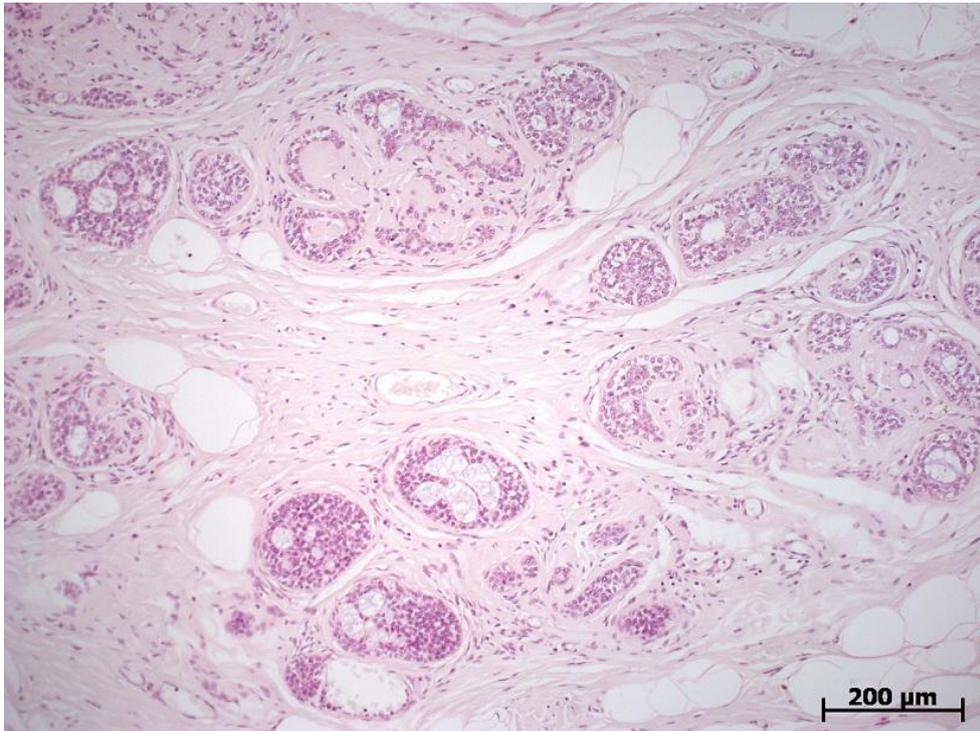


Abb. 18. Adenoid-zystisches Karzinom der Mamma. H/E-Färbung mit basaloiden Zellen in einem überwiegend kribriformen Wachstum, mit Einschluss eosinophiler, globulärer Strukturen.

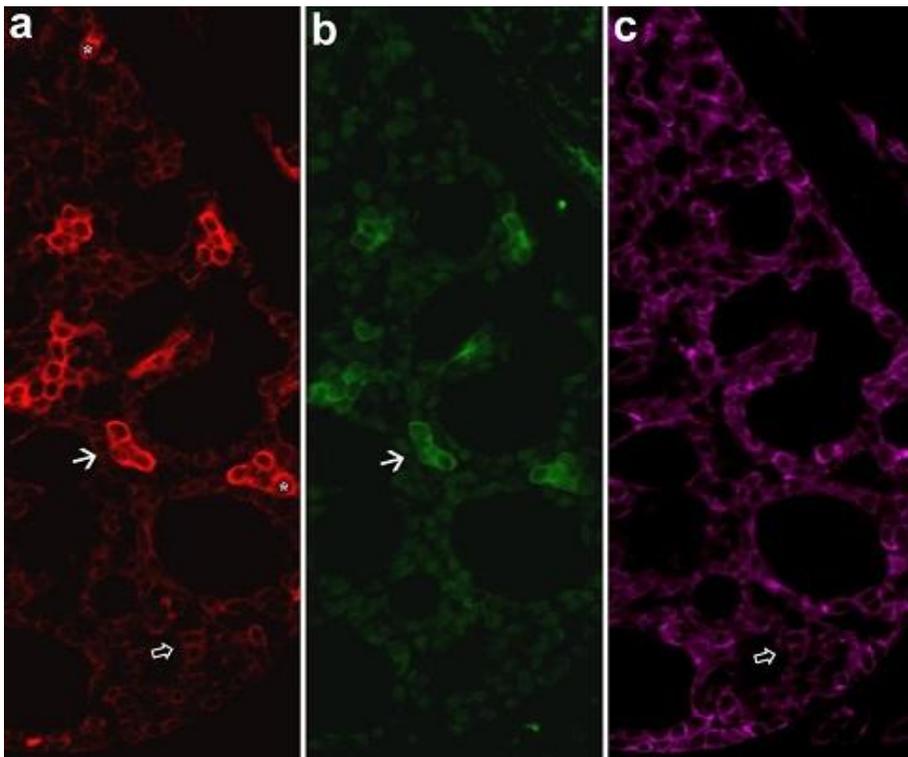


Abb. 19. Adenoid-zystisches Karzinom der Mamma. isTIF: K5 rot; K7 grün; SMA pink; Es zeigen sich Progenitorzellen (Stern) mit reiner K5-Expression, sowie Intermediärzellen mit glandulärer Differenzierung (großer Pfeil) und zahlreiche Tumorzellen mit myoepithelialer Differenzierung (doppelter Pfeil).

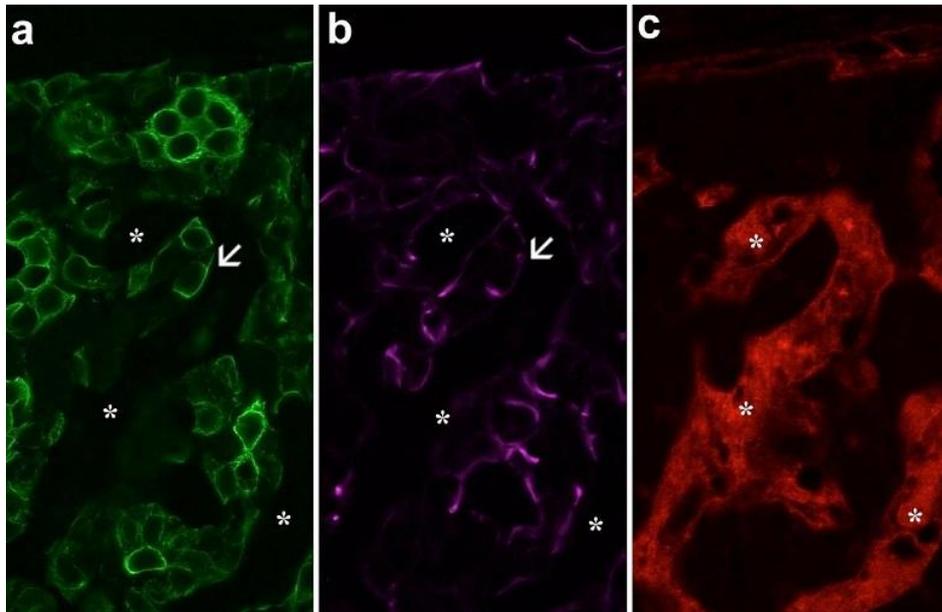


Abb. 20. Adenoid-zystisches Karzinom der Mamma. *isTIF*: K14 grün; SMA pink; Kollagen 4 rot; Die bandförmige Ablagerung des Kollagen 4 (Sterne) an den Myoepithelzellen wird deutlich. Daneben finden sich intermediäre Myoepithelzellen, mit Expression von K14 und SMA.

Tabelle 13. Adenoid-zystisches Karzinom der Mamma

	Fall	K5/6	K8/18	SMA	Anmerkung
Adenoid-zystisches Karzinom	18251/08	+++	Gland: +++ Myoethel: +	Gland: - Myoethel: +++	Kribriform + solide Kollagen 4: pos
	26285/08	+++	Gland: ++	+++	Kribriform Kollagen 4: pos
	P10/1438	+++	Gland: +++	++	Tubulär

3.4.2 Adenoid-zystisches Karzinom der Speicheldrüse

Das adenoid-zystische Karzinom der Speicheldrüse wurde anhand von zwei Fällen untersucht. In beiden Fällen lag ein überwiegend kribriformes Wachstumsmuster der Tumorzellen vor. Die basalen Keratine K5/6 wurden von mehr als 90% (6153/06), bzw. von ca. 70% (p10/115) der Zellen exprimiert. Die Differenzierung findet in glanduläre, vor allem aber in myoepitheliale Richtung statt. SMA ist bei 90%, bzw. 60% der Zellen nachweisbar. K8/18 wird in einem Fall (P10/115) mit 70% stark exprimiert. In einem weiteren Fall (6153/06) ist es mit ca. 10% hingegen nur schwach ausgeprägt.

Auch in der Speicheldrüse zeigt das ACC überwiegend Zellen mit Ko-Expression von K5/6 und SMA, bzw. weniger häufig mit K8/18. Eine alleinige Keratin K5/6-Expression ist seltener zu finden.

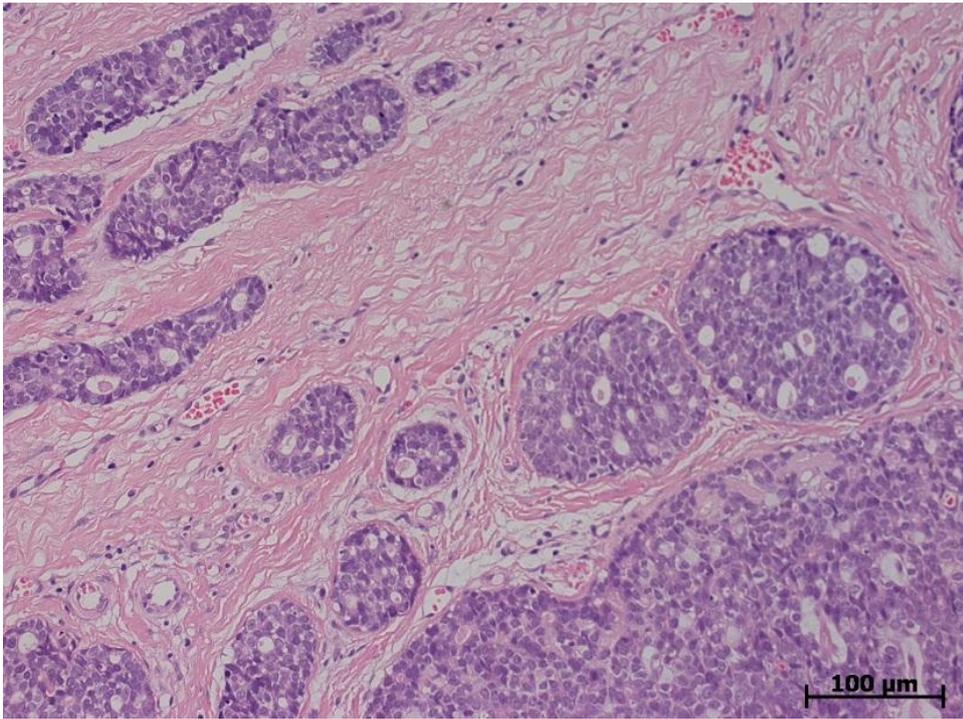


Abb. 21. Adenoid-zystisches Karzinom der Speicheldrüse. H/E-Färbung mit kribriformen Tumoranteilen.

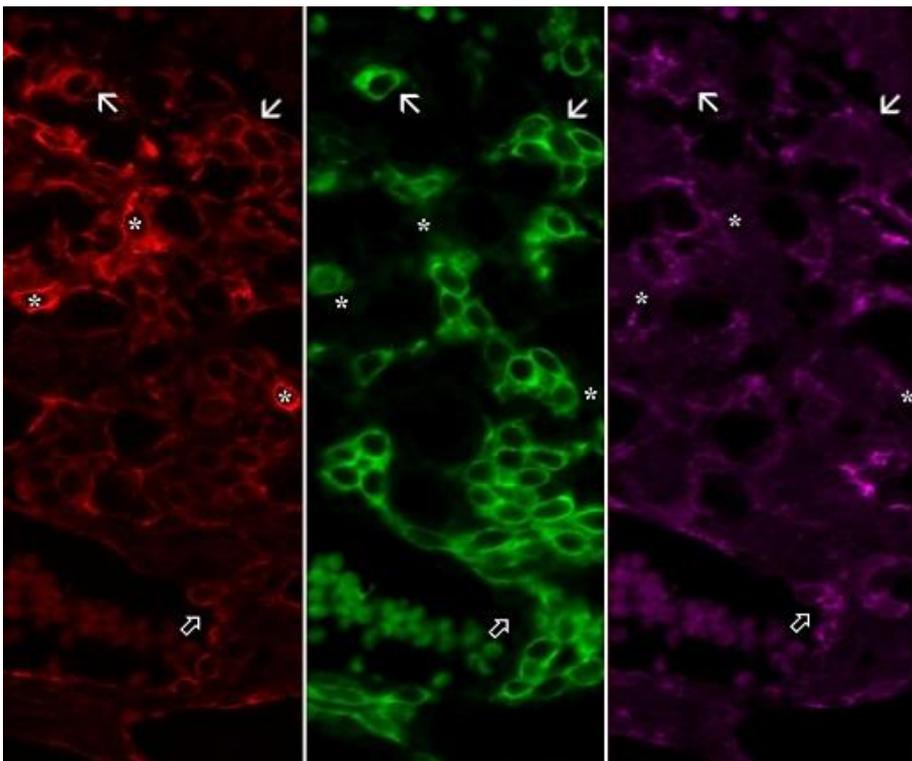


Abb. 22. Adenoid-zystisches Karzinom der Speicheldrüse. isTIF: K5 rot; K7 grün; SMA pink; Es finden sich sowohl reine Progenitorzellen (Stern) mit alleiniger Expression von K5, als auch Intermediärzellen. Letztere exprimieren K5 und K7 (großer Pfeil), bzw. K5 und SMA (doppelter Pfeil).

Tabelle 14. Adenoid-zystisches Karzinom der Speicheldrüse

	Fall	K5/6	K8/18	SMA	Anmerkung
Adenoid-zystisches Karzinom	6153/06	+++	+	+++	Kribriform
	P10/115	+++	+++	+++	Tubulär-kribriform

3.5 Plattenepithelkarzinom (PEC)

Für die Untersuchung des in der Mamma sehr selten vorkommenden Plattenepithelkarzinoms lagen uns insgesamt drei Fälle vor. In allen drei Fällen zeigt sich mit ca. 90% eine starke Expression der basalen Keratine K5/6. Keratin K8/18 ist in nur einem der Fälle (17441/07) und hier auch nur fokal zu finden. Das plattenepitheliale Keratin K10 wird hingegen in allen untersuchten Proben, meist in herdförmigen Zellverbänden, exprimiert. SMA war in keinem der Fälle nachweisbar.

Tabelle 15. Plattenepithelkarzinom der Mamma

	Fall	K5/6	K8/18	K10	SMA	Anmerkung
Plattenepithelkarzinom	17086/05	+++	-	+	-	
	17441/07	+++	+	++	-	P63 ++
	6465/02	+++	-	+	-	DCIS, K14 +, P63 +++

3.6 Syringom der Mamille

Das Syringom der Mamille wurde in dieser Studie anhand von sechs Fällen untersucht. Es handelt sich ausschließlich um weibliche Patientinnen im Alter von 25 bis 70 Jahren.

Allen untersuchten Gewebeproben gemeinsam ist die Expression der basalen Keratine K5/6 und des Stammzellmarkers p63 in nahezu allen neoplastischen Zellen (ca. 90%). Typischer Weise formatieren sich diese in tubulären, trabekulären oder kommaförmigen Verbänden. Die Differenzierung der Tumorzellen erfolgt sowohl in glanduläre, als auch in plattenepitheliale Richtung. Fall 32927/05 weist mit über 50% K10-positiver Zellen den größten Anteil an plattenepithelialer Differenzierung auf. Morphologisch ist in dieser Läsion eine vermehrte Zystenbildung auffällig. Das glanduläre Keratin K8/18 wird von 5% (23492/07, 32927/05, 26887/03) bis maximal 20% (31072/05, 32924/05) der Tumorzellen exprimiert. Oft liegen diese Zellen luminal im Zellverband und weisen eine Ko-Expression

von basalen und glandulären Keratinen auf. Der myoepitheliale Marker SMA ist in fünf der sieben untersuchten Fälle negativ. Ein Fall (32924/05) zeigt eine mäßige Positivität (10% der Tumorzellen), bei gleichzeitig vorliegender, deutlich SMA-positiver sklerosierender Adenose.

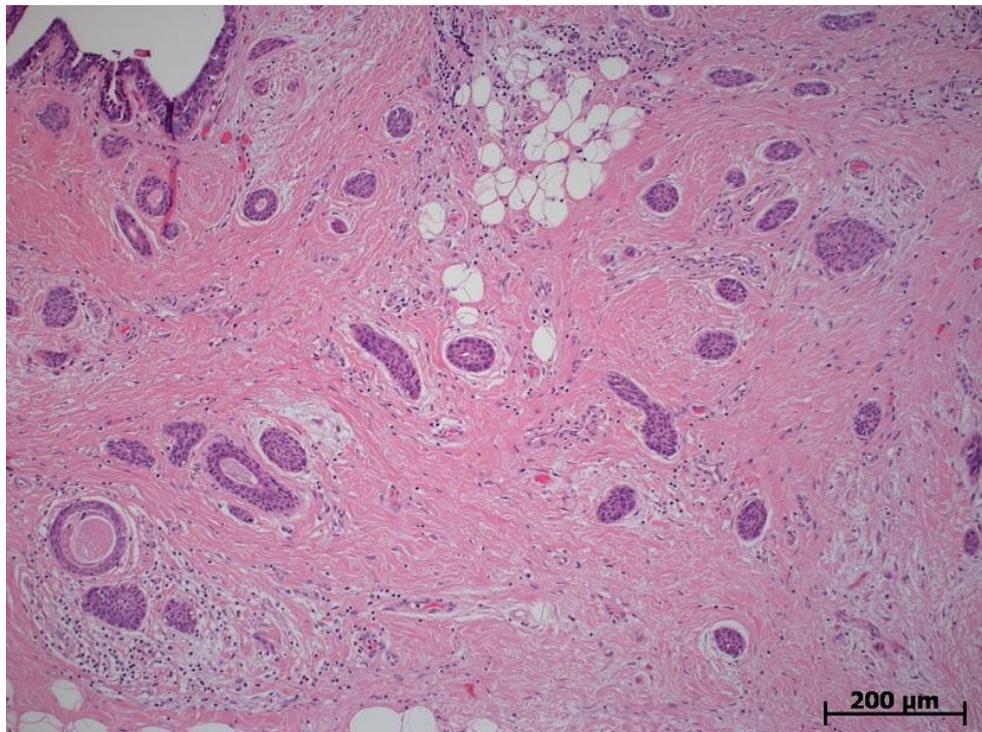


Abb. 23. Syringom der Mamille. H/E-Färbung. Typische Anordnung der monomorphen Tumorzellen in runden bis kommaförmigen Verbänden.

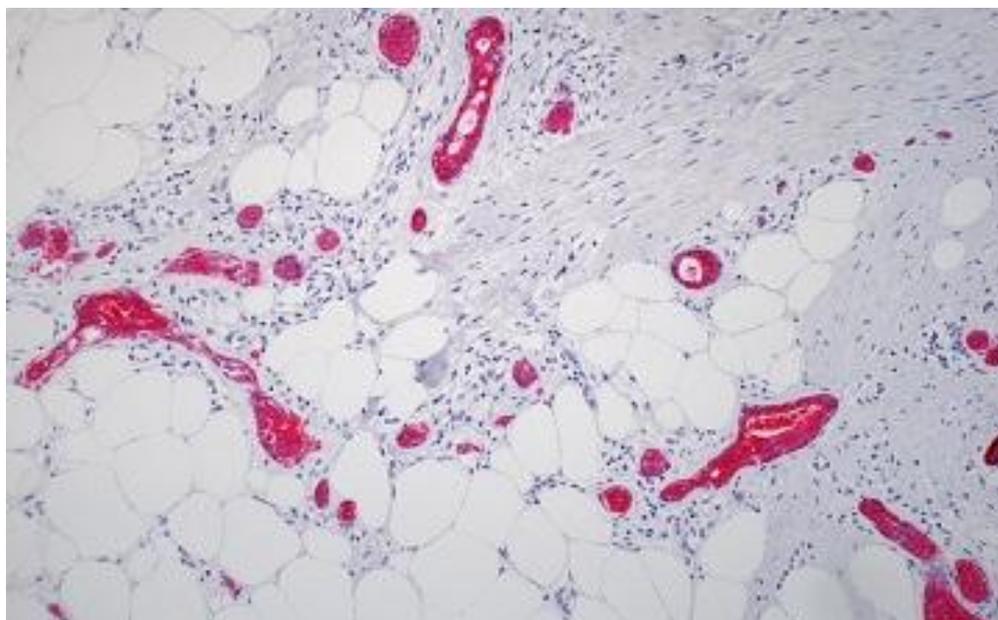


Abb. 24. Syringom der Mamille. Immunhistochemische Färbung mit Darstellung von K5 in den Tumorverbänden.

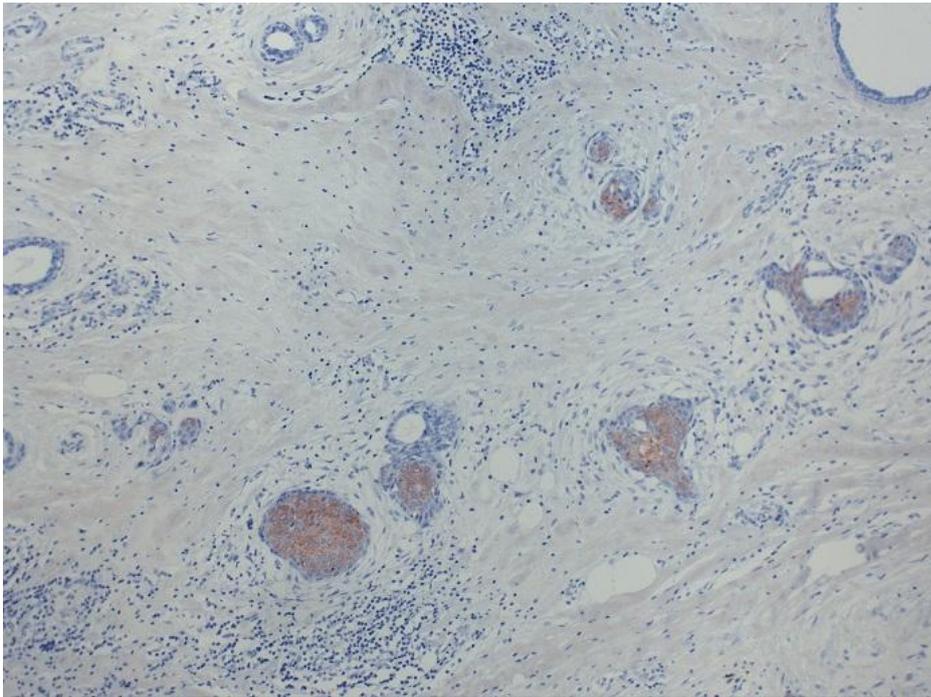


Abb. 25. Syringom der Mamille. Immunhistochemische Färbung mit Darstellung von K10 in den Tumorverbänden.

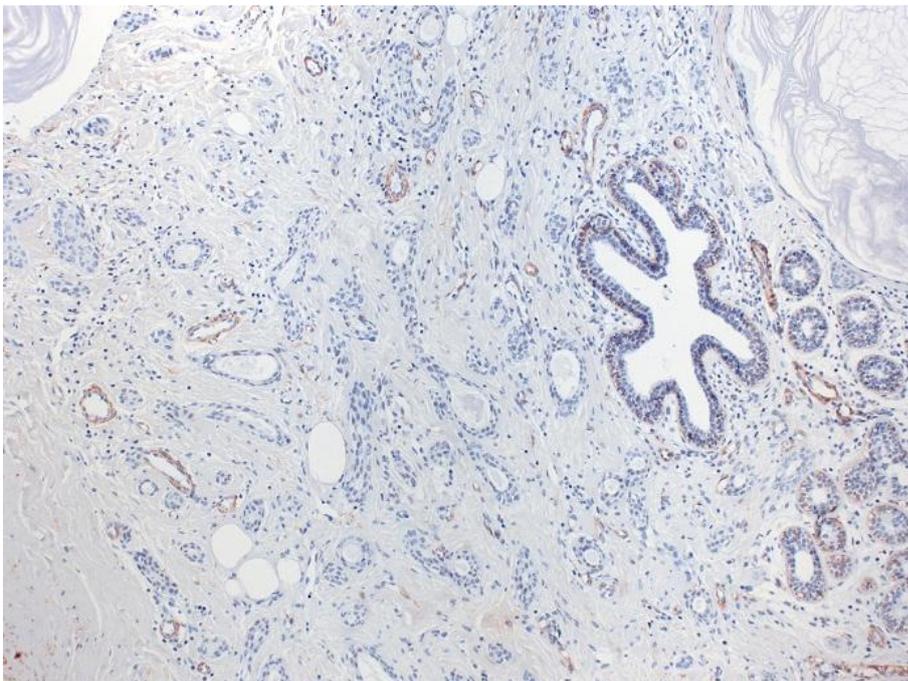


Abb. 26. Syringom der Mamille. Immunhistochemische Färbung mit Darstellung von SMA im normalen Drüsen-
gewebe, sowie in glatten Muskelzellen kleiner Gefäße. In den Tumorverbänden lässt sich kein SMA darstellen.

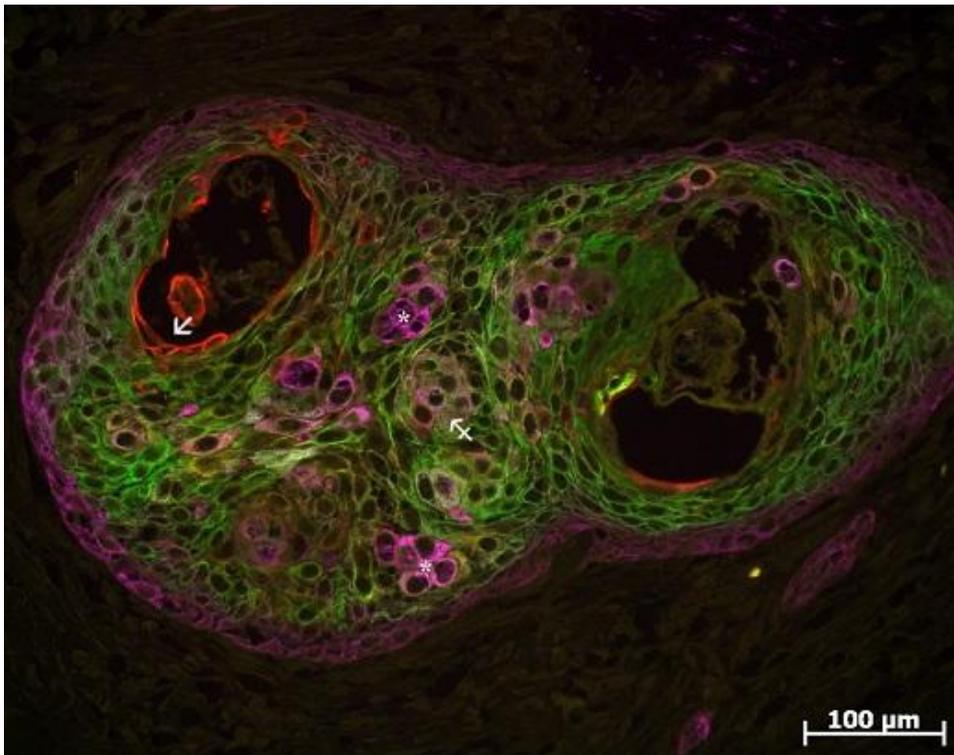


Abb. 27. Syringom der Mamille. isTIF: K14 pink; K7 rot; K10 grün; Neben Progenitorzellen (Stern) mit reiner K14-Expression, finden sich Intermediärzellen, welche K14 und K10 exprimieren (gekreuzter Pfeil) und damit eine plattenepitheliale Differenzierung aufweisen. Im Inneren des Tumorverbandes zeigen sich zudem glanduläre Tumorzellen, welche K7 exprimieren (großer Pfeil).

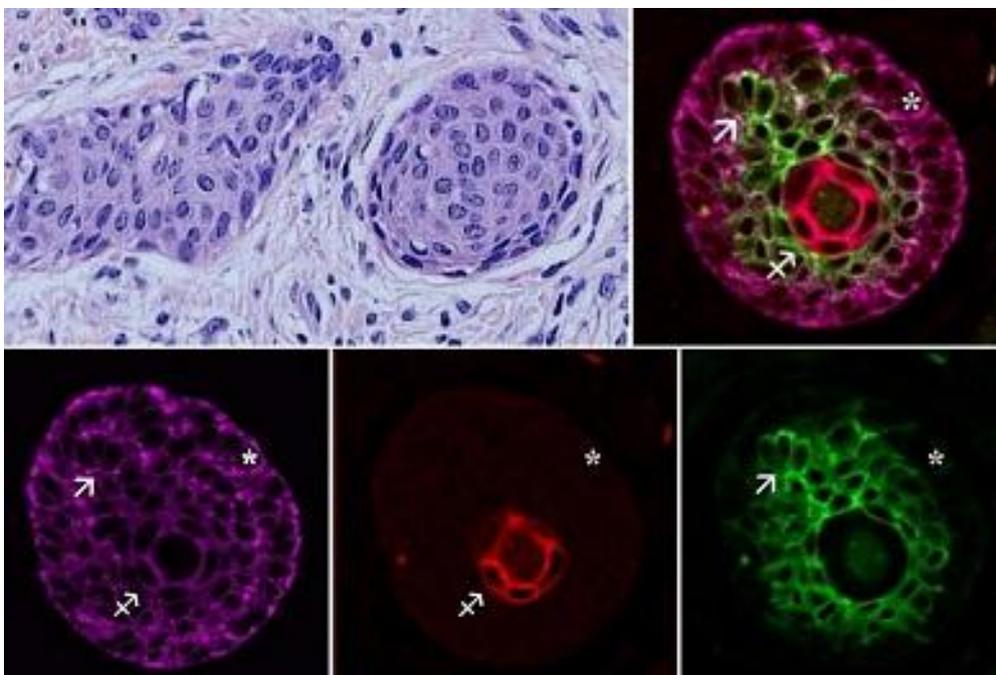


Abb. 28. Syringom der Mamille. H/E-Färbung, sowie isTIF: K5 pink; K18 rot; K10 grün; Es finden sich Progenitorzellen mit Expression von K14 (Stern), sowie Intermediärzellen mit Expression von K14 und K18 (gekreuzter Pfeil), bzw. K14 und K10 (großer Pfeil).

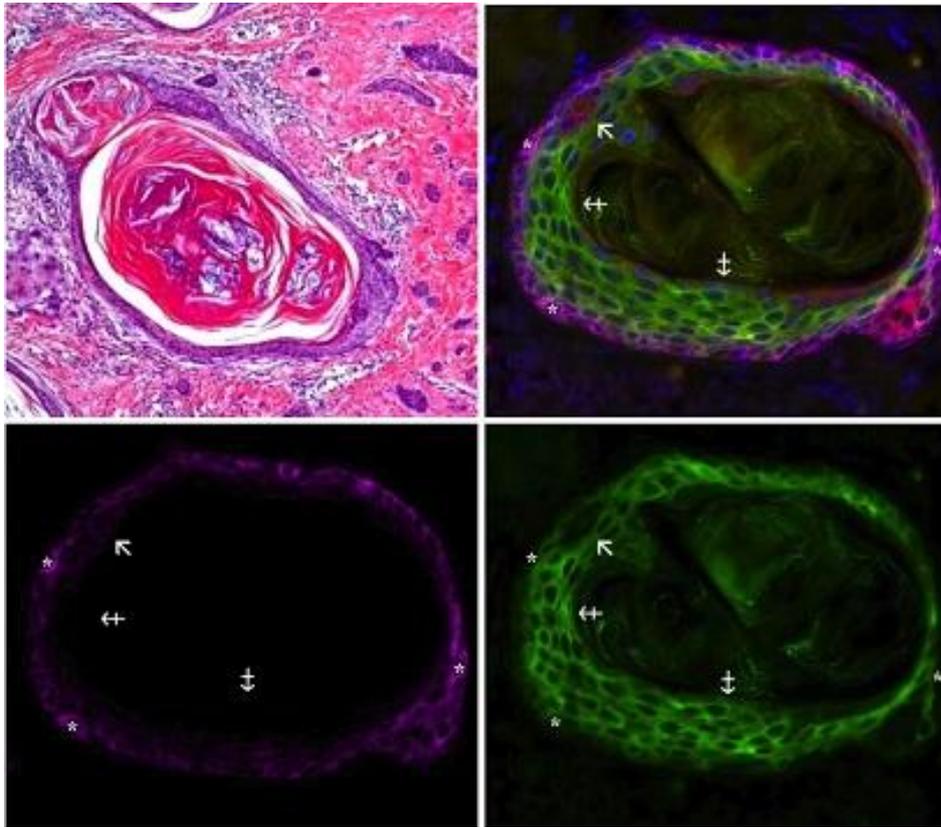


Abb. 29. Syringom der Mamille. H/E-Färbung und isTIF: K5 pink; K18 rot; K10 grün; Es zeigen sich sowohl Progenitorzellen mit K5-Expression (Stern), als auch glanduläre Intermediärzellen mit K5- und K18-Expression (großer Pfeil). Darüber hinaus zeigt sich eine plattenepitheliale Differenzierung mit reiner K10-Expression (gekreuzter Pfeil). Im H/E-Bild wird die verhornte Innenschicht des Tumors deutlich dargestellt.

Tabelle 16. Syringom der Mamille

	Fall	K5/6	K8/18	K10	SMA	Anmerkung
Syringom der Mamille	30307/03	+++	+	++	-	P63+++
	31072/05	+++	+	++	-	P63+++
	23492/07	+++	+	++	-	Fibroblastische Reaktion P63+++
	32924/05	+++	+	++	+ SA:++	Assoziierte sklerosierende Adenose P63+++
	32927/05	+++	+	+++	-	Viele Plattenepithelzysten P63+++
	26887/03	+++	+	++	-	P63++

3.7 Adeno-squamöses Karzinom (AdSC)

Zur Untersuchung des adeno-squamösen Karzinoms wurden in diese Studie fünf Fälle der niedrigmalignen (low grade) und vier Fälle der hochmalignen (high grade) Variante der Mamma einbezogen. Die Gewebeproben stammen von weiblichen Patientinnen im Alter von 52 bis 74 Jahren.

Das niedrigmaligne adeno-squamöse Karzinom (LGAdSC) zeigt in allen untersuchten Fällen eine fast vollständige Positivität der Tumorzellen für basale Keratine K5/6. Die Zellen bilden tubuläre, sowie solide und teilweise kommaförmige Proliferate, mit plattenepithelialer und glandulärer Differenzierung.

In einem Fall (26887/03) werden sowohl K10, als auch K8/18 von 80% der Tumorzellen ko-exprimiert. Ca. 50% der Tumorzellen weisen in zwei Fällen (19880/06 und P09/1133) eine glanduläre Differenzierung auf. Mit nur jeweils 5%, bzw. 10% K8/18-positiven Zellen, findet sich in drei Fällen (25946/04, 1161/03 und 21952/08) eine deutlich geringere glanduläre Differenzierung. Keratin K10 wird in einem Fall (25946/04) von 50% der Tumorzellen exprimiert. Die restlichen Fälle zeigen einen geringeren Anteil an plattenepithelialer Differenzierung (5% bis 15%). Auch das Bild des hochmalignen adeno-squamösen Karzinoms (HGAdSC) wird von Keratin K5/6-positiven Zellen geprägt. Bei ähnlicher Formatierung weisen die Tumorzellen hier im Gegensatz zum LGAdSC deutlich stärkere Malignitätskriterien wie Polyploidie, Kernatypien und Heterochromasie auf. Der Anteil an Zellen mit glandulärer Differenzierung ist mit 50% bis 80% in allen untersuchten Fällen insgesamt höher als beim LGAdSC. Auffällig ist außerdem das Vorliegen von ausschließlich K8/18-positiven Zellen, was für eine klonale Selektion der glandulären Zellen spricht. Keratin K10 wird hingegen nur schwach exprimiert (5% bis maximal 20% der Zellen), wobei Ko-Expressionen mit basalen Keratinen vorkommen. Eine myotheliale Differenzierung konnte nicht nachgewiesen werden.

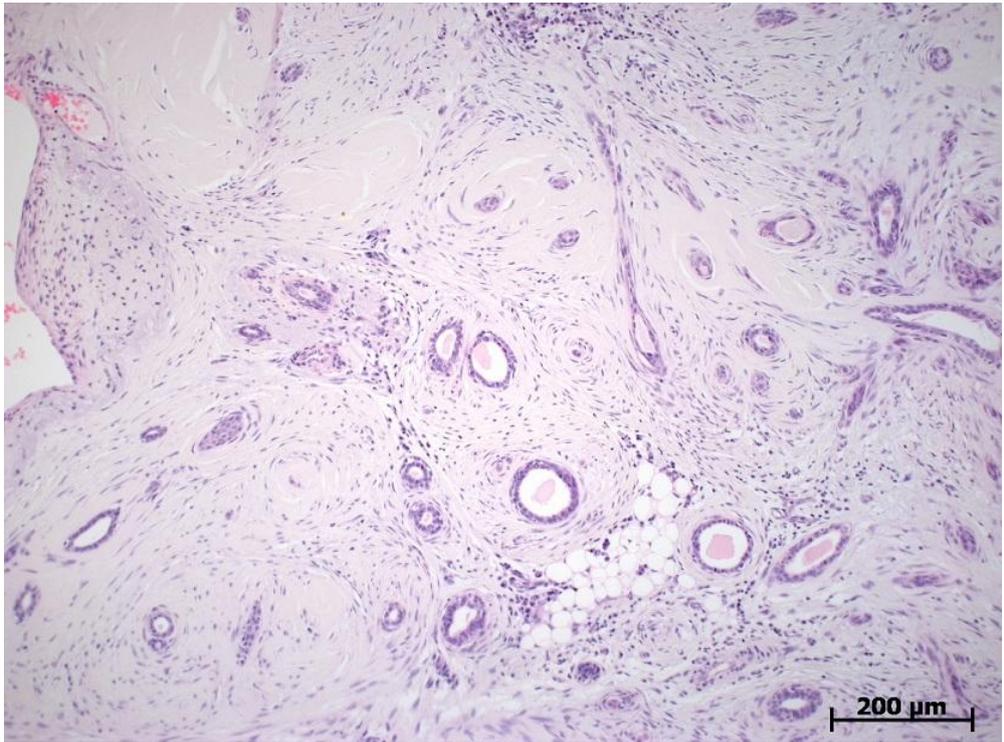


Abb. 30. Adeno-squamöses Karzinom der Mamma, low grade, H/E-Färbung. Es finden sich zahlreiche tubuläre Zellverbände, sowie vereinzelte kommaförmige Tumorverbände.

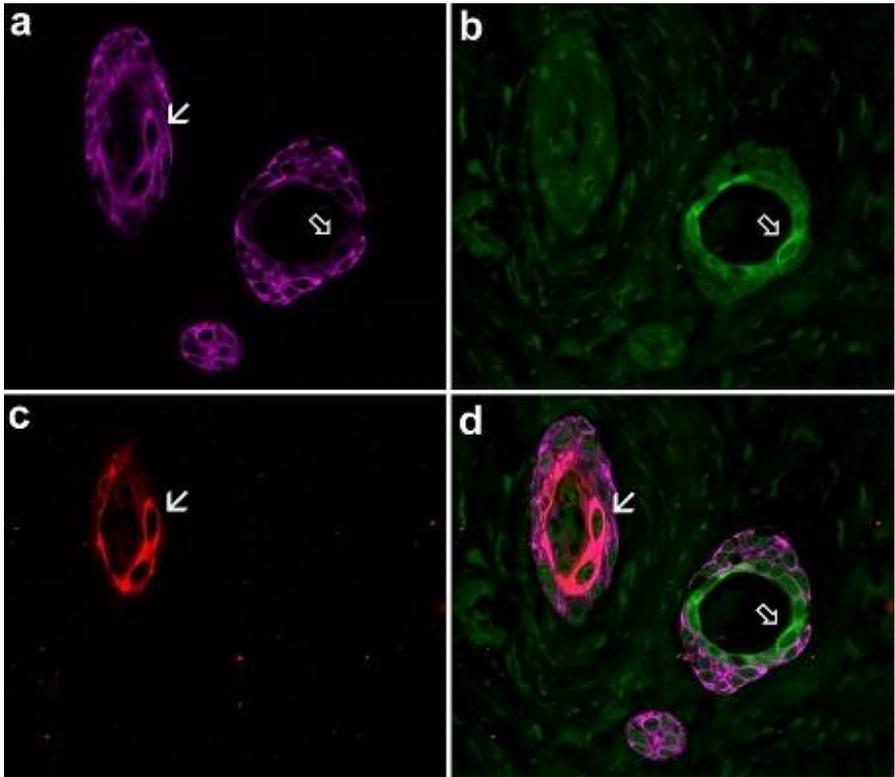


Abb. 31. Adeno-squamöses Karzinom der Mamma, low grade, isTIF:K5 pink; K7 grün; K10 rot; In allen drei Tumorkomplexen finden sich K5 exprimierende Progenitorzellen, wobei der kleinste dieser Komplexe ausschließlich aus diesen Zellen besteht. Darüber hinaus finden sich glanduläre Intermediärzellen mit K5 und K7(doppelter Pfeil), sowie plattenepitheliale Intermediärzellen mit K5 und K10 (großer Pfeil).

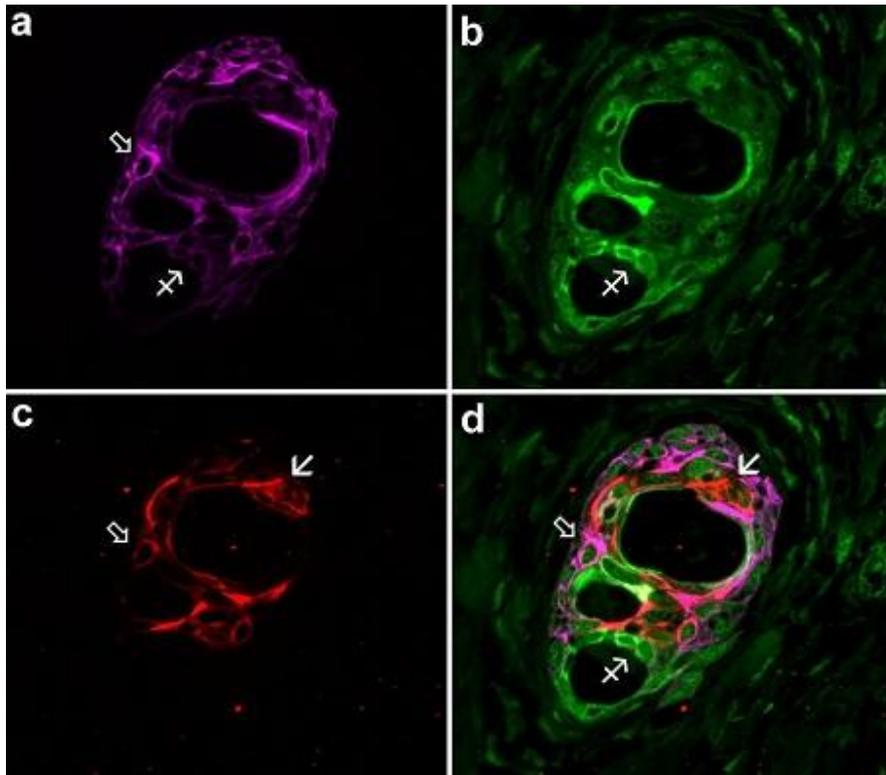


Abb. 32. Adeno-squamöses Karzinom der Mamma, low grade. istIF:K5 pink; K7 grün; K10 rot; Neben intermediären glandulären Zellen, welche K5 und K7 exprimieren (gekreuzter Pfeil), finden sich intermediäre plattenepitheliale Zellen mit K5- und K10-Expression (doppelter Pfeil) und ausdifferenzierte plattenepitheliale Tumorzellen, welche lediglich K10 exprimieren (großer Pfeil).

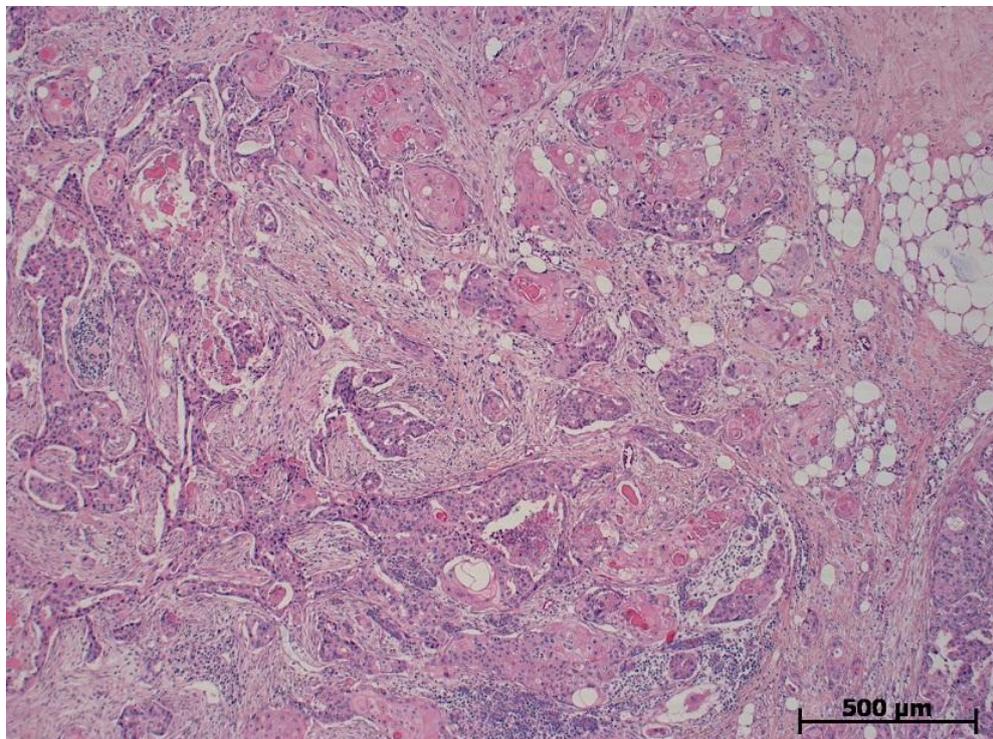


Abb. 33. Adeno-squamöses Karzinom der Mamma, high grade. H/E-Färbung. Überwiegend solide wachsender Tumor mit inniger Vermischung von NST-duktalem Elementen und plattenepithelialen Differenzierungen.

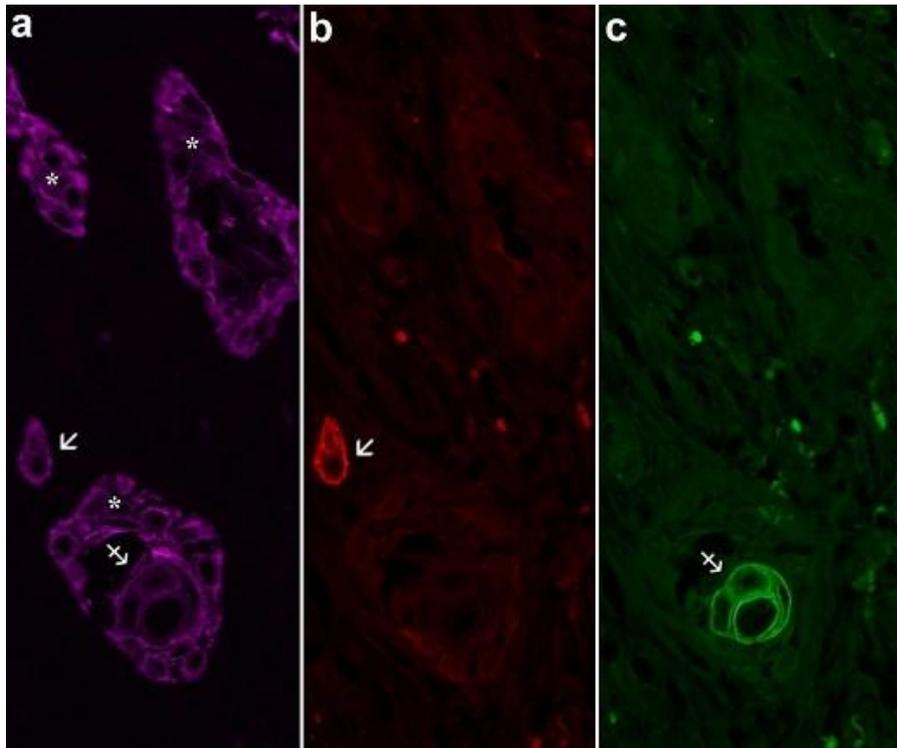


Abb. 34. Adeno-squamöses Karzinom der Mamma, high grade. isTIF:K14 pink; K7 rot; K10 grün; Es zeigen sich Progenitorzellen mit Expression von K14 (Stern). Daneben finden sich intermediäre plattenepitheliale Zellen mit K14- und K10-Expression (gekreuzter Pfeil), sowie eine intermediäre glanduläre Tumorzelle mit K14- und K7-Expression (großer Pfeil).

Tabelle 17. Adeno-squamöses Karzinom der Mamma, low grade

	Fall	K5/6	K8/18	K10	SMA	Anmerkung
Adeno-squamöses Karzinom low grade	25946/04	+++	+	+++	-	Desmoplastisches Stroma P63+++
	P09/1133	+++	++	+	-	Infiltrierende Epitheliose P63+++
	19880/06	+++	++	+	-	Assoziiertes PEC, assoziiertes Papillom, radiäre Narbe, P63++
	1161/03	+++	+	+	-	Assoziiertes Papillom P63+++
	21952/08	+++	+	+	SA:+++	Assoziierte sklerosierende Adenose P63+++

Tabelle 18. Adeno-squamöses Karzinom der Mamma, high grade

	Fall	K5/6	K8/18	K10	SMA	Anmerkung
Adeno-squamöses Karzinom high grade	24437/05	+++	+++	+	n.d.	Assoziiertes DCIS, G3, desmoplastisches Stroma, Angioinvasion
	9534/07	++	+++	+	-	G2, spindelzelliges, desmoplastisches Stroma, LK-Metastase
	M10/5462	++	+++	+	-	Assoziiertes DCIS
	A08/20538	+++	+++	+	-	P63++

3.8 Mukoepidermoidkarzinom (MEC)

Das Mukoepidermoidkarzinom der Speicheldrüse stellt eine Art Pendant zum adeno-squamösen Karzinom der Mamma dar. Es handelt sich um eine der häufigsten malignen Neoplasien der Speicheldrüse.

Die in der Studie untersuchte Gewebeprobe stammt aus der Glandula parotis eines 49-jährigen männlichen Patienten. Ein Großteil der Tumorzellen exprimiert die basalen Keratine K5/6. Glanduläre und plattenepitheliale Differenzierungen in Form von K8/18 und K10 sind bei jeweils 60% bzw. 5% der Zellen nachweisbar, dabei handelt es sich meist um Intermediärzellen, mit Ko-Expression von Keratin K5/6. SMA wird im Tumor nicht exprimiert.

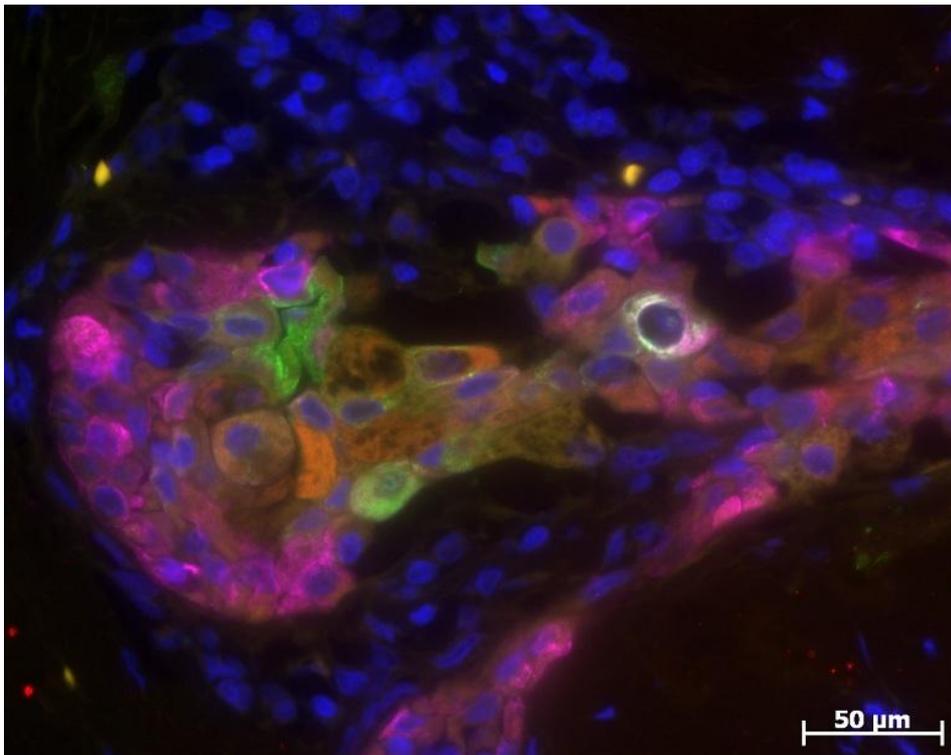


Abb. 35. Mukoepidermoidkarzinom der Speicheldrüse. *isTIF:K5 pink; K7 rot; K10 grün.*

Tabelle 19. Mukoepidermoidkarzinom der Speicheldrüse

	Fall	K5/6	K8/18	K10	SMA	Anmerkung
Mukoepidermoidkarzinom	P10/285	++	++	+	-	G3

3.9 qPCR Analysen

Die Expression von basalen Keratinen (K5 und K14), glandulären Keratinen (K7, K8, K18) und epidermalem squamösen Keratin (K10) sowie SMA (ACTA2) wurden mittels quantitativer PCR in acht Tumoren mit myoepithelialer Differenzierung analysiert. Wie in Abb. 36 dargestellt, fanden wir eine Hochregulation von mRNA sowohl der basalen, als auch der glandulären Keratine, in allen Tumoren im Vergleich zu normalem Brustdrüsengewebe. Dagegen fanden sich für ACTA2 im Vergleich zu normalem Mammagewebe geringere RNA-Werte bei den pleomorphen Adenomen. Lediglich die beiden untersuchten ACCs und ein AMT zeigten höhere RNA-Werte. Die Expression des squamösen Keratins K10 war in allen Tumoren niedrig, mit Ausnahme eines pleomorphen Adenoms, welches auch schon in der HE-Histologie eine plattenepitheliale Differenzierung aufwies.

Wie Abb. 37 zeigt, fanden wir hochregulierte RNA-Werte der basalen Keratine, sowie teilweise auch der glandulären Keratine, in Mukoepidermoidkarzinomen und niedrigmalignen adeno-squamösen

Karzinomen. Im Vergleich dazu wiesen die Plattenepithelkarzinome hohe Werte für basale Keratine K5 und K14, sowie für das squamöse Keratin K10 auf, aber sehr niedrige RNA-Werte für glanduläre Keratine K7 und K8/18.

Die mRNA-Expressionswerte unterstützen die immunhistochemischen Befunde dahingehend, dass die niedrig-malignen adeno-squamösen Karzinome als auch die Mukoepidermoidkarzinome Tumoren mit glandulärer und squamöser Differenzierung darstellen. Die RNA-Expression des squamösen Keratins K10 war nur in Plattenepithelkarzinomen höhergradig und in zwei Fällen von niedrigmalignen adeno-squamösen Karzinomen mittelgradig, im Vergleich zur Mamillen-Epidermis. Obwohl die K10-RNA-Expression der Mukoepidermoidkarzinome ähnlich denen der niedrigmalignen adeno-squamösen Karzinome ausfiel, zeigten die Mukoepidermoidkarzinome immunhistochemisch nur vereinzelt eine K10-Expression in einzelnen Zellen oder Zellgruppen.

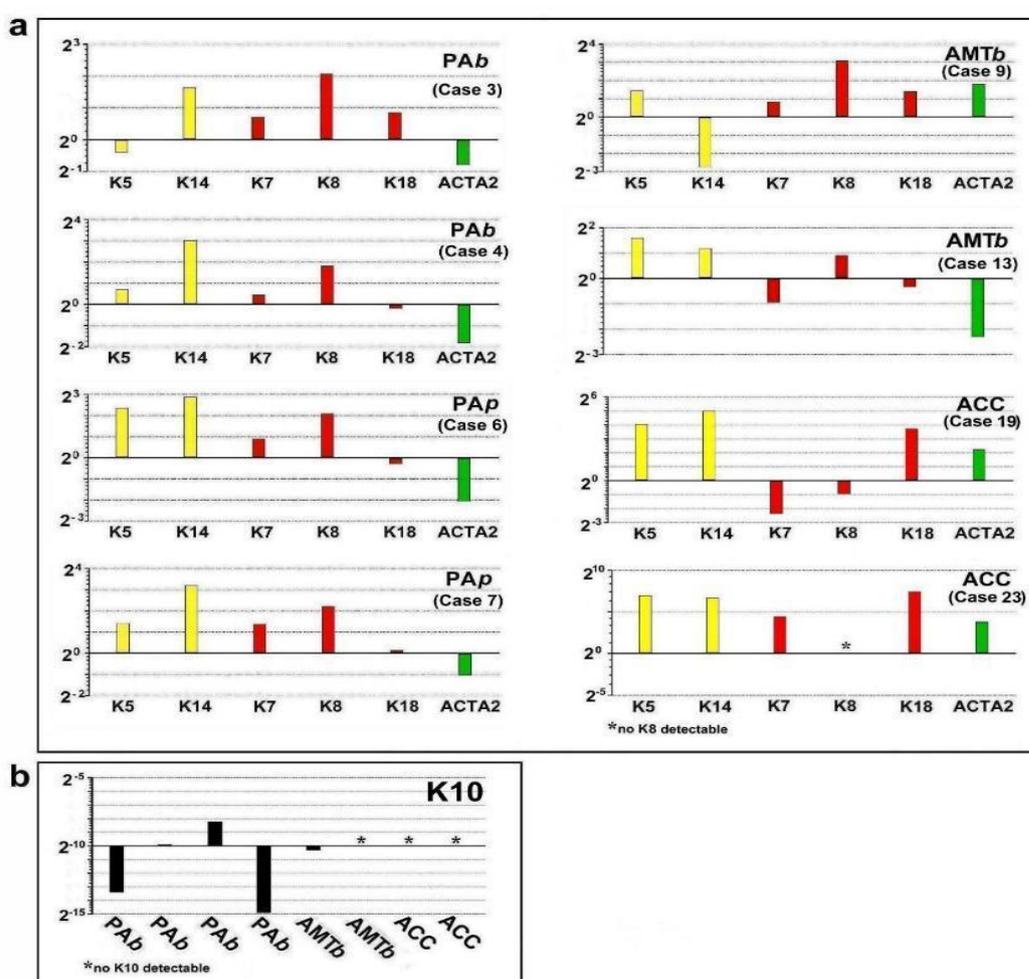


Abb. 36. qPCR: Acht Proben wurden auf ihren RNA-Gehalt hin untersucht. Allen gemeinsam ist die Hochregulation von basalen (K5 oder K14) und glandulären Keratine (K7, K 8, oder K18). Im Pleomorphen Adenom zeigt sich SMA(ACTA2) in verminderter Menge, beim Adenoid-zystischen-Karzinom ist es hingegen vermehrt. Der Adenomyotheliale Tumor wies im Vergleich zum normalen Mammagewebe in einer Probe mehr; in der anderen Probe weniger SMA auf. Eine Hochregulation des plattenepithelialen Keratins (K10) konnte in einer Probe des Pleomorphen Adenoms gefunden werden.

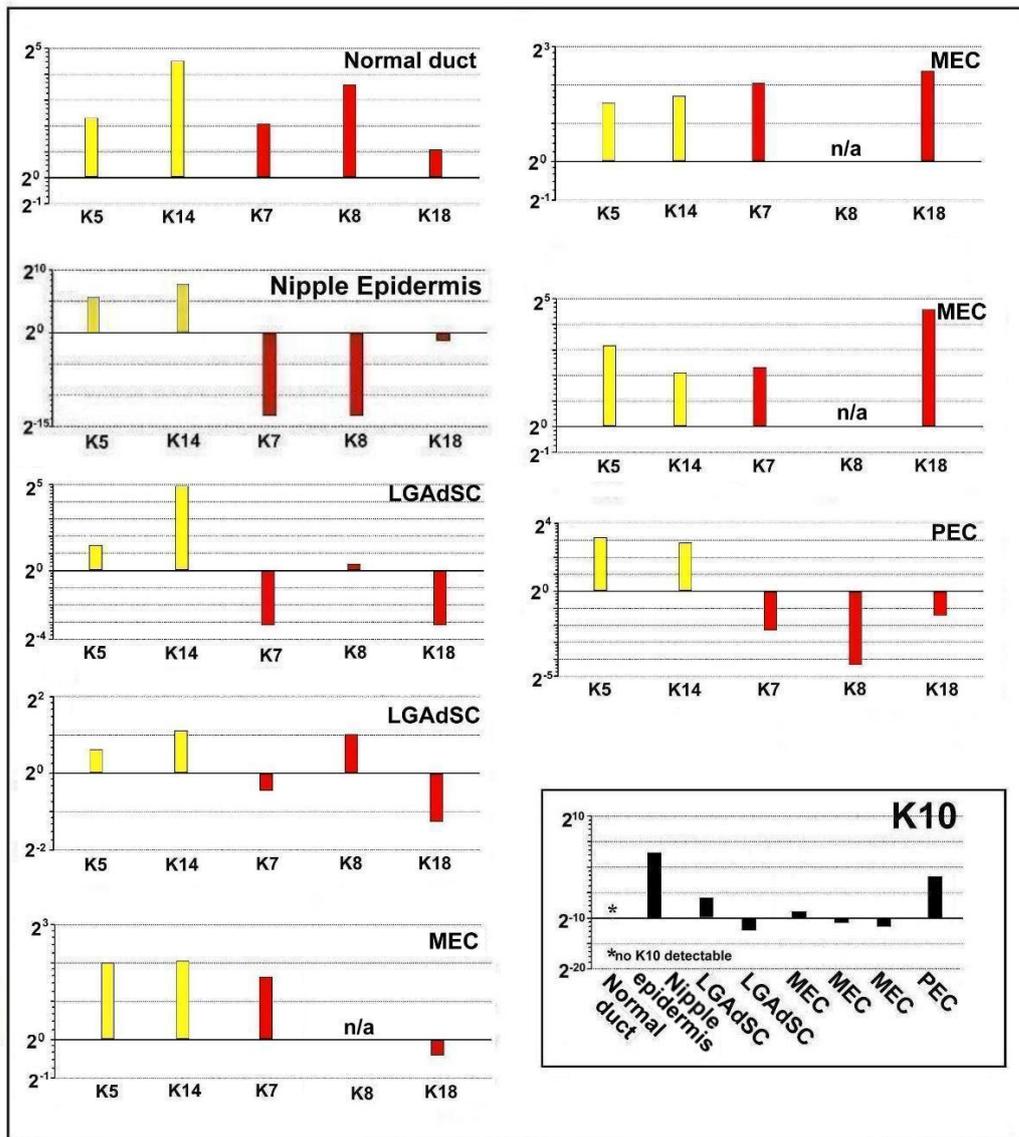


Abb. 37. qPCR: Sechs Tumorproben, sowie eine Probe der normalen Mamillenepidermis und eine Probe eines normalen Brustdrüsenganges wurden auf ihren RNA-Gehalt hin untersucht. Allen Tumoren gemeinsam ist die Hochregulation von basalen Keratinen (K5 oder K14). Bezüglich der glandulären Keratine zeigt das niedrig maligne Adeno-squamöse Karzinom eine vermehrte Expression von glandulärem K8, das Mucoepidermoidkarzinom hingegen von glandulärem K7 und K18. Beim Plattenepithelkarzinom findet sich wiederum eine verminderte Expression aller glandulären Keratine, jedoch eine Hochregulation des squamösen Keratin K10.

4 Diskussion

In dieser Studie wurden Mammatumoren vom Speicheldrüsentyp systematisch bezüglich ihrer zellulären Differenzierung analysiert und den Tumoren der Speicheldrüse gegenübergestellt. Um die zellulären Differenzierungsmerkmale darzustellen, haben wir eine in-situ Triple-Immunfluoreszenz-Methode angewendet, mit der verschiedene Proteine gleichzeitig in einer Zelle nachgewiesen werden können. Es wurden vornehmlich die basalen Keratine K5/6 und K14, sowie die linienspezifischen glandulär-luminalen Keratine K8/18, das plattenepitheliale Keratin K10 und das myoepitheliale smooth-muscle-actin (SMA) untersucht. Weiterhin wurden Kollagen 4 und als mesenchymaler Marker Vimentin in die Studie einbezogen. Die Untersuchungen wurden ergänzt durch quantitative RNA-Analysen für die Keratine K5, K14, K7, K8, K18, K10 und für SMA (ACTA2). Die erarbeiteten Ergebnisse lassen sich folgendermaßen interpretieren.

Das **Pleomorphe Adenom** ist ein häufiger Tumor der Speicheldrüse, der selten auch in der Mamma vorkommt (Pia-Foschini et al. 2003). Die insgesamt acht untersuchten Fälle von pleomorphen Adenomen von Brustdrüse und Speicheldrüse wiesen große Ähnlichkeit miteinander auf. Die Tumorzellen zeigten Differenzierungen in glanduläre, myoepitheliale, plattenepitheliale und mesenchymale Richtungen. Neben der strangartigen Anordnung der epithelialen Zellen, fanden sich häufig von abluminal ins mesenchymale Gewebe „ausströmende“ Zellen, als charakteristisches histologisches Merkmal. Die basalen Keratine K5/6 wurden in allen untersuchten Läsionen deutlich exprimiert - mit weitaus höheren RNA-Werten als vergleichbares normales Brustdrüsengewebe. In der isTIF-Analyse fanden sich kleine Gruppen von Progenitorzellen, welche ausschließlich basale Keratine K5/6 exprimierten. Von diesen ausgehend, ließen sich glanduläre und myoepitheliale Differenzierungen in Form von intermediären Zellen nachweisen, welche eine Ko-Expression von K5/6 und den entsprechenden linienspezifischen Proteinen aufwiesen. K8/18 und SMA waren in allen Fällen in unterschiedlich starker Ausprägung nachweisbar. Auffällig war, dass intermediäre glanduläre Zellen häufig in soliden und gangähnlichen Tumorarealen lokalisiert waren. Hier fanden sich gleichzeitig ausgereifte glanduläre Zellen, in denen Keratin K5/6 herunter reguliert war und nur noch das glanduläre Keratin K8/18 exprimiert wurde. Eine ähnliche Entwicklungslinie zeigten die myoepithelialen Zellen. Intermediäre Zellen, die sowohl basale Keratine K5/6, als auch SMA exprimierten, fanden sich ebenfalls im Bereich der soliden Tumorareale. Reifes Myoepithel, ohne K5/6-Expression, jedoch mit SMA-Positivität, war dagegen eher im Randbereich der Zellverbände lokalisiert. Die plattenepitheliale Differenzierung der Tumorzellen konnte in zwei der acht Fälle nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um jeweils einen Fall eines PAs der Speicheldrüse und der Mamma. In beiden Fällen fanden sich Zellen mit plattenepitheliale Keratin K10 zu umschriebenen, knotenförmigen Verbänden zusammengeschlossen. In ihrer unmittelbaren Umgebung befanden sich K5/6-positive Progenitorzellen, sowie vereinzelte

intermediäre squamöse Zellen, die eine Expression von K5/6 und K10 aufwiesen. Myotheliale Proteine wurden von den betreffenden Zellen nicht exprimiert.

Als mesenchymaler Marker wurde in unserer Studie Vimentin eingesetzt. Dieses ließ sich in allen untersuchten Fällen von pleomorphen Adenomen nachweisen. Interessanter Weise konnten wir auch bei diesem Differenzierungsweg einen Ursprung in den Keratin K5/6-positiven Progenitorzellen nachweisen. Sowohl in der Mamma, als auch in der Speicheldrüse, zeigten sich neben den reifen mesenchymalen Zellen zahlreiche Intermediärzellen, die neben Vimentin auch die basalen Keratine K5/6 exprimierten. Aufgrund der fehlenden SMA-Expression konnte in diesen Zellen eine myotheliale Differenzierung ausgeschlossen werden. Somit können wir die bisher verbreitete Meinung der Entwicklung von mesenchymalen und plattenepithelialen Metaplasien aus dem Myothel nicht bestätigen (Cuadros et al. 1987; Ballance et al. 1990; Cheuk and Chan 2007). Wir gehen im Gegenzug jedoch konform mit den Daten von Diaz et al. (1991), welche besagen, dass das pleomorphe Adenom aus einer einzigen Ursprungszelle entspringt und in verschiedene Richtungen ausdifferenziert.

Der **adenomyoepitheliale Tumor** der Mamma und das **epithelial-myotheliale Karzinom** der Speicheldrüse sind morphologisch und immunhistochemisch identisch (Loose et al. 1992; Plaza et al. 1993; Koyama et al. 1997; Pia-Foschini et al. 2003; Simpson et al. 1998; Seethala et al. 2007). Es handelt sich um biphasische Tumoren, die sich aus epithelialen und myoepithelialen Zellen zusammensetzen. Die epithelialen Zellen bilden typischer Weise duktale Formationen, welche vom proliferierenden Myothel umgeben werden. Immunhistochemisch konnte gezeigt werden, dass die äußeren Zellschichten myotheliale und die inneren Zellschichten glanduläre Proteine aufweisen. Von der biphasischen Variante ist die monophasische abzugrenzen, die sich durch überwiegend spindelzellige oder epitheloidzellige, myotheliale Proliferationen in der Mamma auszeichnet. Die Diagnose basiert wesentlich auf dem Nachweis einer myoepithelialen Proliferation zwischen den glandulären Strukturen (McLaren et al. 2005). In der Speicheldrüse ist der monophasische Subtyp meist durch eine spindelzellige Transformation der Tumorzellen charakterisiert. In unserer Studie haben wir zwei Fälle der Mamma, wobei es sich zum einen um die benigne biphasische, zum anderen um die maligne monophasische Variante handelt, sowie zwei Fälle der Speicheldrüse, mit Hilfe der istIF untersucht. In allen Fällen fanden sich mäßig viele K5/6- oder K14-positive Progenitorzellen. Diese waren sowohl in den dukталen, als auch in den stromaähnlichen Bereichen des Tumors lokalisiert. Interessanter Weise zeigten sich im Fall des malignen adenomyothelialen Karzinoms der Mamma wesentlich mehr Tumorzellen positiv für Keratin K14, als für Keratin K5/6. Bei einer überwiegend myothelialen Differenzierung (90% SMA-positiv) fanden sich nur wenige drüsige Formationen. Im Fall des benignen Subtyps des AMT der Mamma war die Mehrzahl der Progenitorzellen K5/6-positiv. Daneben fand sich jedoch auch eine Reihe von Zellen mit Expression von Keratin K14. Im Stroma des Tumors fanden sich Tumorzellen mit SMA-Expression. Die fokalen glandulären Strukturen waren überwiegend K8/18-positiv, K5/6 wurde nur sehr vereinzelt exprimiert.

Auch beim epithelial-myothelialen Karzinom der Speicheldrüse überwog die myotheliale Differenzierung der Tumorzellen. Im Vergleich zu den Fällen der Mamma lagen hier jedoch mehr glanduläre Differenzierungen vor. Innerhalb dieser Verbände waren sowohl Progenitorzellen (rein K5/6-positiv), als auch Intermediärzellen mit K5/6- und K8/18-Positivität, sowie reife glanduläre Zellen mit alleiniger K8/18-Expression nachweisbar.

Entgegen der Annahme einiger Autoren, konnte keine Transdifferenzierung von myothelialen Zellen zu glandulären Zellen dargestellt werden. In keinem der Fälle waren Zellen mit gleichzeitiger Expression von K8/18 und SMA nachweisbar. Wie in allen anderen untersuchten Läsionen, scheint auch beim adenomyothelialen Tumor die Progenitorzelle den Ursprung sowohl für den glandulären, als auch für den myothelialen Differenzierungsweg darzustellen.

Das **adenoid-zystische Karzinom** macht lediglich 0,1%-1% aller Brusttumoren und 10% der Speicheldrüsentumoren aus. Dabei erweist sich der Tumor in der Speicheldrüse als sehr aggressiv mit hoher Rezidivrate, wohingegen er in der Mamma eine exzellente Prognose zeigt (Ghabach et al. 2010). In den von uns untersuchten Fällen stellten sich die Tumoren überwiegend kribriform und solide dar. Progenitorzellen mit alleiniger Expression von K5/6 waren in allen Proben in geringer Anzahl zu finden. Die Mehrzahl der Tumorzellen wies eine Ko-Expression von K5/6 und linienspezifischen Keratinen auf, wobei in allen Fällen, sowohl in der Mamma, als auch in der Speicheldrüse, die intermediären Myoepithelzellen die vorherrschende Zellpopulation darstellten.

Besonders auffällig stellt sich die Anordnung der myoepithelialen Tumorzellen dar. Die SMA-positiven Zellen bilden dabei Pseudolumina, in welche sie ein basalmembranartiges Material (Kollagen 4) sezernieren.

In unserer Studie wurden zwei Fälle von **Basalzelladenomen** untersucht. Es handelte sich dabei jeweils um einen Fall der Mamma und der Speicheldrüse. Beide Fälle waren morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden. Der Großteil der Tumorzellen exprimierte Keratin K5/6 bzw. K14. Neben reinen Progenitorzellen traten zahlreiche Intermediärzellen auf. Es zeigte sich die typische zonale Zellverteilung mit peripher gelegenen Myoepithelzellen und zentral gelegenen glandulären Zellen.

Syringome sind seltene Tumoren, welche sowohl in der Haut, als auch in der Mamma charakteristischer Weise im Bereich der Mamille, auftreten. Die morphologische Ähnlichkeit der Syringome von Haut und Mamma ist dahingehend gedeutet worden, dass die Syringome der Mamma sich wahrscheinlich aus Schweissdrüsengängen der Mamille entwickeln (Rosen 1983; Suster et al. 1991; Biernat and Jablkowski 2000; Rosen 2009). Die Entstehung des Syringoms der Haut wurde von Langbein et al. (2008) auf die Entwicklung aus den Schweissdrüsenausführungsgängen zurückgeführt. Mit Hilfe der Triple-Immunfluoreszenz-Methode und von quantitativen PCR-Analysen überprüften wir diese Hypothese. Dabei stellten sich zahlreiche Keratin K5/6-positive Progenitorzellen dar, welche praktisch immer an der Außenseite epithelialer Tumorverbände lokalisiert waren. Die Tumorzellen formatierten

sich zu tubulären, trabekulären und soliden, teils kommaförmigen Verbänden. Ein großer Teil der nach innen liegenden Tumorzellen zeigte zusätzlich linienspezifische Keratine, insbesondere das squamöse Keratin K10 bzw. das glanduläre Keratin K8/18. Es handelt sich bei ihnen damit um squamöse bzw. glanduläre Intermediärzellen. Dabei findet sich die glanduläre Differenzierung der Tumorzellen häufig innerhalb der squamösen Differenzierungsareale und stellt eine Mimikry der glandulären Differenzierung des normalen Mammagewebes dar. Neben den intermediären glandulären und plattenepithelialen Zellen fanden sich auch ausgereifte Zellen innerhalb der Tumorverbände. Diese Zellen wiesen lediglich die linienspezifischen Keratine auf, wobei das basale K5/6 herunter reguliert und somit nicht mehr nachweisbar war. Im Bereich der reifen, squamösen Tumorareale konnte teilweise die Bildung von Zysten und Hornperlen beobachtet werden.

Das Syringom der Haut zeigte, im Gegensatz zum Syringom der Mamille, einzig das Keratin K19, was seine Verbindung zur ekkrinen Schweißdrüse bestätigt (Langbein et al. 2008). Die Tumoren scheinen also eine phenotypisch ähnliche K5/14-positive Ursprungszelle zu haben, welche sich jedoch in verschiedenartige, organotypische Zellen differenzieren können.

Obwohl in der Literatur wiederholt myoepitheliale Differenzierungen in Syringomen beschrieben werden (Chen 1990; Moran et al. 1990; Diaz et al. 1991; Jones et al. 2001), konnten wir in fünf von sechs untersuchten Fällen das linienspezifische SMA in den Tumorzellen nicht nachweisen. Denkbar ist jedoch, dass SMA-positive Myofibroblasten des Stromas in unmittelbarer Nähe von Tumorverbänden, als Myoepithelzellen fehlinterpretiert worden sind. In einem der von uns untersuchten Fälle zeigte sich eine Expression von SMA im Bereich einer sklerosierenden Adenose, sowie in den umliegenden Tumorzellverbänden. Aufgrund unserer Befunde gehen wir davon aus, dass die plattenepitheliale Differenzierung der Tumorzellen ihren Ursprung in den Keratin K5/6-positiven Progenitorzellen findet. Dieses widerspricht der bisher in der Literatur angenommenen Theorie, welche von einem myoepithelialen, oder glandulären Ursprung der plattenepithelialen Tumorzellen ausging (Palmer et al. 1990; Tavassoli 1991; Raju et al. 1993; Rosen 2009).

Das low grade **adeno-squamöse Karzinom** ist ein seltener Tumor der Mamma, welcher sich trotz seines invasiven Wachstums durch eine gute Prognose auszeichnet. Histologisch ähnelt der Tumor stark dem Syringom der Mamille, ist jedoch im Gegensatz zu diesem im peripheren Drüsengewebe der Mamma lokalisiert (Rosen and Ernsberger 1987; Van Hooven et al. 1993; Drudis et al. 1994; Shizawa et al. 1997; Denley et al. 2000; Agrawal et al. 2010; Noel et al. 2010; Scali et al. 2013). Beim niedrig-malignen adeno-squamösen Karzinom stellen die Keratin K5/6-positiven Progenitorzellen einen wesentlichen Teil der Zellpopulation dar. Daneben finden sich in allen untersuchten Fällen sowohl ausgereifte, als auch noch in der Differenzierung befindliche glanduläre und plattenepitheliale Zellen, die in ihren Differenzierungsprozessen dem Syringom der Mamille ähneln. Aus diesen Daten schließen wir, dass das oben aufgeführte Progenitorzellkonzept eine Erklärung der verschiedenen Differenzierungslinien innerhalb dieser Tumoren darstellt. Je nach Malignitätsgrad unterscheiden sich die adeno-

squamösen Karzinome in ihrer zellulären Zusammensetzung. So weisen beim low grade AdSC deutlich mehr Zellen Keratin K10-Positivität aus als beim high grade AdSC. Bei letzterem überwiegt die glanduläre Differenzierung klar gegenüber der plattenepithelialen Differenzierung. Allen low grade adeno-squamösen Karzinomen gemeinsam ist die Expression von Keratin K5/6 in nahezu allen Tumorzellen. Über das Vorhandensein von myoepithelialen Markern beim adeno-squamösen Karzinom gibt es in der Literatur geteilte Meinungen (Rosen and Ernberger 1987; Van Hooven et al. 1993; Foschini et al. 1995; Shizawa et al. 1997; Denley et al. 2000). In unserer Arbeit konnten wir nur in einem der untersuchten Fälle SMA nachweisen, wobei die positiven Zellen sich in einem Bereich mit assoziierter sklerosierender Adenose befanden. In den typischen Tumorverbänden war hingegen nur fokal SMA nachweisbar. Wir gehen deshalb davon aus, dass eine regelhafte myoepitheliale Differenzierung in adeno-squamösen Karzinomen nicht vorkommt und können die Hypothese einiger Autoren, welche das Myoepithel als Ursprung der plattenepithelialen Differenzierung ansehen, nicht teilen (Foschini and Eusebi 1998; Pia-Foschini et al. 2003).

Das **Mukoepidermoidkarzinom** der Speicheldrüse stellt einen malignen Tumor mit epidermoiden und schleimbildenden glandulären Elementen dar (Fisher et al. 1983; Dardick et al. 1990; Luna 2006) und wird aus histologischer Sicht auch als Pendant zum adeno-squamösen Karzinom der Mamma angesehen. Der von uns untersuchte Fall eines MEC imponierte durch K5/6-positive Progenitorzellen, sowie zahlreiche intermediäre glanduläre Zellen, die überwiegend in der Peripherie des Tumors nachweisbar waren. Im Inneren fanden sich glandulär differenzierte Tumorzellen, welche die Keratine K8/18 exprimierten. Selten konnte auch das plattenepitheliale Keratin K10 nachgewiesen werden. Diese Zellen fanden sich vornehmlich zentral im Tumorverband lokalisiert. SMA konnte im Tumor nicht nachgewiesen werden. Dies spricht für ein Fehlen von myoepithelialen Differenzierungen im Mukoepidermoidkarzinom der Speicheldrüse. Wir können daher die Befunde anderer Autoren, wie zum Beispiel von Otterbach und Schmid (2006), bestätigen.

Das **Plattenepithelkarzinom** wurde aus konzeptionellen Gründen in unsere Studie eingeschlossen. Primäre Plattenepithelkarzinome der Mamma sind extrem selten (Behranwala et al. 2003; Cappellani et al. 2004; Aulmann et al. 2005; Aparicio et al. 2008; Accurso et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit ging es vornehmlich um die Differenzierung plattenepithelialer Tumorzellen und die Frage, in wie weit myoepitheliale Zellen hierbei eine Rolle spielen. Alle von uns untersuchten Fälle zeigten Keratin K5/6-positive Progenitorzellen, welche in der Peripherie des Tumors lokalisiert waren. Daneben fanden sich zahlreiche Intermediärzellen mit Ko-Expression von K5/6 und dem plattenepithelialen Keratin K10, charakteristischer Weise zu kleinen Herden formatiert. Glanduläre Keratine wurden hingegen nur in einem Fall und auch hier nur fokal nachgewiesen. SMA wurde nicht beobachtet.

5 Zusammenfassung

Mammatumoren vom Speicheldrüsentyp stellen eine heterogene Gruppe von Tumoren dar. Die Histogenese dieser Tumoren ist noch weitgehend unbekannt. Aus diesem Grunde haben wir acht verschiedene Läsionen histologisch, immunhistologisch und mit einer weiterentwickelten Mehrfach-Immunfluoreszenzmikroskopie (in-situ Triple Immunofluoreszenz Methode) untersucht. Diese Methoden erlauben die synchrone Darstellung von drei verschiedenen Antigenen und ermöglichen bei entsprechender Wahl der Antigene Aussagen zur Differenzierung von Zelllinien.

In der vorliegenden Arbeit haben wir Antikörper gegen basale Keratine K5 und K14, gegen glanduläre Keratine K7, K8/18 und gegen das squamöse Keratin K10 angewandt. Darüber hinaus haben wir als myoepithelialen Marker SMA und vereinzelt als Stammzellmarker p63, ein Homolog des p53, benutzt. In allen Neoplasien konnten wir die Anwesenheit von Zellen nachweisen, die einzig die basalen Keratine K5/6 oder K14 exprimieren und die wir im Kontext mit der p63-Ko-Expression als Progenitorzellen definiert haben. Die Anzahl dieser Progenitorzellen variiert in den verschiedenen Läsionen. So weisen das adenomyoepitheliale -, das adenoid-zystische- und das Mukoepitheloidkarzinom verhältnismäßig wenige, das pleomorphe - und das Basalzelladenom, sowie das Syringom, das adeno-squamöse- und das Plattenepithelkarzinom deutlich vermehrt Progenitorzellen auf. Von diesen Zellen ausgehend lassen sich in den Tumoren verschiedene Differenzierungslinien nachweisen. So kann man in den adenomyoepithelialen und adenoid-zystischen Tumoren glanduläre und myoepitheliale Differenzierungen beobachten, in den Syringomen, den adeno-squamösen und in Mukoepitheloidkarzinomen glanduläre und plattenepitheliale Differenzierungen nachweisen.

Das pleomorphe Adenom stellt eine Läsion dar, die vierfache Differenzierungslinien aufweist: neben der glandulären, myoepithelialen und plattenepithelialen Differenzierung findet sich auch eine mesenchymale Differenzierung, die durch die Expression von Vimentin gekennzeichnet ist und mit der Bildung von extrazellulärer Matrix einhergeht. Dabei handelte es sich um chondroide und osteoide Veränderungen, deren Entstehung bislang als vom Myoepithel ausgehend betrachtet wurde. Da diese Zellen in unserer Untersuchung weder SMA, noch andere myoepitheliale Proteine exprimierten, sich hingegen aber Keratin K5/6- und Vimentin-positiv zeigten, gehen wir auch hier davon aus, dass die K5/6-positiv-positive Stammzelle den Ursprung dieser mesenchymalen Veränderung bildet.

Tumoröse Plattenepithelzellen konnten bisher in H/E-gefärbten Schnitten identifiziert werden. Jedoch war die Darstellung des Differenzierungsweges, die gleichzeitige Expression von basalen Keratinen und plattenepitheliale Keratin K10, nur mit Hilfe der isTIF Färbung eindeutig nachzuweisen. Unsere Daten widersprechen hier der Sichtweise einiger Autoren, die das Myoepithel als Ursprung der plattenepithelialen Tumordifferenzierung befinden.

Im Zusammenhang mit dem myoepithelialen Differenzierungsweg in tumorösen Läsionen zeigt sich häufig die Entstehung von Basalmembran-ähnlichem Material (Kollagen 4). Diese Erkenntnis kann man sich vor allem bei der Diagnostik des adenoidzystischen Karzinoms zunutze machen. Typischer Weise findet sich das Kollagen 4 hier in Pseudolumina, die durch die Anordnung der myoepithelialen Tumorzellen gebildet werden.

Die Ergebnisse unserer Arbeit erlauben uns zusammenfassend, folgende Feststellungen zu machen: Die zelluläre Zusammensetzung der Tumoren vom Speicheldrüsentyp ist in der Mamma und in der Speicheldrüse identisch. Alle untersuchten Tumoren weisen Progenitorzellen auf, die sich durch die alleinige Expression von basalen Keratinen K5/6, bzw. Keratin K14 (und nach vorläufigen Ergebnissen dem Stammzellmarker p63) auszeichnen. Darüber hinaus deuten Intermediärzellen mit Expression von basalen Keratinen und linienspezifischen Proteinen darauf hin, dass die Progenitorzelle den Ursprung der verschiedenen zellulären Differenzierungen darstellt. Diese Differenzierungen erfolgen sowohl in epitheliale, als auch in mesenchymale Richtung.

6 Tabellenverzeichnis

• Tabelle 1 a/b: Material: Läsionen der Mamma	10-11
• Tabelle 2: Material: Läsionen der Speicheldrüse	11
• Tabelle 3: Primärantikörper	13
• Tabelle 4: Sekundärantikörper	14
• Tabelle 5: Eosinlösung	16
• Tabelle 6: Hämatoxylin nach Meyer	17
• Tabelle 7: Pleomorphes Adenom der Mamma	22
• Tabelle 8: Pleomorphes Adenom der Speicheldrüse	25
• Tabelle 9: Adenomyoepithelieller Tumor der Mamma	27
• Tabelle 10: Epithelial-myotheliales Karzinom der Speicheldrüse	29
• Tabelle 11: Basalzelladenom der Mamma	29
• Tabelle 12: Basalzelladenom der Speicheldrüse	31
• Tabelle 13: Adenoid-zystisches Karzinom der Mamma	34
• Tabelle 14: Adenoid-zystisches Karzinom der Speicheldrüse	36
• Tabelle 15: Plattenepithelkarzinom der Mamma	36
• Tabelle 16: Syringom der Mamille	40
• Tabelle 17: Adeno-squamöses Karzinom der Mamma, LG	44
• Tabelle 18: Adeno-squamöses Karzinom der Mamma, HG	45
• Tabelle 19: Mukoepidermoidkarzinom der Speicheldrüse	46

7 **Abbildungsverzeichnis**

• Abb. 1:	Das Progenitorzellkonzept	8
• Abb. 2:	Direkte (l.) und indirekte (r.) Immunfluoreszenztechnik	15
• Abb. 3 - 6:	Pleomorphes Adenom der Mamma	20 - 22
• Abb. 7 - 9:	Pleomorphes Adenom der Speicheldrüse	23 - 24
• Abb. 10:	Adenomyothelialer Tumor der Mamma	26
• Abb. 11:	Myoepitheliales Karzinom der Mamma	26
• Abb. 12 - 14:	Epithelial-myotheliales Karzinom der Speicheldrüse	27 - 28
• Abb. 15 - 16:	Basalzelladenom der Mamma	30
• Abb. 17:	Basalzelladenom der Speicheldrüse	31
• Abb. 18 - 20:	Adenoid-zystisches Karzinom der Mamma	33 - 34
• Abb. 21 - 22:	Adenoid-zystisches Karzinom der Speicheldrüse	35
• Abb. 23 - 29:	Syringom der Mamille	37 - 40
• Abb. 30 - 34:	Adenosquamöses Karzinom der Mamma	42 - 44
• Abb. 35:	Mukoepidermoidkarzinom der Speicheldrüse	46
• Abb. 36:	qPCR	47
• Abb. 37:	qPCR	48

8 Literaturverzeichnis

- Accurso A, Pettinato G, Ciancia G, Bellevicine C, Riccardi A, Rocco N. 2012. Pure primary squamous cell carcinoma of the breast presenting as an intracystic tumor. *Breast J.* 18(6): 608-9.
- Agrawal A, Saha S, Ellis IO, Bello AM. 2010. Adenosquamous carcinoma of breast in a 19 years old woman: a case report. *World J Surg Oncol.* 27; 8: 44.
- Aparicio I, Martinez A, Hernández G, Hardisson D, De Santiago J. 2008. Squamous cell carcinoma of the breast. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 137(2): 222-6.
- Aulmann S, Schnabel PA, Helmchen B, Dienemann H, Drings P, Otto HF, Sinn HP. 2005. Immunohistochemical and cytogenetic characterization of acantholytic squamous cell carcinoma of the breast. *Virchows Arch.* 446(3): 305-9.
- Bässler R. 1978. *Pathologie der Brustdrüse.* Springer. 245 f.
- Ballance WA, Ro JY, el-Naggar AK, Grignon DJ, Ayala AG, Romsdahl MG. 1990. Pleomorphic adenoma (benign mixed tumor) of the breast. An immunohistochemical, flow cytometric, and ultrastructural study and review of the literature. *Am J Clin Pathol.* 93(6): 795-801.
- Behranwala KA, Nasiri N, Abdullah N, Trott PA, Gui GP. 2003. Squamous cell carcinoma of the breast: clinico-pathologic implications and outcome. *Eur J Surg Oncol.* 29(4): 386-9.
- Biernat W, Jablkowski W. 2000. Syringomatous adenoma of the nipple. *Pol J Pathol.* 51(4): 201-2.
- Böcker W, Weigel S, Heindel W, Stute P. 2006. The normal breast (Kap.1). In: Böcker W. *Preneoplasia of the breast.* Münster. Elsevier. 3, 5-10.
- Böcker W, Kettritz U. 2006. Adenoma of the breast and variants (Kap.12). Adenoma of the nipple (Kap.13). In: Böcker W. *Preneoplasia of the breast.* Münster. Elsevier. 238-239, 250.
- Böcker W, Hungermann D, Kettritz U, Herbst H. 2006. Adenomyoepithelial tumors (Kap.14). In: Böcker W. *Preneoplasia of the breast.* Münster. Elsevier. 259-274.
- Böcker W, Kreipe H. 2012. Mamma (Kap.42). In: Böcker W, Denk H, Heitz Ph. U, Höfler G, Kreipe H, Moch H. *Pathologie.* 5. Aufl. Münster. Elsevier. 811-812.
- Buchwalow I, Böcker W, Köhler G. 2006. Immunhistochemie für Forschung und diagnostische Pathologie. In: Raem A, Rauch P. *Immunoassays.* 157-160.
- Buchwalow I, Böcker W. 2010. *Immunhistochemistry: Basics and Methods.* Münster. Springer. 31-34.
- Bürger H, Böcker W. 2006. Cytogenetic concepts of intraductal proliferative breast disease and invasive breast cancer (Kap.26). In: Böcker W. *Preneoplasia of the breast.* Münster. Elsevier. 547-548.
- Cappellani A, Di Vita M, Zanghi A, De Luca A, Tomarchio G, La Porta D, Lanzafame S, Alfano G. 2004. A pure primary squamous cell breast carcinoma presenting as a breast abscess: case report and review of literature. *Ann Ital Chir.* 75(2): 259-62.
- Carter E, Dyess DL. 2004. Infiltrating syringomatous adenoma of the nipple: a case report and 20-year retrospective review. *Breast J.* 10(5): 443-7.

- Chang CK, Jacobs IA, Calilao G, Salti GI. 2003. Metastatic infiltrating syringomatous adenoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med.* 127(3): e155-6.
- Chen KT. 1990. Pleomorphic adenoma of the breast. *Am J Clin Pathol.* 93(6): 792-4.
- Cheuk W, Chan JK. 2007. Advances in salivary gland pathology. *Histopathology.* Jul; 51(1): 1-20. Epub 2007 May 31.
- Cuadros CL, Ryan SS, Miller RE. 1987. Benign mixed tumor (pleomorphic adenoma) of the breast: ultrastructural study and review of the literature. *J. surg. Oncol. Sep;* 36 (1): 58-63.
- D'Ardenne AJ, Kirkpatrick P, Wells CA, Davies JD. 1986. Laminin and fibronectin in adenoid cystic carcinoma. *J Clin Pathol.* 39(2): 138-44.
- Dardick I, Gliniecki MR, Heathcote JG, Burford-Mason A. 1990. Comparative histogenesis and morphogenesis of mucoepidermoid carcinoma and pleomorphic adenoma. An ultrastructural study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 417(5): 405-17.
- Denley H, Pinder SE, Tan PH, Sim CS, Brown, R, Barker T, Gearty J, Elston CW, Ellis IO. 2000. Metaplastic carcinoma of the breast arising within complex sclerosing lesion: a report of five cases. *Histopathology.* 36(3): 203-9.
- Diaz NM, McDivitt R, Wick MR. 1991. Pleomorphic Adenoma of the Breast: A Clinicopathologic and Immunohistochemical Study of 10 Cases. *Hum Pathol.* 22(12): 1206-14.
- Di Tommaso L, Foschini MP, Ragazzini T et al. 2004. Mucoepidermoid carcinoma of the breast. *Virchows Arch* 444. 13-19.
- Drudis T, Arroyo C, Van Hoeven K, Cordon-Cardo C, Rosen PP. 1994. The pathology of low-grade adenosquamous carcinoma of the breast. An immunohistochemical study. *Pathol Annu.* 29 (Pt 2): 181-97.
- Ellis IOS SJ, Sastre-Garau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V, Peterse JL, Mukai K, Tabar L, Jacquemier J, Cornelisse CJ, Sasco AJ, Kaaks R, Pisani P, Goldgar DE, Devilee P, Cleton-Jansen MJ, Borresesn-Dale AL, van't Veer L, Sapino A. 2003. Adenoid-cystic carcinoma. In: Tavassoli FAD, P. ed, *Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs.* Lyon: IARC Press. 44-45.
- Fisher ER, Palekar AS, Gregorio RM, Paulson JD. 1983. Mucoepidermoid and squamous cell carcinomas of breast with reference to squamous metaplasia and giant cell tumors. *Am J Surg Pathol.* 7(1): 15-27.
- Foschini MP, Pizzicannella G, Peterse JL, Eusebi V. 1995. Adenomyoepithelioma of the breast associated with low-grade adenosquamous and sarcomatoid carcinomas. *Virchow Arch.* 427(3): 243-50.
- Foschini MP, Eusebi V. 1998. Carcinomas of the breast showing myoepithelial cell differentiation. A review of the literature. *Virchows Arch.* 432(4): 303-10.
- Foschini MP, Eusebi V. 2009. Rare (new) entities of the breast and medullary carcinoma. *Pathology.* 41 (1): 48-56.
- Foschini MP, Krausz T. 2010. Salivary gland-type tumors of the breast: a spectrum of benign and malignant tumors including "triple negative carcinomas" of low malignant potential. *Semin Diagn Pathol.* 27(1): 77-90.
- García JJ, Hunt JL, Weinreb I, McHugh JB, Barnes EL, Cieply K, Dacic S, Seethala RR. 2011. Fluorescence in situ hybridization for detection of MAML2 rearrangements in oncocytic mucoepidermoid carcinomas: utility as a diagnostic test. *Hum Pathol.* 42(12): 2001-9.

- Ghabach B, Anderson WF, Curtis RE, Huycke MM, Lavigne JA, Dores GM. 2010. Adenoid cystic carcinoma of the breast in the United States (1977 to 2006): a population-based cohort study. *Breast Cancer Res.* 12(4):R54.
- Geyer FC, Lambros MB, Natrajan R, Mehta R, Mackay A, Savage K, Parry S, Ashworth A, Badve S, Reis-Filho JS. 2010. Genomic and immunohistochemical analysis of adenosquamous carcinoma of the breast. *Mod Pathol.* 23(7): 951-60.
- Hamper K, Lazar F, Dietel M, Caselitz J, Berger J, Arps H, Falkmer U, Auer G, Seifert G. 1990. Prognostic factors of adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a retrospective evaluation of 96 cases. *J Oral Pathol Med.* 19(3): 101-7.
- Harris G.C, O'Malley F.P, Pinder S.E. 2011. Invasive Carcinoma: Special Types. In: O'Malley F.P, Pinder S.E, Mulligan A.M. *Breast Pathology.* 2. Aufl. Philadelphia. Elsevier. 241, 247.
- Holst VA, Marshall CE, Moskaluk CA, Frierson HF jr. 1999. KIT protein expression and analysis of c-kit gene mutation in adenoid cystic carcinoma. *Mod. Pathol.* 12(10): 956-60.
- Jones MW, Norris HJ, Snyder RC. 1989. Infiltrating syringomatous adenoma of the nipple. A clinical and pathological study of 11 cases. *Am J Surg Pathol.* 13(3): 197-201.
- Jones C, Nonni AV, Fulford L, Merrett S, Chaggar R, Eusebi V, Lakhani SR. 2001. CGH analysis of ductal carcinoma of the breast with basaloid/myoepithelial cell differentiation. *Br J Cancer.* 85(3): 422-7.
- Kasami M, Olson SJ, Simpson Jf, Page DL. 1998. Maintenance of polarity and a dual cell population in a adenoid cystic carcinoma of the breast: an immunohistochemical study. *Histopathology.* 32(3): 232-8.
- Koyama M, Kurotaki H, Yagihashi N, Aizawa S, Sugai M, Kamata Y, Oyama T, Yagihashi S. 1997. Immunohistochemical assessment of proliferative activity in mammary adenomyoepithelioma. *Histopathology.* 31(2): 134-9.
- Ku J, Bennett RD, Chong KD, Bennett IC. 2004. Syringomatous adenoma of the nipple. *Breast.* 13(5): 412-5.
- Langbein L, Cribier B, Schirmacher P, Praetzel-Wunder S, Peltre B, Schweizer J. 2008. New concepts on the histogenesis of eccrine neoplasia from keratin expression in the normal eccrine gland, syringoma and poroma. *Br J Dermatol.* 159(3): 633-45.
- Lee WY, Cheng L, Cang TW. 1999. High grade adenosquamous carcinoma of the breast diagnosed by fine needle aspiration cytology. *Acta Cytol.* 43(2): 323-5.
- Loose JH, Patchefsky AS, Hollander IJ, Lavin LS, Cooper HS, Katz SM. 1992. Adenomyoepithelioma of the breast. A spectrum of biologic behavior. *Am J Surg Pathol.* 16(9): 868-76.
- Luna MA. 2006. Salivary mucoepidermoid carcinoma: revisited. *Adv Anat Pathol.* 13(6): 293-307.
- McLaren BK, Smith J, Schuyler PA, Dupont WD, Page DL. 2005. Adenomyoepithelioma: clinical, histologic, and immunohistologic evaluation of a series of related lesions. *Am J Surg Pathol.* 29(10): 1294-9.
- Marchiò C, Weigelt B, Reis-Filho JS. 2010. Adenoid cystic carcinomas of the breast and salivary glands (or 'The strange case of Dr Jekyll and Mr Hyde' of exocrine gland carcinomas). *J Clin Pathol.* 63(3): 220-8.
- Moran CA, Suster S, Carter D. 1990. Benign mixed tumors (pleomorphic adenomas) of the breast. *Am J Surg Pathol.* 14(10): 913-21.

- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 31(1): 11-24.
- Noel JC, Buxant F, Engohan-Aloghe C. 2010. Low-grade adenosquamous carcinoma of the breast--A case report with a BRCA1 germline mutation. *Pathol Res Pract*. 15;206(7): 511-3.
- Otterbach F, Schmid KW. 2006. Tumoren vom Speicheldrüsentyp in der Mamma. *Der Pathologe*. 27:363-372.
- Oo KZ, Xiao PQ. 2009. Infiltrating syringomatous adenoma of the nipple: clinical presentation and literature review. *Arch Pathol Lab Med*. 133(9): 1487-9.
- Palmer JO, Ghiselli RW, McDivitt RW. 1990. Immunohistochemistry in the differential diagnosis of breast diseases. *Pathol Annu*. 25 Pt 2: 287–315.
- Pia-Foschini M, Reis-Filho JS, Eusebi V, Lakhani SR. 2003. Salivary gland-like tumours of the breast: surgical and molecular pathology. *J Clin Pathol*. 56:7. 497-504.
- Plaza JA, Lopez JI, Garcia S, de Miguel C. 1993. Adenomyoepithelioma of the breast. Report of two cases. *Arch Anat Cytol Pathol*. 41(2): 99-101.
- Raju U, Zarbo RJ, Kubus J, Schultz DS. 1993. The Histologic Spectrum of Apocrine Breast Proliferations: A Comparative Study of Morphology and DNA Content by Image Analysis. *Hum Pathol* 24(2): 173–181.
- Ro JY, Silva EG, Gallager HS. 1987. Adenoid cystic carcinoma of the breast. *Hum Pathol*. 18(12): 1276-81.
- Rosen PP. 1983. Syringomatous adenoma of the nipple. *Am J Surg Pathol*. 7(8): 739-45.
- Rosen PP, Ernsberger D. 1987. Low-grade adenosquamous carcinoma. A variant of metaplastic mammary carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 11(5): 351-8.
- Rosen P.P. 2009. Rosen´s Breast Pathology. 3. Aufl. New York. Lippincott Williams&Wilkins. 470-505.
- Scali EP, Ali RH, Hayes M, Tyldesley S, Hassell P. 2013. Low-grade adenosquamous carcinoma of the breast: imaging and histopathologic characteristics of this rare disease. *Can Assoc Radiol J*. 64(4): 339-44.
- Seethala RR, Barnes EL, Hunt JL. 2007. Epithelial-myoeplithelial carcinoma: a review of the clinicopathologic spectrum and immunophenotypic characteristics in 61 tumors of the salivary glands and upper aerodigestive tract. *Am J surg Pathol*. 31(1): 44-57.
- Shin SJ, Rosen PP. 2002. Solid variant of mammary adenoid cystic carcinoma with basaloid features: a study of nine cases. *Am J Surg Pathol*. 26(4): 413-20.
- Shizawa S, Sasano H, Suzuki T, Ishii H, Takeda T, Nagura H. 1997. Low-grade adenosquamous carcinoma of the breast: a case report with cytologic findings and review of the literature. *Pathol Int*. 47(4): 264-7.
- Simpson RH, Cope N, Skálová A, Michal M. 1998. Malignant adenomyoepithelioma of the breast with mixed osteogenic, spindle cell, and carcinomatous differentiation. *Am J Surg Pathol*. 22(5): 631-6.
- Slaughter MS, Pomerantz RA, Murad T, Hines JR. 1992. Infiltration syringomatous adenoma of the nipple. *Surgery*. 111(6): 711-3.
- Soo K, Tan PH. 2012. Low-grade adenosquamous carcinoma of the breast. *J Clin Pathol*. 66(6): 506-11.

- Suster S, Moran CA, Hurt MA. 1991. Syringomatous squamous tumors of the breast. *Cancer*. 1; 67 (9): 2350-5.
- Tavassoli FA, Norris HJ. 1986. Mammary adenoid cystic carcinoma with sebaceous differentiation. A morphologic study of cell types. *Arch Pathol Lab Med*. 110. S.1045-1053.
- Tavassoli FA. 1991. Myoepithelial Lesions of the Breast. Myoepitheliosis, Adenomyoepithelioma, and Myoepithelial Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 15(6): 554–568.
- Tavassoli FA, Devilee P. 2003. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of tumours of the breast and Female Genital Organs. IARC Press: Lyon 2003. S.38-39.
- Trendell-Smith NJ, Peston D, Shousha S. 1999. Adenoid cystic carcinoma of the breast: a tumour commonly devoid of oestrogen receptors and related proteins. *Histopathology*. 35(3): 241-8.
- Van Hoeven KH, Drudis T, Cranor ML, Erlandson RA, Rosen PP. 1993. Low-grade adenosquamous carcinoma of the breast. A clinicopathologic study of 32 cases with ultrastructural analysis. *Am J Surg Pathol*. 17(3): 248-58.
- Weinreb I, Seethala RR, Perez-Ordóñez B, Chetty R, Hoschar AP, Hunt JL. 2009. Oncocytic mucoepidermoid carcinoma: clinicopathologic description in a series of 12 cases. *Am J Surg Pathol* 33(3): 409-16.
- Welsch U. 2006. *Lehrbuch Histologie*. 2.Aufl. Elsevier. S.67, 352-356, 537-546.
- West RB, Kong C, Clarke N, Gilks T, Lipsick JS, Cao H, Kwok S, Montgomery KD, Varma S, Le QT. 2011. MYB expression and translocation in adenoid cystic carcinomas and other salivary gland tumors with clinicopathologic correlation. *Am J Surg Pathol*. 35(1): 92-9.
- Wetterskog D, Lopez-Garcia MA, Lambros MB, A'Hern R, Geyer FC, Milanezi F, Cabral MC, Natrajan R, Gauthier A, Shiu KK, Orr N, Shousha S, Gatalica Z, Mackay A, Palacios J, Reis-Filho JS, Weigelt B. 2012. Adenoid cystic carcinomas constitute a genomically distinct subgroup of triple-negative and basal-like breast cancers. *J Pathol*. 226(1): 84-96.
- WHO Global Burden of Disease. 2004. Online im Internet. URL: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html> (Stand 21.05.2014, 11:30)

9 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Löning bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Herrn Dr. med. Werner Böcker danke ich besonders für seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Gleiches gilt für Prof. Dr. rer. nat. habil. Igor Buchwalow, der mich in allen technischen Belangen unterstützt hat.

Ein großer Dank geht an Frau Vera Samoilova, für ihre hervorragende MTLA-Tätigkeit.

Bei meiner Familie möchte ich mich für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums bedanken, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens danke ich sehr.

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit ausdrücklich, dass ich diese wissenschaftliche 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: