

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. med. Werner Böcker

**Differentielle Expression von Östrogenrezeptoren und Ki67 im
normalen Mammagewebe und in proliferativen Mammaläsionen**

DISSERTATION

zur
Erlangung des doctor medicinae

Medizinische Fakultät der
Westfälischen Wilhelms - Universität Münster

vorgelegt von

Catharina Löhnert
aus Hannover
2009

Gedruckt mit Genehmigung der Westfälischen Wilhelms - Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Böcker

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig Kiesel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2009

Meinen Eltern Brigitte und Bruno Löhnert

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Pathologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Werner Böcker
Referent: Univ.-Prof. Dr. Werner Böcker
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig Kiesel

ZUSAMMENFASSUNG

Differentielle Expression von Östrogenrezeptoren und Ki67 im normalen Mammagewebe und in proliferativen Mammaläsionen

Doktorandin: Catharina Löhnert

Zur Unterscheidung der Malignitätspotentiale verschiedener proliferativer Läsionen der weiblichen Brust, wurden in dieser Arbeit normales Mammagewebe, benigne proliferative Läsionen wie die DH, sowie die Vorläuferläsionen LN, FEA, ADH und DCIS in immunhistochemischen Doppelmarkierungen auf die Koexpression der luminalen Zytokeratine 8/18, der basalen Zytokeratine 5/6, des Östrogenrezeptors ER sowie des Proliferationsmarkers Ki67 untersucht.

In Abgrenzung zum traditionellen Modell zur Karzinogenese des Mammakarzinoms, welches auf einer linearen Malignitätsentwicklung intraduktaler epithelialer proliferativer Läsionen, ausgehend von low grade Läsionen resultierend in high grade Läsionen basiert, wird nach aktueller Studienlage ein anderes Modell der Karzinogenese für wahrscheinlicher gehalten, welches nicht auf linearer Progression beruht. Es besagt, dass jede Zelle des glandulären Zelldifferenzierungsweges als Ursprungszelle für den Beginn der malignen Proliferation gelten kann [1].

Das Progenitorzellmodell geht von einer CK5/14 positiven Progenitorzelle aus, welche sich über eine CK5/14 und CK8/18 positive Intermediärzelle zu einer CK8/18 positiven glandulären Zelle differenziert. Die immunhistochemischen Färbungen mit CK8/18 und CK5/6 ermöglichen in dieser Arbeit die Zuordnung der proliferierenden Zellen zu einem Immunphänotyp und geben einen funktionellen Einblick aus welcher Ursprungszelle des Progenitorzellmodells die Läsion entstanden ist.

Die Ergebnisse bestätigen, dass die DH den benignen proliferativen Läsionen zuzuordnen ist. Anhand von Malignitätskriterien wie steigender Proliferationsrate und Koexpression von ER und Ki67 in CK8/18 positiven Tumorzellen lassen sich die malignen Vorläuferläsionen LN, FEA, ADH und DCIS in den angewandten Doppelfärbungen von der DH und dem Normalgewebe abgrenzen.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Immunphänotypisierung anhand der Expression von CK8/18, CK5/6, ER und Ki67 ermöglicht die Einteilung der untersuchten Gewebe in benigne Proliferationen und maligne Vorläuferläsionen, die im klinisch pathologischen Alltag die normale Histologie ergänzen kann.

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2009

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung..... 9
1.1	<u>Histologie</u>..... 10
1.1.1	Normales Mammagewebe..... 10
1.1.2	Duktales Hyperplasie..... 10
1.1.3	Lobuläre Neoplasie..... 11
1.1.4	Flach epitheliale Atypie..... 11
1.1.5	Atypische duktales Hyperplasie..... 12
1.1.6	Duktales Carcinoma in situ..... 12
1.2	<u>Progenitorzellmodell der epithelialen Regeneration</u>..... 12
1.3	<u>Ausprägung und Folgen der Östrogenrezeptorverteilung</u>.... 13
1.4	<u>CK8/18 und CK5/6</u>..... 14
2	Material und Methoden..... 15
2.1	<u>Auswertungsverfahren</u>..... 15
2.2	<u>Immunhistochemische Färbetechniken der Doppelmarkierungen</u>..... 16
2.2.1	Vorbereitung der Schnitte..... 16
2.2.2	Einzelschritte der Doppelmarkierungen..... 17
2.2.3	Verwendete Antikörper..... 18
2.3	<u>Ergänzende Immunfluoreszenzmarkierungen</u>..... 19
3	Ergebnisse..... 20
3.1	<u>Anteil CK8/18 bzw. CK5/6 positiver Zellen</u>..... 21
3.2	<u>Verteilung von ER und Ki67</u>..... 23
3.3	<u>Anteil CK8/18 bzw. CK5/6 positiver Zellen unter den ER positiven Zellen</u>..... 24
3.4	<u>Anteil CK8/18 bzw. CK5/6 positiver Zellen an der Ki67(+) Gesamtfraktion</u>..... 26

3.5	<u>Anteil der ER oder Ki67 exprimierenden Zellen im CK8/18 positiven Zellpool</u>	29
3.6	<u>Anteil der ER oder Ki67 koexprimierenden Zellen im CK5/6 positiven Zellpool</u>	31
3.7	<u>Verteilung der Immunphänotypen in den verschiedenen Läsionen</u>	33
3.7.1	Doppelmarkierung von CK8/18 und ER.....	33
3.7.2	Doppelmarkierung von CK5/6 und ER.....	35
3.7.3	Doppelmarkierung von CK8/18 und Ki67.....	37
3.7.4	Doppelmarkierung von CK5/6 und Ki67.....	39
4	Diskussion	42
4.1	<u>Konzepte der Tumorgenese</u>	42
4.2	<u>Immunphänotyp des normalen Mammagewebes</u>	43
4.3	<u>Intraduktale Proliferationen</u>	47
4.3.1	Benigne proliferative Läsionen.....	47
4.3.1.1	Duktale Hyperplasie.....	48
4.3.2	Vorläuferläsionen invasiver Karzinome.....	53
4.3.2.1	Lobuläre Neoplasie.....	54
4.3.2.2	Flach epitheliale Atypie, atypische duktale Hyperplasie und duktales Carcinoma in situ im Vergleich.....	58
4.4	<u>Karzinogenese des Mammarkarzinoms in Bezug zur Progenitorzelltheorie</u>	63
5	Zusammenfassung	73
6	Verzeichnis der Abkürzungen	78
7	Literaturverzeichnis	79
8	Tabellenverzeichnis	82
9	Abbildungsverzeichnis	83
10	Diagrammverzeichnis	84
11	Rohdaten	85

11.1	<u>Rohdaten, Einzelwerte der verschiedenen Läsionen</u>	85
11.1.1	Läppchen/ Gänge: ER gegen CK8/18.....	85
11.1.2	Läppchen/ Gänge: ER gegen CK5/6.....	86
11.1.3	Läppchen/ Gänge: Ki67 gegen CK8/18.....	87
11.1.4	Läppchen/ Gänge: Ki7 gegen CK5/6.....	88
11.1.5	DH: ER gegen CK8/18.....	89
11.1.6	DH: ER gegen CK5/6.....	89
11.1.7	DH: Ki67 gegen CK8/18.....	89
11.1.8	DH: Ki67 gegen CK5/6.....	90
11.1.9	LN/ FEA/ ADH/ DCIS/ tub CA: ER gegen CK8/18.....	90
11.1.10	LN/ FEA/ ADH/ DCIS/ tub CA: ER gegen CK5/6.....	91
11.1.11	LN/ FEA/ ADH/ DCIS/ tub CA: Ki67 gegen CK8/18.....	92
11.1.12	LN/ FEA/ ADH/ DCIS/ tub CA: Ki67 gegen CK5/6.....	93
11.2	<u>Summentabellen</u>	94
11.2.1	Summentabelle ER gegen CK8/18.....	94
11.2.2	Summentabelle ER gegen CK5/6.....	95
11.2.3	Summentabelle Ki67 gegen CK8/18.....	95
11.2.4	Summentabelle Ki67 gegen CK5/6.....	96
12	Danksagung	97
13	Lebenslauf	98

1 Einleitung

Brustkrebs ist eine komplexe Erkrankung multifaktorieller Genese. Jedes Jahr werden weltweit über eine Million neue Fälle diagnostiziert. Sie machen den Brustkrebs zur häufigsten malignen Erkrankung der Frau. Bisher hat man vermutet, die Karzinogenese des Mammakarzinoms basiere auf einer linearen Tumorprogression, wobei sich eine Drüsenzelle über das Zwischenstadium einer Hyperplasie zum insitu Karzinom und weiter zu einem invasiven Karzinom entwickeln soll [7]. Ergänzend hierzu ist man von einem anatomischen Zweizellmodell der weiblichen Brustdrüse ausgegangen mit einer basalen myoepithelialen Zellschicht, welche z.B. sm-Aktin exprimiert, sowie einer luminalen glandulären Zellschicht, welche durch eine Expression von CK8/18 gekennzeichnet ist [8]. Zellen, welche CK5 und/oder CK14 exprimieren, werden in diesem Modell myoepithelialen bzw. modifizierten myoepithelialen Zellen zugeordnet.

Doppelimmunfluoreszenztechniken haben gezeigt, dass neben den CK5/14 koexprimierenden myoepithelialen Zellen des menschlichen Brustdrüsenepithels ausschließlich CK5/14-exprimierende Zellen existieren, denen eine besondere Bedeutung in der physiologischen Regeneration der weiblichen Brust zukommt. Dieses Modell [1] geht von einer CK5/14 positiven Stamm- oder Progenitorzelle aus, welche sich in zwei möglichen Differenzierungspfaden entwickeln kann. Im glandulären Differenzierungspfad entwickelt sich über eine CK5/14 und CK8/18 koexprimierende Intermediärzelle eine reife Drüsenzelle, welche nur noch CK8/18 exprimiert. Der myoepitheliale Differenzierungsweg zeigt intermediäre CK5/14 und sm-Aktin koexprimierende Zellen, welche sich zu terminal differenzierten Myoepithelzellen entwickeln, die nur noch sm-Aktin exprimieren. Interessanterweise lassen sich den verschiedenen Subtypen des Progenitorzellkonzeptes unterschiedliche Phänotypen der menschlichen Mammakarzinome zuordnen [1]. Über 90% der invasiven Karzinome zeigen einen ausschließlich glandulären Phänotyp aus CK8/18 positiven und CK5/14 negativen Tumorzellen. Nur etwa 1% der invasiven Karzinome exprimieren ausschließlich CK5/14. Sie entsprechen phänotypisch Progenitorzellen. Eine weitere Gruppe bilden weniger als 10% der invasiven Karzinome, sie koexprimieren CK5/14 und CK8/18 und gehören fast ausnahmslos zur Gruppe der hochmalignen Karzinome.

Von den Karzinomen abzugrenzen sind die benignen proliferativen Läsionen, welche nach heutigem Wissensstand nicht als Vorläuferläsionen des invasiven Mammakarzinoms angesehen werden [1]. Die duktale Hyperplasie ist eine solche gutartige Proliferation, welche durch ein charakteristisches Mosaik stark proliferierender CK5/14 positiver Zellen und einen Anteil CK5/14 negativer Zellen gekennzeichnet ist. Anhand dieses Mosaiks kann man mit immunhistochemischen Techniken benigne Läsionen differenzialdiagnostisch

von malignen, phänotypisch rein glandulären intraduktalen Läsionen unterscheiden.

In dieser Arbeit soll die Verteilung von Östrogenrezeptoren und dem Proliferationsfaktor Ki67 in Bezug auf den zellulären Phänotyp im normalen Brustdrüsenepithel sowie in duktalem Hyperplasien bzw. duktalem und lobulären Neoplasien als Vorläuferläsionen des invasiven Karzinoms analysiert werden.

1.1 Histologie

1.1.1 Normales Gewebe

Die Entwicklung der weiblichen Brust ist ein Prozess, welcher bereits in der Embryonalphase beginnt. Das größte Wachstum findet in der Pubertät statt, wobei sowohl das glanduläre Gewebe als auch das umliegende Stroma wächst. Entwicklung und Differenzierung der Mamma können mehrere Jahre andauern und sind erst mit Beendigung der ersten vollständigen Schwangerschaft abgeschlossen [5]. Die weibliche Brustdrüse kann in 15-40 Einzeldrüsen eingeteilt werden. Die kleinste funktionelle Einheit bilden die terminalen Gänge mit den dazugehörigen Läppchen.

Diese terminale duktalem lobuläre Einheit (TDLE) ist von lockerem bindegewebigem Stroma umgeben, welches spezialisiertes hormonsensitives Gewebe darstellt.

In der erwachsenen weiblichen Brust besteht das Epithel aus luminal gelegenen glandulären Zellen. Während diese im Gang mehrreihig angeordnet sind, finden sich im Läppchen kuboidale glanduläre Zellen mit stark gefärbten, einheitlich geformten Kernen. Die Epithelzellen werden nach außen von einer Myoepithelzellschicht umrandet, welche im Gangsystem einen ausgeprägteren Zusammenhalt zeigt, als im terminalen duktalem lobulären System. Das Parenchym ist außen von einer Basalmembran umrandet.

1.1.2 Duktale Hyperplasie

Die normale duktalem Hyperplasie (DH) zählt zu den benignen proliferativen Brustveränderungen und tritt makroskopisch nicht in Erscheinung. Es handelt sich um eine rein epitheliale intraduktale Proliferation, die meist in der terminal duktalem lobulären Einheit lokalisiert ist, aber auch an anderen Stellen des Gangsystems vorzufinden ist. Die DH kann in Kombination mit anderen benignen Läsionen, wie Papillomen, juveniler Papillomatosis oder fibroepithelialen Läsionen auftreten [1].

Man unterscheidet milde Formen mit nur drei bis vier Zelllagen über der Basalmembran und Formen, bei denen das gesamte Drüsenlumen ausgefüllt ist. Die DH ist durch Heterogenität der Zellen charakterisiert. Sie variieren in

Größe und Form. Auch die Zellkerne unterscheiden sich in Größe, Form und Färbungsintensität. Kennzeichnend für die DH sind sekundäre unregelmäßige Lumina, das so genannte fenestrierende Wachstum.

Wie im normalen Brustdrüsenepithel finden sich in der DH einerseits rein CK5/14 positive Zellen, wie auch intermediäre glanduläre Zellen die CK5/14 und CK8/18 koexprimieren, sowie differenzierte glanduläre Zellen die nur CK8/18 enthalten. Diese glandulären CK8/18 positiven Zellen sind das Ergebnis eines normalen Reifungsprozesses, äquivalent zum normalen Brustepithel [1]. Die CK5/14 positiven Zellen sind in der DH in einem typischen Mosaik mit den CK5/14 negativen Zellen angeordnet; entsprechendes gilt für die Expression von CK8/18. An diesem Mosaik kann man die benigne Läsion differentialdiagnostisch von duktalem und lobulären Neoplasien unterscheiden.

1.1.3 Lobuläre Neoplasie

Als lobuläre Neoplasie (LN) wird die multizentrische, multifokale, meist bilaterale Proliferation atypischer Zellen in der terminal duktalem lobulären Einheit bezeichnet. Das glanduläre Epithel der Acini und teilweise auch der intralobulären Gänge wird durch kleine monomorphe Tumorzellen ersetzt, wobei der lobuläre Aufbau erhalten bleibt. Die Tumorzellen sind rund, kuboidal bis polygonal und haben häufig ein helles Zytoplasma. Sie wachsen nicht kohäsiv, da das Adhäsionsmolekül E-Cadherin fehlt [1]. Die Zellkerne sind rund bis oval, mit kleinem Nukleolus. Die Tumorzellen haben einen CK8/18 positiven CK5/14 negativen Immunphänotyp und exprimieren Östrogenrezeptoren. Nicht vollständig ausgefüllte Acini enthalten luminal noch einzelne benigne Zellen des normalen lobulären Epithels, welche CK5/14 positiv sind. Die Myoepithelzellen bleiben entweder basal erhalten oder liegen zwischen den neoplastischen Zellen. Die Basalmembran bleibt erhalten, ist jedoch im normalen HE- Schnitt nicht sichtbar.

1.1.4 Flach epitheliale Atypie

Die flach epitheliale Atypie (FEA) wird von der WHO als vermutlich neoplastische Läsion der terminal duktalem lobulären Einheit definiert, bei der das lumenale ursprüngliche Epithel von einem geringgradig atypischen Epithel ersetzt wird, welches in den mehr oder weniger stark erweiterten Acini einreihig oder mehrreihig angeordnet ist [2]. Die Zellkerne sind alle monomorph rund bis ovoid. Nach außen wird die Läsion von einer Basalmembran begrenzt. Die FEA kann mit einem low grade DCIS und tubulären Karzinomen assoziiert sein [1].

1.1.5 Atypische duktale Hyperplasie

Die atypische duktale Hyperplasie (ADH) findet ihren Ursprung in der terminalen duktal lobulären Einheit. Interlobuläre Gänge sind nicht betroffen. Es handelt sich um eine Proliferation intraluminaler epithelialer Zellen mit atypischer Morphologie. Es gibt momentan keine allgemein akzeptierte Definition für die ADH. In dieser Arbeit wurden die nachfolgenden Kriterien angewandt: die Duktuli der terminal duktal lobulären Einheit sind durch monomorphe Tumorzellen mit runden, leicht vergrößerten Kernen ausgeweitet. Die neoplastische Wachstumsform der ADH zeigt cribriforme, mikropapilläre und brückenbildende Strukturen ähnlich denen des low grade DCIS. Die Zellen der ADH haben einen CK5/14 negativen und CK8/18 positiven Immunphänotyp [1]. Einzelne Zellen des normalen Epithels bleiben luminal erhalten und exprimieren CK5/14. Die Zellkerne der ADH sind ER positiv.

1.1.6 Duktales Carcinoma in situ

Das duktale Carcinoma in situ (DCIS) ist nicht als morphologisch einheitliche Läsion zu betrachten, sondern vielmehr als heterogene Gruppe nichtinvasiver, maligner intraduktaler Proliferationen, die sich in Zytologie, Aufbau, genetischen Veränderungen und klinischen Eigenschaften unterscheiden. Seinen Ursprung findet das DCIS in Epithelzellen der terminal duktal lobulären Einheit [6]. Die proliferierenden epithelialen Tumorzellen entfalten die duktales und lobulären Strukturen. Charakteristischerweise wird beim DCIS im Gegensatz zur ADH das extralobuläre Gangsystem mit einbeschlossen; der Tumor breitet sich segmental im Gangsystem aus. Das DCIS wächst in 99% der Fälle unizentrisch und neigt bei unvollständiger Entfernung zu lokalen Rezidiven [6].

Man unterscheidet anhand der Zellkernmorphologie drei verschiedene Malignitätsgrade (niedriger, intermediärer, hoher Malignitätsgrad). Wachstumsmuster, Nekrosen und Mikroverkalkungen sind weitere Merkmale des DCIS. 95% der DCIS zeigen einen ausschließlich glandulären Phänotyp, sie sind CK8/18 positiv und CK5/14 negativ. Das DCIS Grad 3 ist in einem geringen Prozentsatz von etwa 3% CK5/14 positiv. Das DCIS ist als direkte Vorläuferläsion invasiver Karzinome zu betrachten.

1.2 Progenitorzellmodell der epithelialen Regeneration

Das Epithel der erwachsenen weiblichen Brust besteht aus phänotypisch unterschiedlichen Zellen. Der funktionelle Aufbau der TDLE der normalen Brust wird deutlich, wenn man in einer Doppelimmunfluoreszenztechnik hochmolekulare Zytokeratine wie CK5/14 und linienspezifische Marker, wie CK8/18 für die glanduläre Zelllinie und sm-Aktin für die myoepitheliale Zelllinie,

einsetzt. Mit Hilfe dieser Doppelimmunfluoreszenzfärbung wurde ein neues Modell von Regeneration und Differenzierung des normalen Brustepithels entwickelt.

Das Progenitorzellmodell [1], [9], [14] beruht auf einer gemeinsamen, nur für CK5/14 positiven Progenitorzelle, die sich entweder in der glandulären Zelllinie zu einer CK8/18 positiven glandulären Zelle differenziert, oder in der myoepithelialen Zelllinie zu einer sm-Aktin positiven Myoepithelzelle. In Zellkulturen konnte weiterhin die Fähigkeit zur Selbsterneuerung dieser CK5/14 positiven Zellen nachgewiesen werden.

In der TDLE kommen die CK5/14 positiven Progenitorzellen einzeln oder in Gruppen vor und liegen im Gegensatz zu Progenitorzellen anderer Drüsenepithelien, wie Prostata oder Speicheldrüse, luminal. Wenn man die Entwicklung der glandulären Zelllinie der TDLE betrachtet, so fällt auf, dass es nur einen geringen Anteil CK5/14 positiver Zellen gibt. Der reife glanduläre Zelltyp exprimiert CK8/18 in Abwesenheit von CK5/14. CK8/18 positive glanduläre Zellen können in Östrogenrezeptor alpha positive und negative Untergruppen eingeteilt werden, wohingegen CK5/14 positive Zellen Östrogenrezeptor alpha negativ sind [1]. Die Verteilungsmuster von Östrogenrezeptoren in CK8/18 und CK5/14 positiven Zellen werden in dieser Arbeit mit Hilfe immunhistochemischer Doppelmarkierungen untersucht, mit dem Ziel Informationen über funktionelle Charakteristiken der einzelnen Zelltypen zu erhalten.

Während die CK8/18 positiven glandulären Zellen im Epithel stetig erneuert werden, zeigen die sm-Aktin positiven Myoepithelzellen ein nur geringes Proliferationspotential. Der terminal differenzierte Myoepithelzelltyp exprimiert schließlich nur noch sm-Aktin [1].

1.3 Ausprägung und Folgen der Östrogenrezeptorverteilung

Östrogen spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von Proliferation und Differenzierung des weiblichen Brustepithels. Es ist mit epidemiologischen Risikofaktoren assoziiert und beeinflusst die Expression anderer Gene [10]. Die Anzahl und Verteilung der Östrogenrezeptoren (ER) sind bei der Entwicklung einer Brustkrebserkrankung von Bedeutung. Sie sind entscheidend für therapeutische Konsequenzen bei Krebspatientinnen.

Mithilfe von monoklonalen Antikörpern können ER positive Zellen identifiziert und quantifiziert werden. Östrogen wirkt in den Zielzellen über Zellkernrezeptoren. Es führt zu mitotischen Signalen und anti-apoptischen Mechanismen, welche das Zellwachstum begünstigen. Bisher wurden der Östrogenrezeptor-alpha und Östrogenrezeptor-beta identifiziert. Immunhistochemische Studien belegen, dass ER positive Zellen in der TDLE nur luminal zu finden sind [1]. Während ER-beta in ca. 70% der glandulären epithelialen Zellkerne zu finden ist, hängt die Verteilung von ER-alpha von

verschiedenen Faktoren ab. Hierzu zählen Pubertät, Zyklusphase, Schwangerschaft und Menopause. Prämenopausale Frauen zeigen unterschiedliche ER Expressionsraten in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Menstruationszyklus. In der folliculären Phase ist die ER Expression doppelt so hoch wie in der Lutealphase [12]. Die Proliferationsrate steigt jedoch in der Lutealphase an [15]. Die Quantifizierung der ER in dieser Arbeit erfolgte ohne Berücksichtigung der jeweiligen Zyklusphase bei Probenentnahme.

Mit dem Alter steigt die Anzahl der Östrogenrezeptoren an und die ER positiven Zellen sind teilweise in Gruppen angeordnet [10]. Es ist fraglich, ob der erhöhte Prozentsatz ER positiver Zellen auf einer erhöhten Anzahl ER positiver Zellen oder auf einer niedrigeren Anzahl ER negativer Zellen beruht. Es wird vermutet, dass die erhöhte Anzahl ER positiver Zellen auf einen im Alter sinkenden Östrogenspiegel zurückzuführen ist [10].

In der normalen Brust sind die ER positiven Zellen negativ für den Proliferationsmarker Ki67 [11]. Die Proliferationsrate wird durch die Anzahl der Zellen bestimmt, welche auf den Antikörper Ki67 positiv reagieren. ER positive Zellen teilen sich nicht. Die Ki67 positiven proliferierenden Zellen liegen oft benachbart zu ER positiven Zellen, was einen parakrinen oder juxtakrinen Signalweg vermuten lässt, welcher zur Zellproliferation führt [13]. Obwohl zirkulierendem Östradiol ein indirekter Einfluss auf die Produktion von Wachstumsfaktoren im Zusammenhang mit ER positiven Stromazellen und damit ein Einfluss auf die Proliferation epithelialer Zellen nachgesagt wird, enthalten 60-70% der proliferierenden Zellen im normalen Brustgewebe weder ER-alpha noch ER- beta.

In der frühen Tumorgenese geht die getrennte Expression von ER und Ki67 in den Epithelzellen verloren. Der prozentuale Anteil der Zellen, die sowohl ER als auch Ki67 exprimieren, ist mit dem Risiko der Brustkrebsentstehung assoziiert [10]. In Vorläuferläsionen wie der ADH finden sich bereits proliferierende ER positive Zellen. Das Gewebe des Mammakarzinoms reagiert anders auf Östrogenexposition, als Konsequenz auf Veränderungen in Anzahl, Verteilung und Funktion der ER exprimierenden Zellen [10].

1.4 CK8/18 und CK5/6

In dieser Arbeit wurden Antikörper gegen CK5/6 und CK8/18 verwendet. CK5 gehört zu den hochmolekularen Zytokeratinen, welche von Progenitorzellen und Zellen früher glandulärer und myoepithelialer Differenzierung exprimiert werden [1]. CK8 und CK18 gehören zu den niedermolekularen Zytokeratinen, welche von glandulären Zellen exprimiert werden. In dieser Arbeit soll die Verteilung der Zytokeratine CK5/6 und CK8/18 in Bezug zum ER und dem Proliferationsfaktor Ki67 dargestellt werden um funktionelle Einblicke in den Aufbau des normalen Mammaepithels und verschiedener proliferativer Läsionen zu erlangen.

2 Material und Methoden

2.1 Auswertungsverfahren

Die verwendeten Paraffinblöcke mit Normalgewebe und den verschiedenen proliferativen Läsionen stammen aus dem Zeitraum von 1991 bis 2005 und wurden aus dem Archiv des Gerhard-Domagk-Instituts für Pathologie der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster herausgesucht. Die histopathologische Beurteilung erfolgte anhand von HE- Schnitten. Im Anschluss daran erfolgte die Anfertigung der immunhistochemischen Doppelmarkierungen.

Das normale Mammagewebe stammt aus Mammareduktionsplastiken von prämenopausalen Frauen und wies keine proliferativen Veränderungen auf.

Die ermittelten Werte für Läppchen und Gänge beschreiben prämenopausales, nicht laktierendes Mammagewebe ohne Berücksichtigung des Zyklusabschnitts in dem die Gewebeproben entnommen worden sind. In den fünf untersuchten Fällen von Normalgewebe wurden jeweils so viele Läppchen und Gänge ausgezählt, bis eine Gesamtzellzahl von 15000 Zellen erreicht wurde. Unter diesen 15000 Zellen war auch ein Anteil myoepithelialer Zellen, welcher bei der späteren Berechnung der einzelnen Zellgruppen nicht in die Gesamtzellzahl mit einberechnet wurde.

Für die Auswertung der proliferativen Läsionen wurden alle Anteile der Läsion welche im Schnitt eindeutig zu identifizieren waren ausgewertet, soweit sie ausreichend gefärbt waren. Im Durchschnitt wurde dabei eine Gesamtzellzahl von 3000-4000 Zellen erreicht, wobei einzelne Zellen, welche sich im Bereich der Läsion befanden und offensichtlich zum ursprünglichen Normalgewebe gehörten, nicht gewertet wurden.

Für die histomorphologische Aufarbeitung der Präparate wird ein Lichtmikroskop der Firma Leitz (Typ 020- 441.003) verwendet. Die Auszählung erfolgte unter 40-facher Vergrößerung. Die Zellen wurden den Gruppen der unten genannten Immunphänotypen zugeordnet, zusätzlich wurden die zugehörigen Gesamtzellzahlen ermittelt.

Durchgeführte Doppelmarkierungen und ermittelte Immunphänotypen:

Phänotyp	CK8/18(-)	CK8/18(+)	CK5/6(-)	CK5/6(+)
ER(-)	CK8/18(-) // ER(-)	CK8/18(+)// ER(-)	CK5/6(-) // ER(-)	CK5/6(+)// ER(-)
ER(+)	CK8/18(-) // ER(+)	CK8/18(+)// ER(+)	CK5/6(-) // ER(+)	CK5/6(+)// ER(+)
Ki67(-)	CK8/18(-) // Ki67(-)	CK8/18(+)// Ki67(-)	CK5/6(-) // Ki67(-)	CK5/6(+)// Ki67(-)
Ki67(+)	CK8/18(-) // Ki67(+)	CK8/18(+)// Ki67(+)	CK5/6(-) // Ki67(+)	CK5/6(+)// Ki67(+)

Tab. 2.1.1

Anzahl der ausgewerteten Doppelmarkierungen in den unterschiedlichen Läsionen:

Material	Anzahl der ausgewerteten Fälle			
	ER // CK8/18	ER // CK5/6	Ki67 // CK8/18	Ki67 // CK5/6
Normale Läppchen	5	5	5	5
Normale Gänge	5	5	5	5
Duktale Hyperplasie	4	4	4	4
Lobuläre Neoplasie	4	4	4	4
Flach epitheliale Atypie	4	4	4	4
Atypische duktale Hyperplasie	1	1	1	1
Duktales Carcinoma in situ	4	4	4	4
Tubuläres Karzinom	1	1	1	1

Tab. 2.1.2

Ausgewertete Gesamtzellzahlen der verschiedenen Gewebe:

	Läppchen	Gänge	DH	LN	FEA	ADH	DCIS	tub.C A
Ausgewertete Zellen insgesamt:	276822	70825	50679	47407	51668	15312	61574	1249 1
Durchschnittlich ausgewertete Zellzahl pro Objektträger:	13841	3541	3167	2963	3229	3828	3848	3123

Tab. 2.1.3

2.2 Immunhistochemische Färbetechniken der Doppelmarkierungen

2.2.1 Vorbereitung der Schnitte

Von den Paraffinblöcken wurden 4µm dicke Schnitte angefertigt und auf Superfrost Objektträger aufgezogen. Diese wurden dann im Brutschrank über Nacht bei 60° getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

Eine Vorbehandlung mit einem TRS- Puffer von pH 9,0 im Steamer für 30 min. war zur Demaskierung der Antigene erforderlich. Nachdem die Schnitte abgekühlt waren, wurden sie mit TBS (Trisbuffersalin) bei pH 7,4 gespült.

Vor der Immunreaktion wurden die Schnitte mit Methanol und H₂O₂ für 25 min. inkubiert, und die endogene Peroxidase gehemmt. Im Anschluss daran wurden

die Schnitte erneut in TBS bei pH 7,4 gespült. Die folgenden vier Doppelmarkierungen wurden im Dako-Autostainer durchgeführt:

Ki67 // CK8/18: Ki67, 1: 200, LSAB/HRP gegen CK8/18, 1: 800, LSAB/AP

Ki67 // CK5/6: Ki67, 1: 200, LSAB/HRP gegen CK5/6, 1: 50, LSAB/AP

ER // CK8/18: ER, 1: 200, Envision/HRP gegen CK8/18, 1: 800, LSAB/AP

ER //CK5/6: ER, 1: 200, Envision/HRP gegen CK5/6, 1: 50, LSAB/AP

2.2.2 Einzelschritte der Doppelmarkierungen

Die immunhistochemische Darstellung von Ki67 erfolgte mit der LSAB/HRP (Labelled Streptavidin Biotin/ Horseradish Peroxidase) Methode.

Einzelschritte der Ki67 Markierung:

- Primärantikörper: Ki67-AK, Inkubationszeit im Dako-Autostainer: 25 min.
- Spülen mit TBS
- biotinylierter Sekundärantikörper, Inkubationszeit: 20 min.
- Spülen mit TBS
- Streptavidin/HRP, Inkubationszeit: 20 min.
- Spülen mit TBS
- Sichtbarmachung mit dem Substrat DAB (Diaminbenzidin), Inkubationszeit: 2 x 5 min., intermittierendes Spülen mit TBS, um eine intensivere Braunfärbung zu erreichen
- Spülen mit TBS

Die immunhistochemische Darstellung des Östrogenrezeptors erfolgt mit der Envision Methode. Dabei folgt dem Primärantikörper ein Dextranpolymer, das durchschnittlich 10 Moleküle Sekundärantikörper und 70 Enzymmoleküle enthält.

Einzelschritte der ER Markierung:

- Primärantikörper: ER-AK, Inkubationszeit: 25 min.
- Spülen mit TBS
- Envision/HRP, Inkubationszeit: 30 min.
- Spülen mit TBS
- Sichtbarmachung mit dem Substrat DAB, Inkubationszeit: 2 x 5 min., intermittierendes Spülen mit TBS, um eine intensivere Braunfärbung zu erreichen

- Spülen mit TBS

Sowohl in den Ki67- als auch in den ER- Doppelmarkierungen folgt eine Behandlung mit einem Blocking Reagenz (Background Eraser, Biocare medical), welches unspezifische Bindungen unterdrückt. Mit diesem Background Eraser wird das Präparat 10 min. inkubiert. Anschließend wird es im Luftzug gereinigt, bevor die Färbung mit dem zweiten Primärantikörper CK5/6 oder CK8/18 nach der LSAB/AP Methode erfolgt.

Einzelsschritte der CK5/6 oder CK8/18 Markierung:

- zweiter Primärantikörper CK8/18-AK bzw. CK5/6-AK, Inkubationszeit: 25 min.
- Spülen mit TBS
- biotinylierter Sekundärantikörper, Inkubationszeit: 20 min.
- Spülen mit TBS
- Streptavidin/AP, Inkubationszeit: 20 min.
- Spülen mit TBS
- Sichtbarmachung mit dem Substrat RED (Fuchsin), Inkubationszeit: 2 x 8min., zwischendurch Spülen mit TBS um eine intensivere Rotfärbung zu erreichen
- Spülen mit TBS

Nach der Färbung mit dem zweiten Primärantikörper CK5/6 oder CK8/18 werden die Präparate mit Hämatoxylin 20sec. gegengefärbt. Nach fließendem Wässern werden sie in Aqua dest. überführt, in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und mit Eukitt aus Xylol eingedeckt.

2.2.3 Verwendete Antikörper

Antikörper	Art	Verdünnung	Klon	Typ	Firma	Bestellnr.
ER	monoklonal, mouse	1:200	1D5	IgG1	DakoCytomation	M7047
Ki67	monoklonal, rabbit-anti-Mensch	1:200	SP6	IgG	Labvision/Neomarkers	RM9106-S
CK5/6	monoklonal, mouse	1:50	D5/16B4	IgG1	DakoCytomation	M7237
CK8/18	monoklonal, mouse	1:800	5D3	IgG2a	Dianova	10748

Background- Eraser					Biocare medical	BE9
-----------------------	--	--	--	--	-----------------	-----

Tab. 2.1.4

2.3 Ergänzende Immunfluoreszenzmarkierungen

Zur Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Antigene wurden vergleichend Immunfluoreszenz Doppel- und Triple- Färbungen mit simultaner Darstellung von 2 bzw. 3 Antigenen verwendet [1]. Hierbei zeigte sich die exemplarische Validierung der immunhistochemisch ausgewerteten Daten.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist es, die differentielle Verteilung von ER und Ki67 im normalen Mammaepithel und in verschiedenen proliferativen Läsionen, in Bezug auf CK5/6 und CK8/18 exprimierende Zellen, zu vergleichen.

Diagramm 3.1 und Diagramm 3.2 des Ergebnisteils zeigen die prozentualen Anteile von ER, Ki67, CK5/6 und CK8/18 exprimierenden Zellen an der Gesamtzellzahl der in Läppchen und Gängen, bzw. proliferativen Läsionen vorhandenen luminalen Zellen.

Die Diagramme 3.3, 3.4, 3.5 und 3.6 zeigen in den Gruppen der ER, Ki67, CK8/18 und CK5/6 positiven Zellen die Verteilung der jeweils koexprimierten Merkmale der Doppelmarkierungen. Da die Färbungen der verschiedenen Doppelmarkierungen aus direkt benachbarten Schnitten hergestellt wurden, bei denen jeweils die gleichen Areale ausgezählt wurden, kann man davon ausgehen, dass die Anzahl beispielsweise CK5/6 positiv gewerteter Zellen in einem Schnitt in etwa der Anzahl CK5/6 positiver Zellen im nächsten Schnitt entspricht. Die Werte in Diagramm 3.1 und 3.2 basieren daher auf Mittelwerten der jeweils doppelt ermittelten Werte für die einzelnen Zellgruppen. Für CK5/6 beispielsweise ergibt sich ein Wert aus der Doppelmarkierung mit dem ER und ein weiterer aus der Kombination mit Ki67.

In den letzten vier Diagrammen des Ergebnisteils werden die Werte der vier möglichen immunphänotypischen Zellgruppen, welche sich aus der jeweiligen Doppelmarkierung ergeben, für die einzelnen Läsionen anteilig an der jeweiligen Gesamtzellzahl dargestellt.

3.1 Anteil CK8/18 bzw. CK5/6 positiver Zellen

a) Exemplarische Immunfluoreszenzdarstellung:

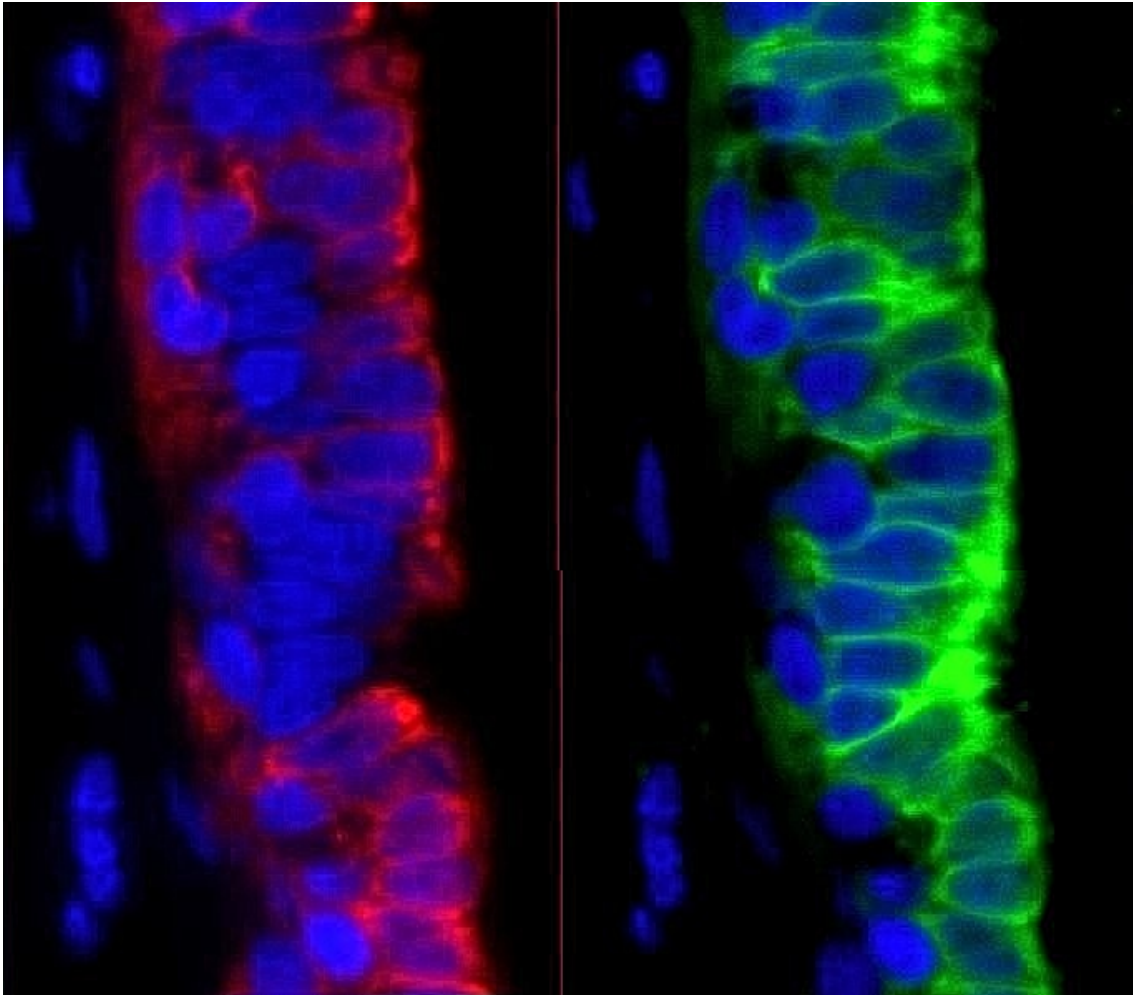


Abb.1: Doppelmarkierung des Gangepithels mit Darstellung der basalen Zytokeratine 5/6 und der luminalen Zytokeratine 8/18.

Man beachte, dass nur wenige Drüsenzellen ausschließlich CK5/6 (rot) exprimieren (sogenannte Progenitorzellen), viele Zellen CK5/6 und CK8/18 (intermediäre Zellen) und wenige ausschließlich CK8/18 (differenzierte Drüsenepithelien).

b) Auswertung der Immunhistochemischen Doppelmarkierungen:

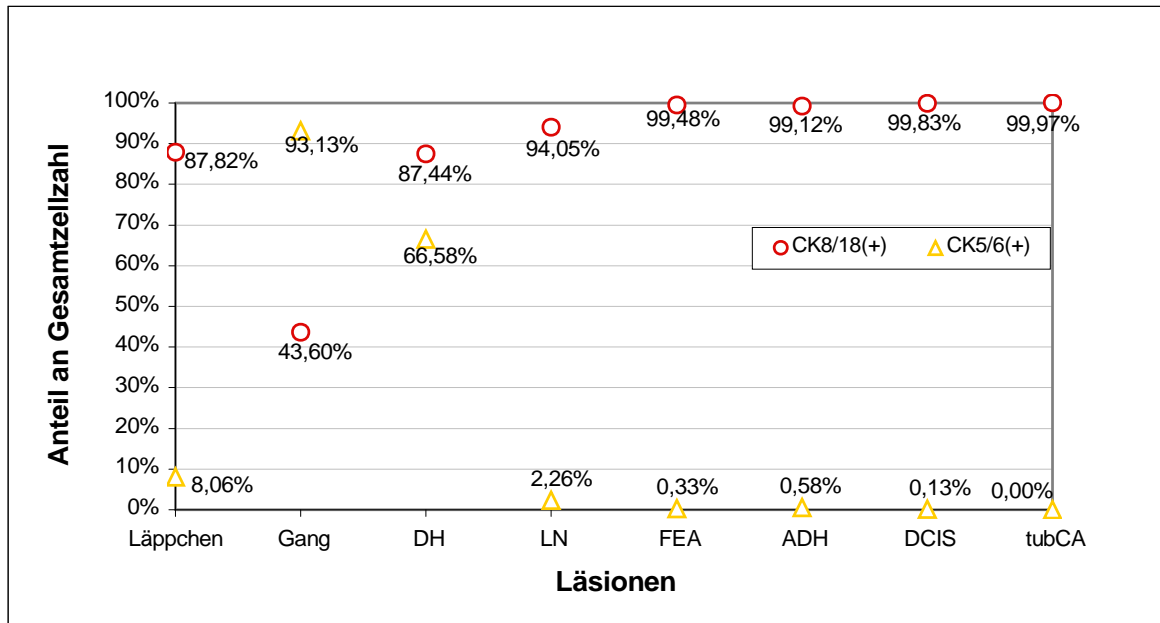


Diagramm 3.1: Anteil CK8/18(+) Zellen und CK5/6(+) Zellen in verschiedenen Läsionen gemessen an der Gesamtzellzahl.

In dieser Darstellung werden die für CK5/6 und CK8/18 ermittelten Werte in den verschiedenen Läsionen dargestellt. Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte für CK5/6 und CK8/18, welche sich aus den Einzelwerten der Doppelmarkierung mit Ki67 einerseits und den Werten der Doppelmarkierung mit ER andererseits zusammensetzen und anteilig an der Gesamtzellzahl dargestellt werden. Die zugrunde liegenden Gesamtzellzahlen sind in Tabelle 2.1.3 aufgeführt.

Betrachtet man die Zytokeratine CK8/18 und CK5/6 im gesunden Läppchen, so finden sich 87,8% CK8/18 positive Zellen und durchschnittlich 8,1% CK5/6 positive Zellen, wobei in dieser Arbeit keine quantitative Aussage über die Koexpression dieser Zytokeratine getroffen werden kann.

In normalen Gängen verhalten sich die Anteile anders als in den Läppchen. Hier finden sich nur 43,6% CK8/18 positive Zellen und mit 93,1% eine hohe Anzahl CK5/6 exprimierender Zellen. Da die Summe dieser beiden Prozentwerte im Gang über 100% liegt, ist davon auszugehen, dass ein Zellanteil von >36% CK5/6 und CK8/18 koexprimiert. Die DH enthält 87,4% CK8/18 positive Zellen und 66,6% CK5/6 positive Zellen. Somit koexprimieren mindestens 54% den CK5/6 und CK8/18 positiven Intermediärzelltyp.

Bei den Vorläuferläsionen LN, FEA, ADH und DCIS lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob die wenigen CK5/6 exprimierenden Zellen eine Koexpression von CK8/18 zeigen. Alle Vorläuferläsionen zeigen hohe Anteile CK8/18 positiver Zellen. Bei der LN sind es 94,1%, bei den übrigen Vorläuferläsionen über 99%. Der Anteil der CK5/6 exprimierenden Zellen liegt

bei FEA, ADH und DCIS unter 1% und ist am ehesten dem ursprünglichen Epithel zuzuordnen.

3.2 Verteilung von ER und Ki67

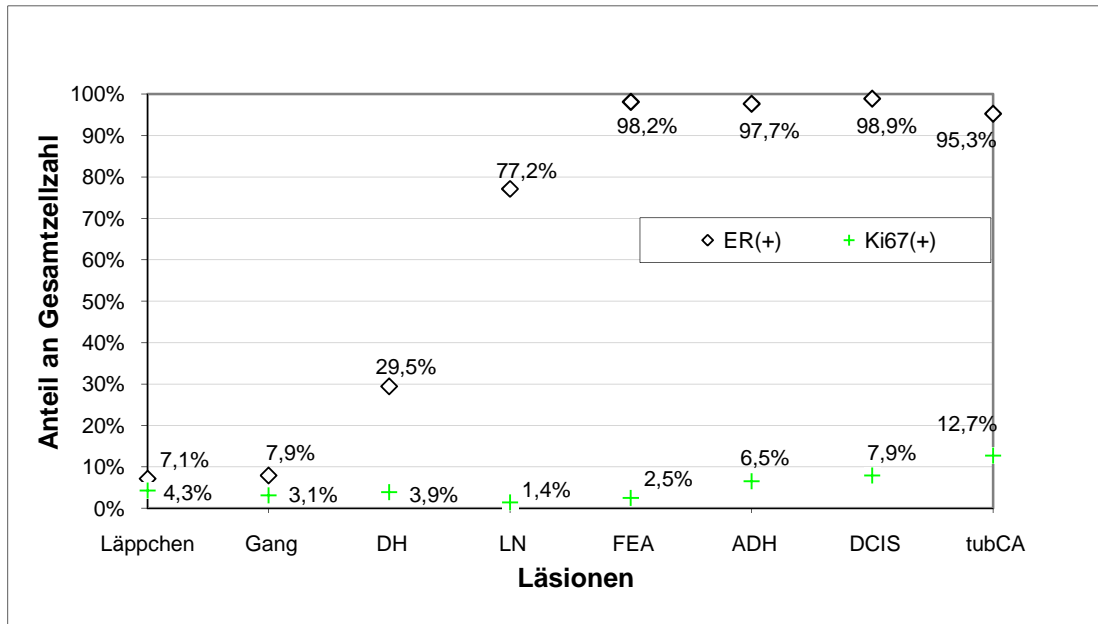


Diagramm 3.2: Anteil ER(+) Zellen und Ki67(+) Zellen in verschiedenen Läsionen gemessen an der Gesamtzellzahl.

In diesem Diagramm werden die für ER und Ki67 ermittelten Werte im Normalgewebe und in den verschiedenen Läsionen dargestellt. Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte für ER und Ki67, welche sich aus den Einzelwerten der Doppelmarkierung mit CK8/18 einerseits und den Werten der Doppelmarkierung mit CK5/6 andererseits zusammensetzen und anteilig an der Gesamtzellzahl dargestellt werden. Die zugrunde liegenden Gesamtzellzahlen sind in Tabelle 2.1.3 aufgeführt.

Zunächst soll das normale Mammagewebe, aufgeteilt in Läppchen und Gänge betrachtet werden. Im Läppchen finden sich durchschnittlich 7,1% ER positive Zellen. Dies entspricht ungefähr dem Wert der ER positiven Zellen in den Gängen, mit 7,9%. Die Läppchen weisen eine Proliferationsrate von 4,3% auf und liegen somit leicht über der Proliferationsrate von 3,1% der Gänge.

Als benigne proliferative Läsion zeigt die DH durchschnittlich 29,5% ER positive Zellen. Die Anzahl der Ki67 positiven Zellen liegt mit einem Wert von 3,9% weiterhin etwa auf dem Niveau der normalen Läppchen und der normalen Gänge.

Die Vorläuferläsionen LN, FEA, ADH und das DCIS zeigen deutlich höhere Anteile ER positiver Zellen. In der LN sind es durchschnittlich 77,2% ER exprimierende Zellen. Die FEA erreicht mit 98,2% einen hohen Anteil ER positiver Zellen, bei der ADH sind es 97,7%, beim DCIS 98,9%.

Der Anteil der Ki67 positiven Zellen liegt in der LN nur bei 1,4%. Die LN hat somit von allen untersuchten Vorläuferläsionen die niedrigste Proliferationsrate. 2,5% der Zellen der FEA exprimieren den Proliferationsmarker Ki67. Die ADH zeigt im Vergleich zu anderen Vorläuferläsionen wie LN und FEA eine erhöhte Ki67 Expression von 6,5%. Die Proliferationsrate des DCIS ist mit 7,9% im Vergleich zum normalen Lappchen und den Vorläuferläsionen deutlich erhöht und liegt über der Proliferationsrate der ADH. Ein orientierend ausgewertetes tubuläres Karzinom zeigt 12,7% Ki67 exprimierende Zellen.

3.3 Anteil CK8/18 bzw. CK5/6 positiver Zellen unter den ER positiven Zellen

a) Exemplarische Immunfluoreszenzdarstellung:

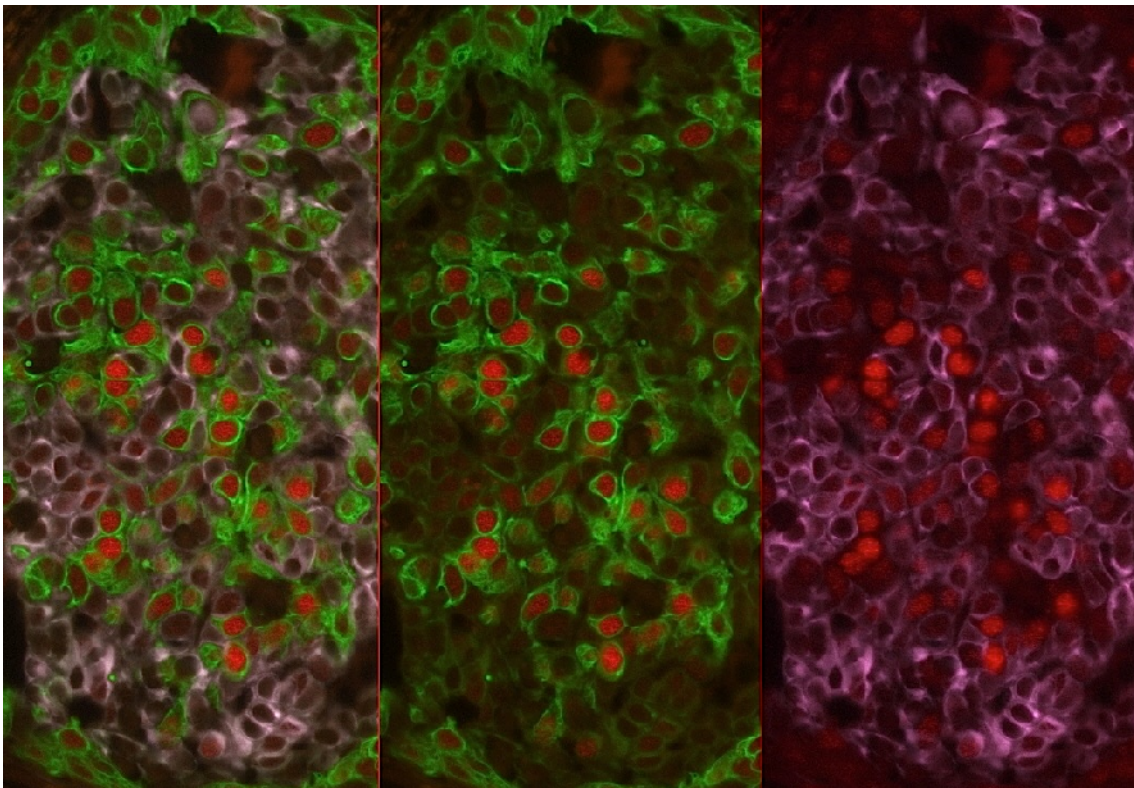


Abb. 2: Triple- Fluoreszenz mit Darstellung luminaler Zytokeratine 8/18 (grün), basaler Zytokeratine 5/6 (pink) und ER (rot) in einer DH.

Es zeigt sich, dass ER überwiegend in CK8/18 exprimierenden Zellen dargestellt werden (mittleres Bild), dagegen weitaus seltener in CK5/6 positiven Zellen.

b) Auswertung der Immunhistochemischen Doppelmarkierungen:

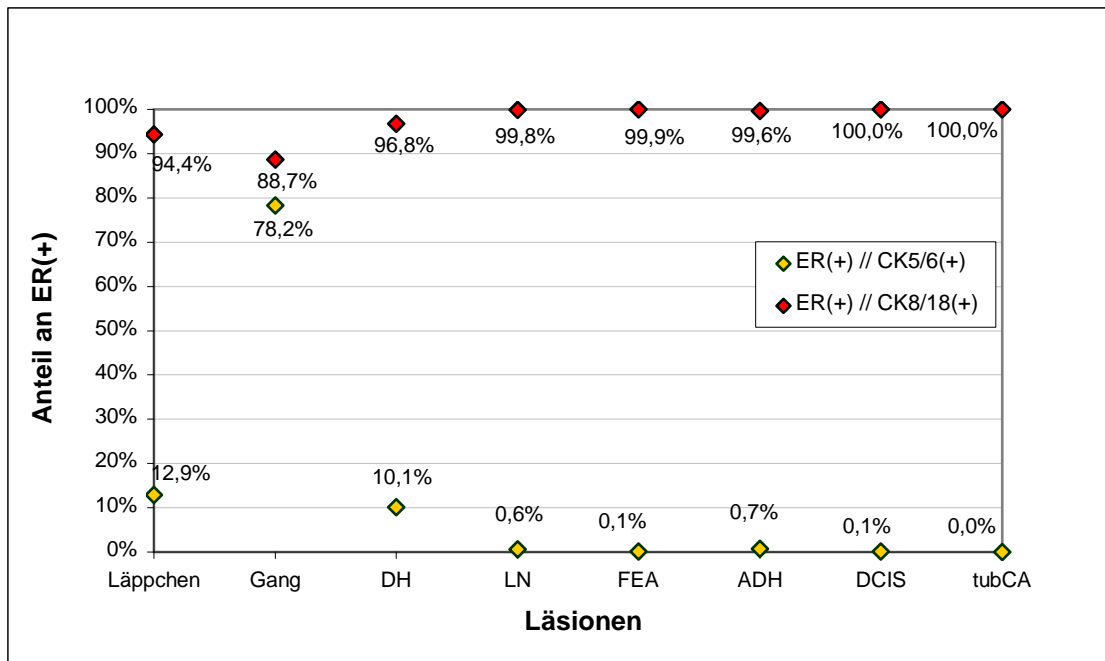


Diagramm 3.3: Anteil der ER(+) // CK8/18(+) Zellen und der ER(+) // CK5/6(+) Zellen, gemessen an der Gesamtzahl der ER(+) Zellen.

Gesamtzahlen der ausgewerteten ER positiven Zellen:

	Läppchen	Gänge	DH	LN	FEA	ADH	DCIS	tub.CA
ER (+) Gesamt- zellzahl:	9874	2783	7670	16655	26524	8270	31474	6023

Tab. 3.3.1

Im Diagramm 3.3 wird, anteilig an der Gesamtzahl ER positiver Zellen (s. Tab. 3.3.1) der jeweiligen Läsion dargestellt, welcher Anteil der ER exprimierenden Zellen CK8/18 bzw. CK5/6 koexprimiert.

Im normalen Läppchen sind 94,4% der ER positiven Zellen gleichzeitig auch CK8/18 positiv. Im normalen Gang beträgt dieser Anteil 88,7%. Die entsprechenden Werte in der DH, LN, FEA, ADH und dem DCIS, Grad 1 sind 96,8%, 99,8%, 99,9%, 99,6% und 100,0%.

Auffallend ist der Wert der Koexpression von ER und CK5/6 in normalen Gängen von 78,2%, im Vergleich zu 12,9% in den Läppchen. Der Anteil an Zellen, welche in der DH CK5/6 und ER koexprimieren, liegt bei 10,1%. Alle Vorläuferläsionen liegen für den Anteil dieser Zellgruppe unter 1,0%.

Während der Anteil der ER positiven Zellen gemessen an der Gesamtzellzahl der in den Läsionen gezählten Zellen, von der DH zur ADH von 29,5% auf

97,7% ansteigt (s. Diagramm 3.2), so verhält sich der Anteil der Zellen mit einer Koexpression von CK5/6 gegenläufig. Bei der DH zeigen 10,1% der ER positiven Zellen eine Koexpression von CK5/6, bei der ADH beträgt dieser Anteil 0,7%.

3.4 Anteil CK8/18 bzw. CK5/6 positiver Zellen an der Ki67(+) Gesamtfraktion

a) Exemplarische Immunfluoreszenzdarstellung:

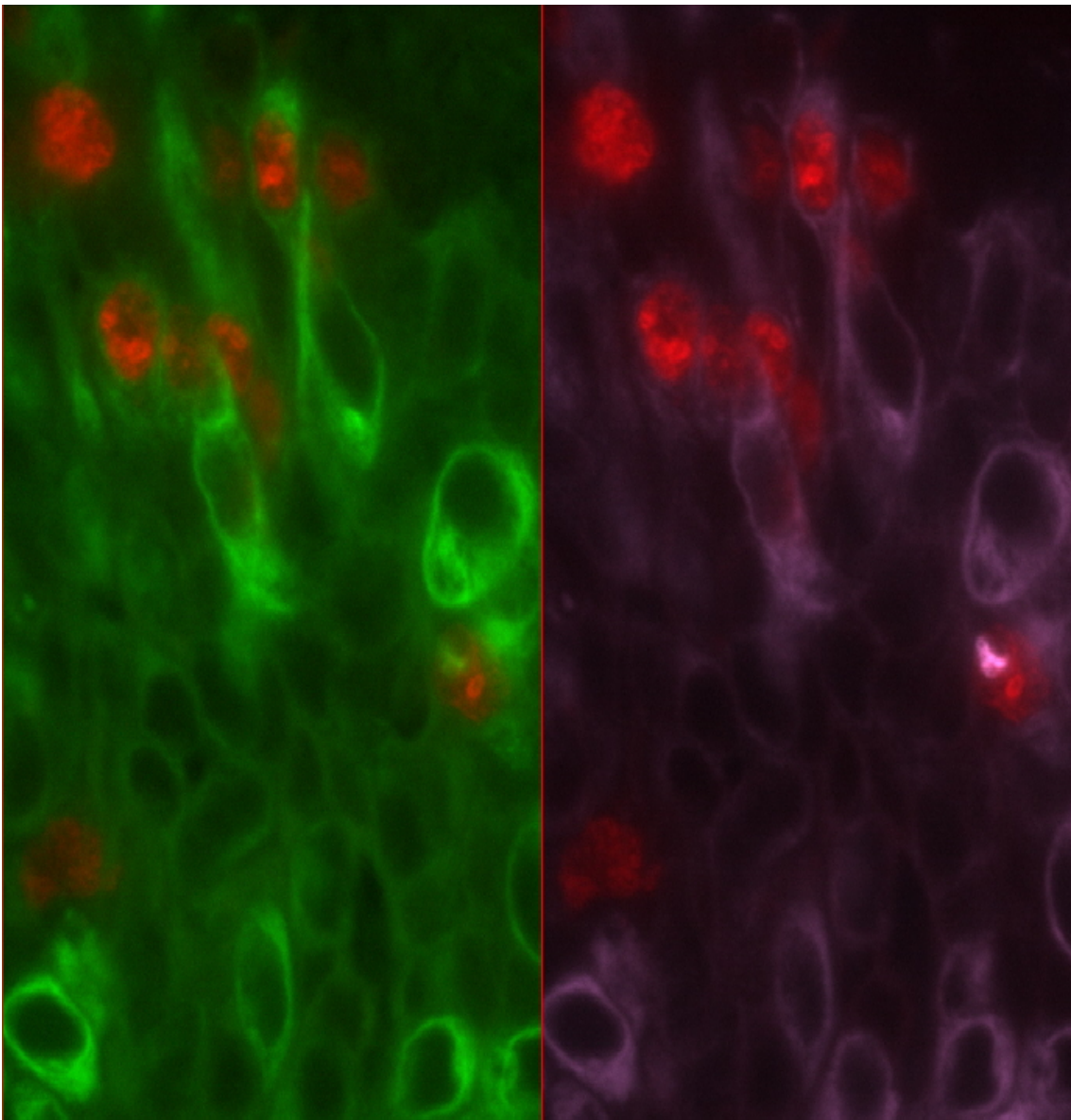


Abb. 3: Triple- Fluoreszenz mit Darstellung von Ki67 (rot), luminalen Zytokeratinen 8/18 (grün) und basalen Zytokeratinen 5/6 in einer DH.

Man erkennt, dass sowohl Zellen mit luminalem Zytokeratinmuster (mittleres Bild), als auch Zellen mit basalem Zytokeratinmuster (rechtes Bild), Ki67 exprimieren.

b) Auswertung der Immunhistochemischen Doppelmarkierungen:

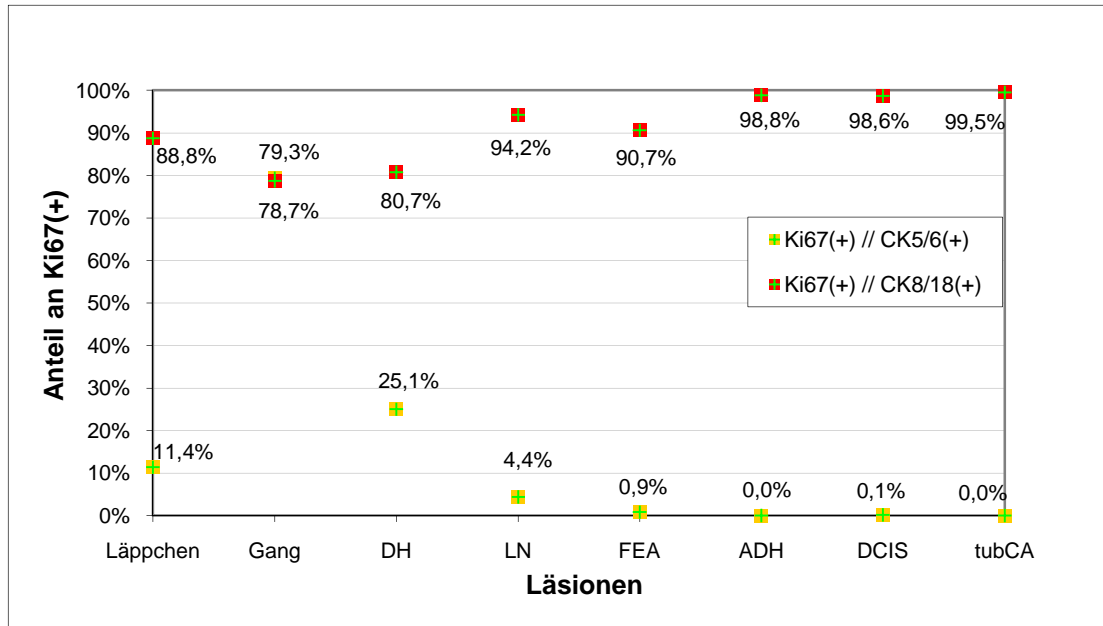


Diagramm 3.4: Anteil der Ki67(+) // CK8/18(+) Zellen und der Ki67(+) // (CK5/6(+) Zellen, gemessen an der Gesamtzahl der Ki67(+) Zellen.

Gesamtzahlen der ausgewerteten Ki67 positiven Zellen:

	Läppchen	Gänge	DH	LN	FEA	ADH	DCIS	tub.CA
Ki67 (+) Gesamt- zellzahl:	5929	1090	956	350	611	446	2345	782

Tab. 3.4.1

Diagramm 3.4 zeigt den Anteil CK5/6 positiver oder CK8/18 positiver Zellen welche eine Koexpression von Ki67 zeigen, gemessen an der Gesamtzahl der Ki67 positiven Zellen der jeweiligen Läsion (s. Tab. 3.4.1).

Im normalen Läppchen exprimieren 88,8% der Ki67 positiven Zellen gleichzeitig CK8/18. Diese Zellgruppe beträgt im normalen Gang 78,7% und in der DH 80,7%. In den Vorläuferläsionen LN, FEA, ADH und im DCIS ist ein deutlich höherer Anteil der proliferierenden Ki67 exprimierenden Zellen gleichzeitig

CK8/18 positiv. Die LN zeigt hier anteilig 94,2% und die FEA 90,7%. Bei ADH und DCIS sind es über 98%.

Das normale Läppchen enthält, gemessen an der Gesamtzahl der Ki67 positiven Zellen, 11,4% Zellen, die CK5/6 koexprimieren.

Diagramm 3.2 zeigt, dass im normalen Gang der Anteil der Ki67 exprimierenden Zellen an der Gesamtzellzahl, mit 3,1% leicht unter der Proliferationsrate des normalen Läppchens mit 4,3% liegt. Der proliferierende Zelltyp unterscheidet sich immunhistochemisch im Gang von dem des Läppchens. Im Läppchen exprimieren durchschnittlich 88,8% der proliferierenden Zellen CK8/18 und 11,4% CK5/6, wobei in dieser Arbeit keine quantitative Aussage über eine Koexpression von CK5/6 und CK8/18 gemacht werden kann. Im normalen Gang hingegen zeigt sich unter den proliferierenden Zellen ein hoher Anteil CK5/6 positiver Zellen von 79,3%. Da zusätzlich 78,7% des proliferierenden Gangepithels CK8/18 exprimieren, ist hier von einem hohen Anteil proliferierender, Intermediärzellen auszugehen, welche Ki67, CK5/6 und CK8/18 koexprimieren.

In der DH koexprimieren 25,1% der Ki67 positiven Zellen CK5/6. Bei gleichzeitig 80,7% CK8/18 positiven Zellen muss in der DH ebenfalls von einer Gruppe intermediärer Ki67, CK5/6 und CK8/18 koexprimierender Zellen proliferierender Intermediärzellen ausgegangen werden (siehe Abbildung 3, Seite 26).

Unter den Vorläuferläsionen zeigt die LN mit 4,4% den höchsten Anteil CK5/6 positiver Zellen an der Gruppe der Ki67 exprimierenden Zellen. FEA, ADH und DCIS liegen in dieser Zellgruppe bei Werten unter 1,0%.

3.5 Anteil der ER oder Ki67 exprimierenden Zellen im CK8/18 positiven Zellpool

a) Exemplarische Immunfluoreszenzdarstellung:

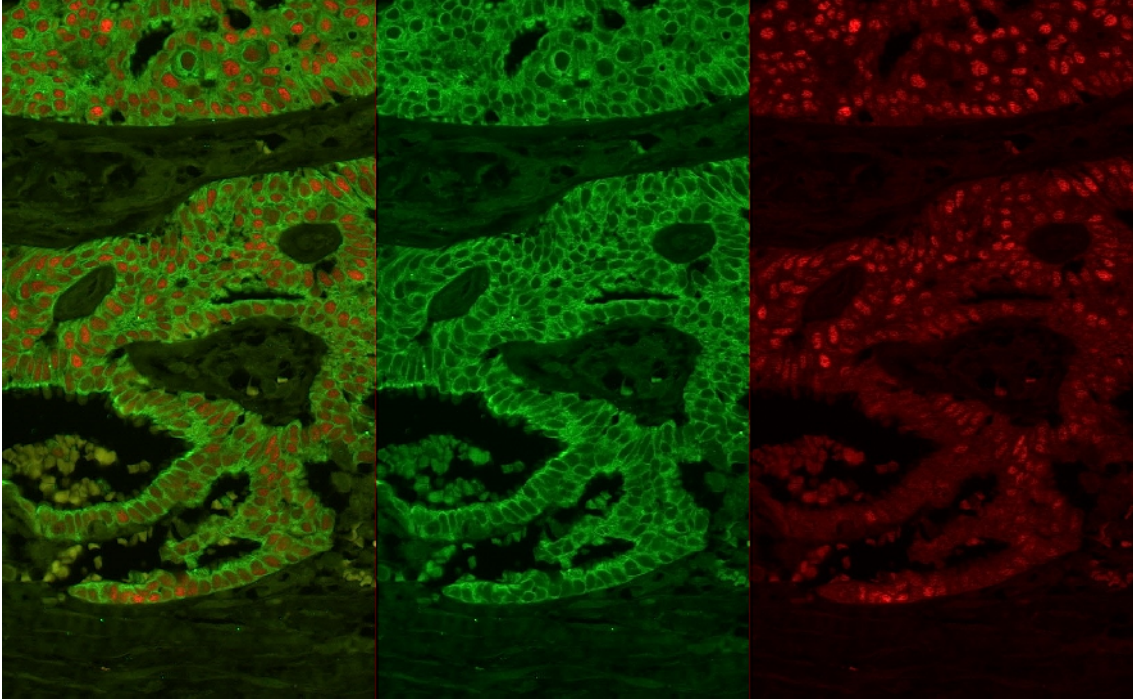


Abb. 4: Doppelfluoreszenz mit Darstellung von ER (rot) und luminalen Zytokeratinen 8/18 (grün), hier am Beispiel eines DCIS. Man beachte den hohen Anteil von ER exprimierenden Tumorzellen.

b) Auswertung der Immunhistochemischen Doppelmarkierungen:

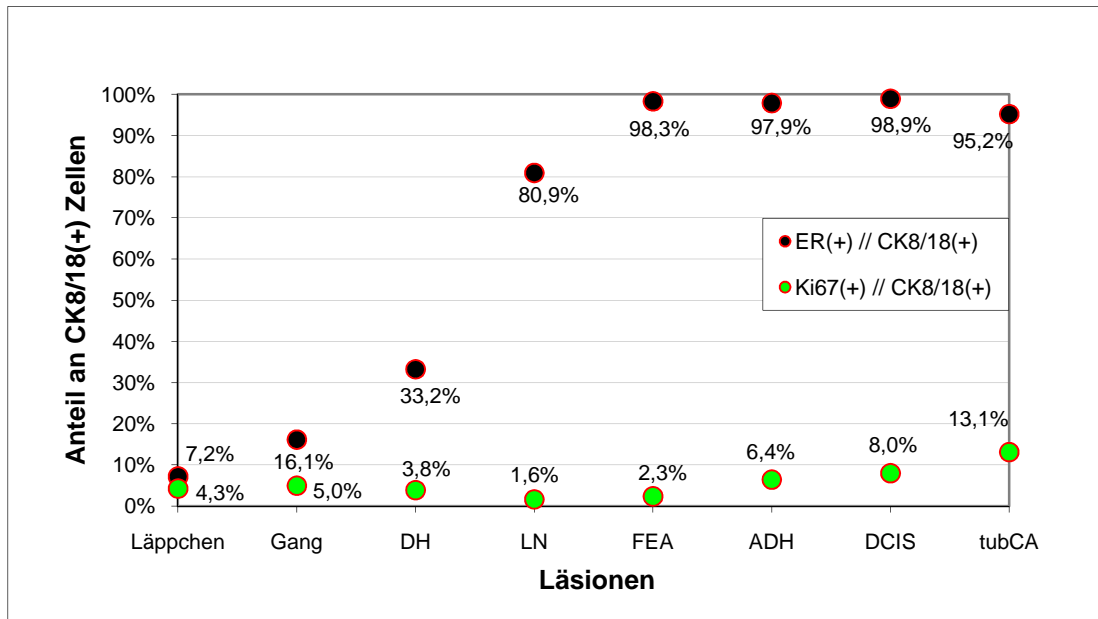


Diagramm 3.5: Anteil ER(+) Zellen und Ki67(+) Zellen in verschiedenen Läsionen, gemessen an der Gesamtzahl der CK8/18(+) Zellen.

Gesamtzahlen der ausgewerteten CK8/18 positiven Zellen:

	Läppchen	Gänge	DH	LN	FEA	ADH	DCIS	tub.CA
CK8/18 (+) Gesamt- zellzahl:	121280	15797	22420	22209	26045	7798	30488	6192

Tab. 3.5.1

In Diagramm 3.5 soll in der Untergruppe der CK8/18 positiven Zellen (Gesamtzahlen s. Tab. 3.5.1) der Anteil der Zellen die ER oder Ki67 koexprimieren dargestellt werden.

Im normalen Läppchen exprimieren 7,2% der CK8/18 positiven Zellen den ER. Diese Zellgruppe ist im normalen Gang ungefähr doppelt so groß und erreicht einen Wert von 16,1%. Die DH zeigt einen Anteil von 33,2% ER exprimierenden Zellen an der Gesamtzahl der CK8/18 positiven Zellen. Die LN erreicht in dieser Zellgruppe durchschnittlich 80,9% und liegt damit unter den anderen Vorläuferläsionen, von denen die FEA 98,3%, die ADH 97,9% und die DCIS Grad 1 98,9% erreichen.

Die Proliferationsrate, gemessen an der Expression des Proliferationsmarkers Ki67, liegt in den CK8/18 positiven Zellen des normalen Läppchens bei 4,3% und im normalen Gang durchschnittlich bei 5,0%. In der DH proliferieren mit

3,8% weniger CK8/18 positive Zellen, als im normalen Läppchen und im normalen Gang. Am niedrigsten ist die Ki67 Expression der CK8/18 positiven Zellen mit 1,6% in der LN. In der FEA liegt dieser Wert mit 2,3% ebenfalls unter dem des normalen Brustgewebes. Die ADH erreicht einen Wert von 6,4%, welcher im DCIS Grad 1 nur gering hohler bei 8,0% liegt.

3.6 Anteil der ER oder Ki67 koexprimierenden Zellen am CK5/6 positiven Zellpool

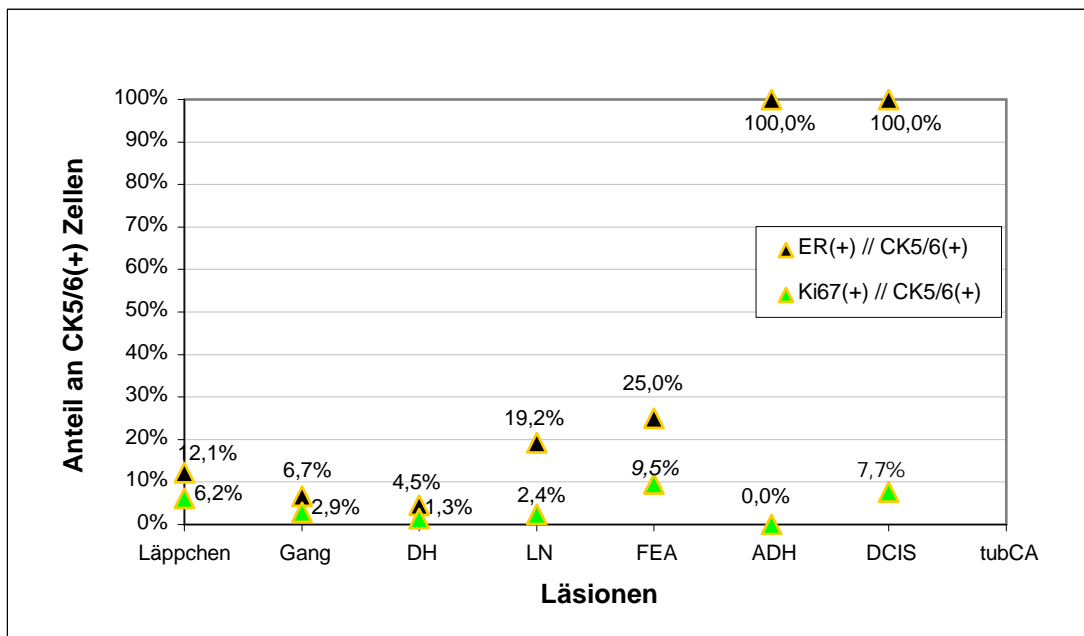


Diagramm 3.6: Anteil ER(+) Zellen und Ki67(+) Zellen in verschiedenen Läsionen, gemessen an der Gesamtzahl der CK5/6(+) Zellen.

Gesamtzahlen der ausgewerteten CK5/6 positiven Zellen:

	Läppchen	Gänge	DH	LN	FEA	ADH	DCIS	tub.CA
CK5/6 (+) Gesamt- zellzahl:	11169	32221	16657	533	85	44	39	0

Tab. 3.6.1

Diagramm 3.6 zeigt die Expression des ER und des Proliferationsfaktors Ki67 in den CK5/6 positiven Zellen der entsprechenden Läsion (Gesamtzellzahlen s. Tab. 3.6.1).

Gemessen an der Gruppe der CK5/6 positiven Zellen gibt es im normalen Läppchen 12,1% Zellen, welche den ER exprimieren. Im Gang ist diese Zellgruppe kleiner und erreicht einen Wert von 6,6%. In der DH sind es

durchschnittlich 4,5%. Die eingetragenen Werte für LN, FEA, ADH und DCIS beruhen auf sehr geringen Zellzahlen, da es in diesen Läsionen nahezu keine CK5/6 exprimierenden Zellen gibt. Einzelne als CK5/6 positiv gewertete Zellen sind dem ursprünglichen Gewebe und nicht den Tumorzellen zuzuordnen.

Die Proliferationsrate in den CK5/6 positiven Zellen, welche im Lämpchen 8,1% der Gesamtzellzahl betragen (Diagramm 3.1), liegt im normalen Lämpchen bei 6,2% im Vergleich zu 4,3% in den CK8/18 positiven Zellen (s. Diagramm 3.5). Im Gang proliferieren 2,9% der CK5/6 positiven Zellen, welche gemessen an der Gesamtzellzahl 93,1% betragen (Diagramm 3.1) und 5,0% der CK8/18 positiven Zellen. Es ist aufgrund der verwendeten immunhistochemischen Doppelmarkierungen nicht zu sagen, welcher Anteil der proliferierenden CK5/6 positiven Zellen zu den Progenitorzellen gehört, welche ausschließlich CK5/6 in Abwesenheit von CK8/18 exprimieren, bzw. dem intermediären Zelltyp zuzuordnen ist, welcher CK5/6 und CK8/18 koexprimiert.

In der DH proliferieren mit 1,3% anteilig weniger der CK5/6 positiven Zellen, bei einer höheren Gesamtzahl CK5/6 positiver Zellen von 66,6% (Diagramm 3.1), als im normalen Lämpchen.

Bei LN, FEA, ADH und DCIS sind zwar Prozentwerte im Diagramm beschrieben, welche aber aufgrund der geringen Gesamtzahl CK5/6 positiver Zellen in diesen Läsionen, nicht zu bewerten sind. In den Vorläuferläsionen nur sehr wenige CK5/6 exprimierende Zellen zu finden, bei denen es sich am ehesten um Restzellen des ursprünglichen Gewebes und nicht um Tumorzellen handelt.

3.7 Verteilung der Immunphänotypen in den verschiedenen Läsionen

In den folgenden Tabellen werden die vier jeweils möglichen Immunphänotypen einer Doppelmarkierung als Anteil der jeweiligen Gesamtzellzahl der betreffenden Läsion betrachtet. Als Gesamtzellzahl wird die Zahl der luminal gelegenen Epithelzellen definiert, ohne die Myoepithelzellen mit einzubeziehen.

3.7.1: Doppelmarkierung von CK8/18 und ER

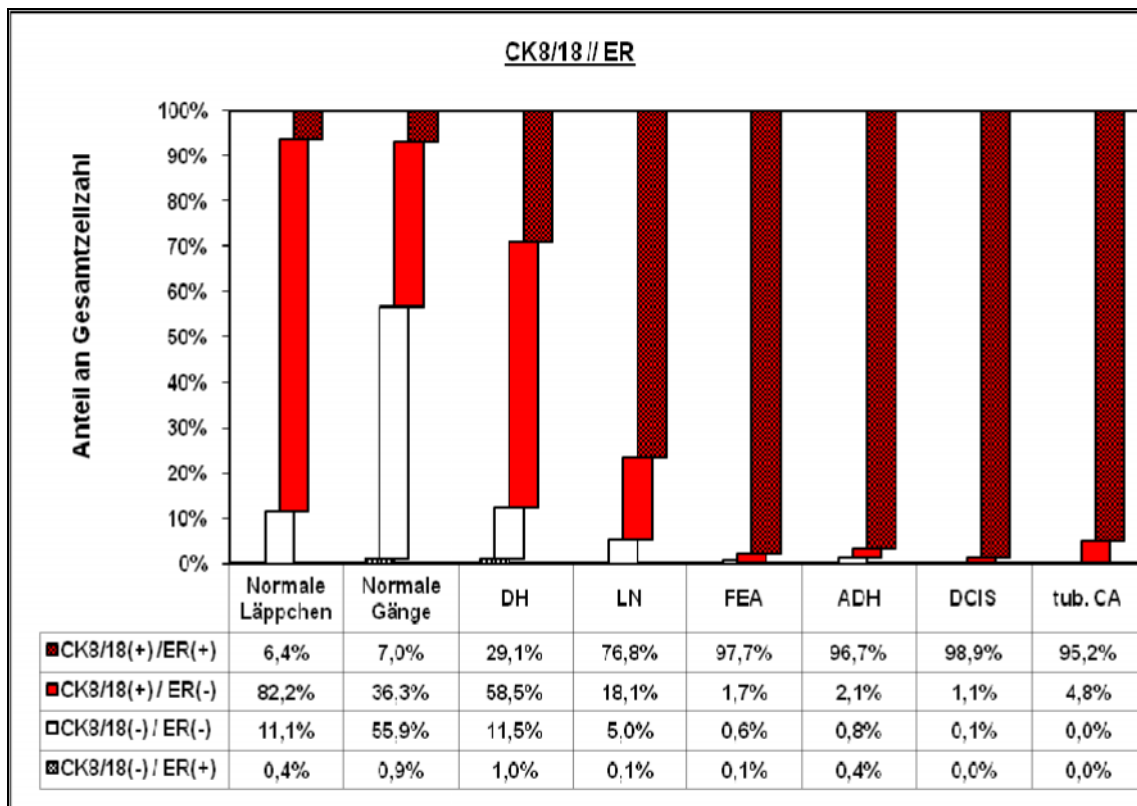


Diagramm 3.7.1: Immunphänotypen der Doppelmarkierungen von CK8/18 und ER anteilig an der jeweiligen Gesamtzellzahl.

Ausgewertete Gesamtzellzahlen dieser Doppelmarkierung:

	Lappchen	Gänge	DH	LN	FEA	ADH	DCIS	tub.CA
CK8/18 // ER Gesamtzellzahl:	68925	17726	13034	10784	13814	4285	15485	3189

Tab. 3.7.1.1

Wenn man die Merkmalskombinationen CK8/18 und ER darstellt, so ergeben sich vier Immunphänotypen mit unterschiedlichen Anteilen an der Gesamtzellzahl (Tab.3.7.1.1).

Zunächst soll die Gruppe der ER und CK8/18 koexprimierenden Zellen betrachtet werden. Im Epithel des normalen Lappchens sind durchschnittlich 6,4% der Zellen sowohl CK8/18 als auch ER positiv. In den fünf untersuchten Beispielen liegen der Minimalwert für diese Kombination bei 3,4% und der Maximalwert bei 7,3%. Im interlobulären Gangsystem liegt dieser Wert mit durchschnittlich 7,0% etwas höher, der Minimalwert liegt hier bei 5,1% und der Maximalwert bei 9,8%. Die DH zeigt eine deutliche Zunahme dieser Zellgruppe. 29,1% der Zellen koexprimieren in der DH CK8/18 und ER. Minimal hat diese Kombination in den ausgewerteten Läsionen duktaler Hyperplasien einen Anteil von 20,9% und maximal einen Anteil von 33,2%. Während in den LN zwischen 71,3% und 84,3%, bei durchschnittlich 76,8% der Zellen ER und CK8/18 koexprimieren, liegt dieser Wert in allen anderen untersuchten Vorläuferläsionen (FEA, ADH als auch DCIS) bei über 95,0%. Bei der FEA sind es durchschnittlich 97,7%, bei der ADH 96,7% und beim DCIS 98,9%.

Die Zellgruppe der CK8/18 negativen Zellen mit positiver ER Expression, ist in allen untersuchten Läsionen klein. Das interlobuläre Gangsystem erreicht für diese Zellgruppe einen Durchschnittswert von 0,9%. Die DH kommt auf durchschnittlich 1,0%. In den DCIS wurde diese Kombination in keinem der untersuchten Fälle nachgewiesen.

Im normalen Lappchen sind durchschnittlich 82,2% der Zellen CK8/18 positiv ohne den ER zu exprimieren. Dieser Wert variiert in den untersuchten fünf Fällen zwischen 78,9% und 85,3%, wobei diese Fälle ohne Berücksichtigung der Zyklusphase ausgewertet wurden. Im normalen Gang liegt dieser Wert niedriger. Zwischen 17,6% und 54,3% aller Zellen des Gangepithels, durchschnittlich 36,3%, sind CK8/18 positiv ohne den ER zu exprimieren.

Die Gruppe der CK8/18 positiven und ER negativen Zellen beträgt in der DH zwischen 56,2% und 63,6% der Gesamtzellzahl, bei einem Durchschnittswert von 58,5%. In der Gruppe der LN fand sich mit Werten zwischen 12,5% und 23,5%, bei durchschnittlich 18,1%, ein relativ hoher Anteil von Zellen mit dieser Merkmalskombination. Die FEA erreicht maximal 3,4% und die ADH 2,1%. Im DCIS hat diese Zellgruppe gemessen an der Gesamtzellzahl maximal einen Anteil von 1,6%. Aufgrund von Dreifachmarkierungen lässt sich allerdings schlussfolgern, dass es sich bei diesen Zellen in allen Kategorien um residuelle glanduläre Epithelzellen handelt, die auch CK5/6 exprimieren [1].

In der immunhistochemischen Doppelmarkierung von CK8/18 und ER sind in den verschiedenen Läsionen eine unterschiedliche Anzahl von Zellen für beide Merkmale negativ. Der Anteil dieses Zelltyps an der Gesamtzellzahl ist bei den malignen Läsionen kleiner. Im normalen Lappchen exprimieren 11,1% aller

Zellen weder CK8/18 noch den ER. Dieser Anteil variiert im normalen Lappchen zwischen 9,6% und 14,4%. Der normale Gang zeigt mit Werten zwischen 35,8% und 76,1%, bei durchschnittlich 55,9%, den höchsten Anteil an Zellen welche für beide Merkmale negativ sind. Die DH liegt mit dem Anteil dieses Zelltyps in einem vergleichbaren Bereich zum normalen Lappchen. Die Werte der DH liegen zwischen 5,2% und 22,5% bei durchschnittlich 11,5%. Die LN hebt sich mit durchschnittlich 5,0% negativen Zellen von den anderen Vorläuferläsionen ab. Auch hier zeigen Dreifachfärbungen, dass es sich um CK5 positive normale Epithelzellen handelt. Die FEA erreicht maximal 1,6% für beide Merkmale negative Zellen, bei durchschnittlich 0,6%. Bei der ADH sind es maximal 0,8% und beim DCIS maximal 0,1% aller Zellen.

3.7.2 Doppelmarkierung von CK5/6 und ER

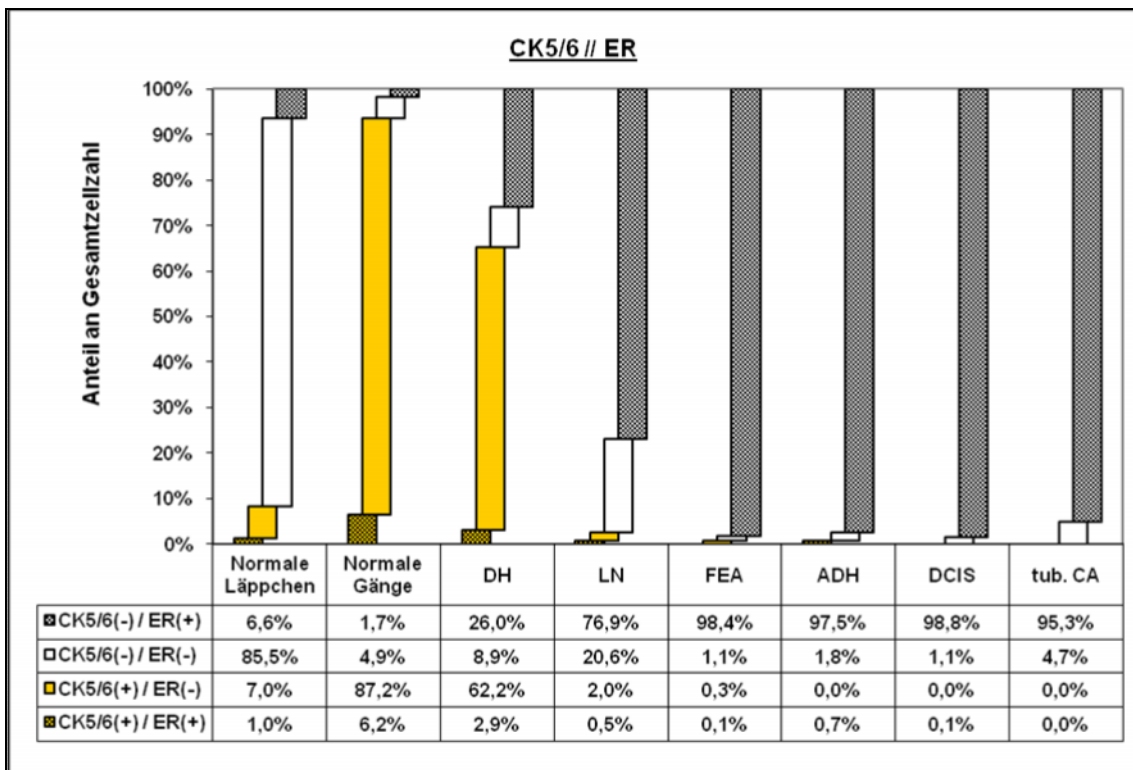


Diagramm 3.7.2: Immunphänotypen der Doppelmarkierungen von CK5/6 und ER anteilig an der jeweiligen Gesamtzellzahl.

Ausgewertete Gesamtzellzahlen dieser Doppelmarkierung:

	Lappchen	Gänge	DH	LN	FEA	ADH	DCIS	tub.CA
CK5/6 // ER Gesamtzellzahl:	69565	17505	12976	10803	13209	4184	16343	3133

Tab. 3.7.2.1

In diesem Diagramm werden die vier immunphänotypischen Kombinationsmöglichkeiten, welche sich aus der Doppelmarkierung von CK5/6 und ER ergeben, aufgeführt in Bezug auf die jeweiligen Gesamtzellzahlen (Tab. 3.7.2.1).

Im normalen Läppchen liegt der prozentuale Anteil von CK5/6 negativen und ER positiven Zellen durchschnittlich bei 6,7% mit einer Schwankungsbreite zwischen 3,9% und 8,7%. Im Gangsystem ist der Anteil der CK5/6 negativen und ER positiven Zellen mit durchschnittlich 1,7% deutlich kleiner. Er beträgt minimal 0,8% und maximal 2,7%. Die DH liegt mit Durchschnittswerten von 26,0% deutlich über den Werten des normalen Mammagewebes, erreicht allerdings nicht die Werte der Vorläuferläsionen, welche mit Ausnahme der LN alle über 97,0% liegen. Bei der DH liegt der Anteil der CK5/6 negativen und ER positiven Zellen zwischen 19,1% und maximal 30,3%. Die LN zeigt durchschnittlich 76,9% in dieser Zellgruppe. Die Werte liegen zwischen 76,6% und 83,1%.

Der Anteil der CK5/6 und ER koexprimierenden Zellen liegt im normalen Läppchen unter 1,0%, bei Minimalwerten von 0,5 und Maximalwerten von 2,5%. Im Gangsystem erreicht diese Zellgruppe Anteile zwischen 4,0% und 10,4%, mit einem Durchschnitt von 6,2%. Die DH liegt zwischen 0,6% und 6,5%. Im Durchschnitt erreicht die DH 2,9%.

Das normale Läppchen hat durchschnittlich einen Anteil von 85,5% CK5/6 negativen und ER negativen Zellen. Dieser Wert liegt in den fünf ausgezählten Fällen minimal bei 82,1% und maximal bei 88,9%. Im normalen Gang sind nur zwischen 2,8% und 6,5% der Zellen CK5/6 negativ und ER negativ. Durchschnittlich liegt dieser Wert im normalen Gang bei 4,9%. Der Anteil dieser Zellgruppe an der Gesamtzellzahl liegt in der DH mit durchschnittlich 8,9% bei minimal 2,9% und maximal 12,1%. In der LN sind durchschnittlich 20,6% der Zellen für beide Merkmale negativ, bei Minimalwerten von 14,4% und Maximalwerten von 27,8%. In den Vorläuferläsionen FEA, ADH und DCIS werden durchschnittliche Anteile dieser Zellgruppe von 1,1%, 1,8% und 1,1% erreicht.

Im normalen Läppchen hat der CK5/6 positive und ER negative Zelltyp einen Anteil von durchschnittlich 7,0% gemessen an der Gesamtzellzahl, mit einem Minimalwert von 5,9% und einem Maximalwert von 8,5%. In den normalen Gängen ist die Zellgruppe der CK5/6 positiven Zellen die keine ER Expression zeigen mit durchschnittlich 87,2% im Vergleich zu den anderen ausgewerteten Läsionen am größten. Sie weist Werte zwischen 85,6% und 89,3% auf. Einen ebenfalls hohen Wert in dieser Zellgruppe weist die DH mit durchschnittlich 62,2% auf, welcher zwischen 56,1% und 68,3% variiert. Damit hebt sich die DH von den Vorläuferläsionen ab, die mit Ausnahme der LN, welche geringgradig höhere Werte aufweist, alle unter 0,5% liegen. Während in der LN durchschnittlich 2,0% aller Zellen CK5/6 positiv sind, ohne eine ER Expression

zu zeigen und am ehesten ursprünglichem Epithel entsprechen, so liegt dieser Wert für die FEA bei maximal 0,5% der Gesamtzellzahl und erreicht bei ADH, DCIS und tubulärem Karzinom einen Anteil von 0,0%.

3.7.3 Doppelmarkierung von CK8/18 und Ki67

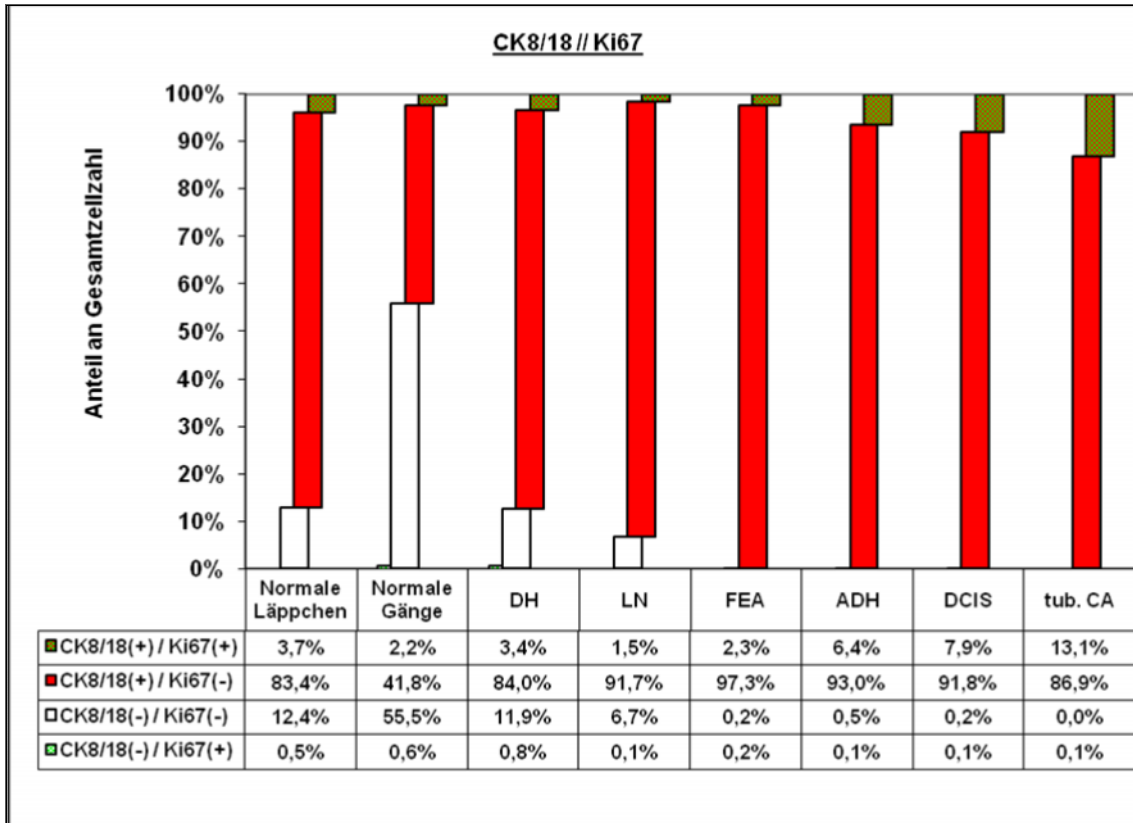


Diagramm 3.7.3: Immunphänotypen der Doppelmarkierungen von CK8/18 und Ki67 anteilig an der jeweiligen Gesamtzellzahl.

Ausgewertete Gesamtzellzahlen dieser Doppelmarkierung:

	Läppchen	Gänge	DH	LN	FEA	ADH	DCIS	tub.CA
CK8/18 // Ki67 Gesamtzellzahl:	69187	18501	12606	12849	12378	3585	15055	3005

Tab. 3.7.3.1

In diesem Diagramm sind anhand der immunhistochemischen Doppelmarkierungen von CK8/18 und dem Proliferationsmarker Ki67 die vier Kombinationsmöglichkeiten dieser Merkmale in Abhängigkeit von der jeweiligen Gesamtzellzahl (Tab. 3.7.3.1) aufgezeigt.

Zunächst soll die Gruppe der CK8/18 positiven und Ki67 negativen Zellen in den Läsionen verglichen werden. Sie beträgt im normalen Lappchen durchschnittlich 83,4% mit einem Minimum von 68,8% und Maximum von 89,4%. In den normalen Gängen ist diese Zellgruppe deutlich kleiner. Sie beträgt zwischen 19,2% und 60,8%, bei einem Durchschnittswert von 41,8%. In der DH liegt der Anteil der CK8/18 positiven Zellen welche Ki67 negativ sind mit durchschnittlich 84,0% auf dem gleichen Niveau wie beim normalen Lappchen mit 83,4%. Der Anteil dieser Zellgruppe variiert in der DH zwischen 75,2% und 92,6%. Im Durchschnitt liegen die Werte von LN, FEA, ADH und DCIS über 90,0%.

Das normale Lappchen zeigt für die CK8/18 und Ki67 koexprimierenden Zellen einen Durchschnittswert von 3,7% mit minimal 0,6% und maximal 9,9%. In den normalen Gängen liegt der Anteil der CK8/18 und Ki67 koexprimierenden Zellen mit Werten zwischen 1,4% und 3,5% bei durchschnittlich 2,2%. Die DH variiert zwischen 1,4% und 5,2%, bei durchschnittlich 3,4%. Die LN erreicht Minimalwerte von 0,7% und Maximalwerte von 2,2%, bei durchschnittlich 1,5%. Die FEA liegt zwischen 0,4% und 3,2%, bei durchschnittlich 2,3%. Die ADH erreicht 6,4% CK8/18 und Ki67 koexprimierende Zellen. Beim DCIS sind es durchschnittlich 7,9%, bei großen Differenzen zwischen den Einzelfällen von Werten zwischen 0,5% und 20,4%.

Die Gruppe der Zellen, welche weder CK8/18 noch Ki67 exprimieren, hat gemessen an der Gesamtzellzahl im normalen Lappchen einen Anteil von durchschnittlich 12,4%, welcher in den untersuchten fünf Fällen zwischen 9,9% und 20,1% variiert. Im normalen Gang liegen die Werte zwischen 34,7% und 78,5%, bei durchschnittlich 55,5%. Die DH zeigt einen Durchschnittswert von 11,9%, bei einem Minimalwert von 5,5% und einem Maximalwert von 21,4%. Die LN liegt mit den Werten dieser Zellgruppe zwischen 5,2% und 8,0% und hebt sich damit von den anderen Vorläuferläsionen ab, welche unter 1,0% liegen.

Alle untersuchten Läsionen zeigen in der Zellgruppe der CK8/18 negativen und Ki67 exprimierenden Zellen Werte unter 1,0%. Im normalen Lappchen sind durchschnittlich 0,5% der Zellen CK8/18 negativ und zeigen eine Expression von Ki67, wobei dieser Zellanteil zwischen 0,1% und 1,2% differiert. In den normalen Gängen ist der Durchschnittswert dieser Zellgruppe mit 0,6% vergleichbar mit dem Wert des normalen Lappchens. Er differiert zwischen 0,4% und 0,9%. Auch die DH liegt mit Werten zwischen 0,6% und 0,9%, bei durchschnittlich 0,8% im Bereich des Normalgewebes. Die Vorläuferläsionen haben in der Zellgruppe der CK8/18 negativen und gleichzeitig Ki67 positiven Zellen einen Anteil von durchschnittlich unter 0,2%.

3.7.4 Doppelmarkierung von CK5/6 und Ki67

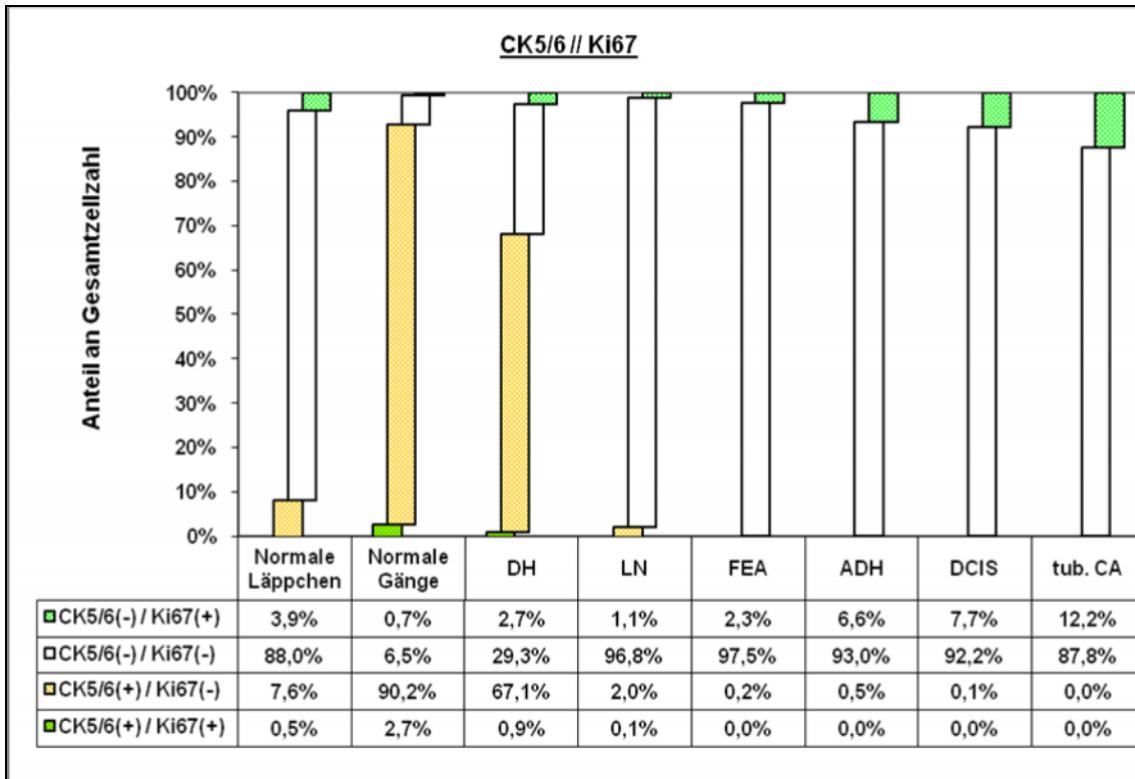


Diagramm 3.7.4: Immunphänotypen der Doppelmarkierungen von CK5/6 und Ki67 anteilig an der jeweiligen Gesamtzellzahl.

Ausgewertete Gesamtzellzahlen dieser Doppelmarkierung:

	Lappchen	Gänge	DH	LN	FEA	ADH	DCIS	tub.CA
CK5/6 // Ki67 Gesamtzellzahl:	69145	17093	12063	12971	12474	3258	14691	3164

Tab. 3.7.4.1

In diesem Diagramm werden die vier Kombinationsmöglichkeiten, welche sich aus der immunhistochemischen Doppelmarkierung von CK5/6 und Ki67 in den verschiedenen Läsionen ergeben, gemessen an der Gesamtzellzahl (Tab. 3.7.4.1) dargestellt.

Wenn man die Gruppe der Zellen betrachtet, welche weder CK5/6 noch Ki67 exprimieren, so stellt man fest, dass diese Zellgruppe im normalen Lappchen einen großen Anteil von 83,9% bis 93,4%, bei durchschnittlich 88,0% hat. In den normalen Gängen ist der Anteil der Zellen, welche weder CK5/6 noch Ki67 exprimieren deutlich niedriger und liegt im Durchschnitt bei 6,5%. Die Werte dieser Zellgruppe variieren zwischen 3,1% und 8,9%. Die DH erreicht hier einen

Durchschnittswert von 29,3%, bei minimal 25,0% und maximal 35,0%. Die LN liegt zwischen 95,3% und 98,4%, bei durchschnittlich 96,83% CK5/6 negativen und gleichzeitig Ki67 negativen Zellen, gemessen an der Gesamtzellzahl. Bei der FEA werden sogar Werte von 99,5%, bei einem Durchschnittswert von 97,5% erreicht. In der ADH sind 93,0% der Zellen für beide Merkmale negativ und in den DCIS erreicht diese Zellgruppe Durchschnittswerte von 92,2%, bei einem Minimalwert von 81,3% und einem Maximalwert von 99,3%.

Die Gruppe der CK5/6 positiven Zellen, welche für den Proliferationsfaktor Ki67 negativ sind, zeigt deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Gewebetypen. Im normalen Lappchen sind zwischen 5,6% und 10,0% der Zellen CK5/6 positiv ohne Ki67 zu exprimieren. Der Durchschnittswert dieser Zellgruppe liegt bei 7,6%. In den normalen Gängen ist der Anteil dieser Zellgruppe mit 90,15% hoch. Die Werte reichen von 85,9% bis 92,4%. Auch die DH zeigt mit durchschnittlich 67,1% einen großen Anteil dieser Zellgruppe. Zwischen 60,9% und 73,3% aller Zellen exprimieren in der DH CK5/6 in Abwesenheit von Ki67. Die Vorläuferläsionen LN, FEA, ADH und DCIS zeigen hier einen niedrigen Anteil. Die LN erreicht mit durchschnittlich 2,0% CK5/6 positiven Zellen, welche Ki67 negativ sind unter den Vorläuferläsionen den höchsten Wert. Der Anteil variiert bei den LN zwischen 0,6% und 2,9%. FEA, ADH und DCIS erreichen maximal Werte von 0,5%.

Als nächstes soll der Anteil der CK5/6 negativen proliferierenden Zellen an der Gesamtzellzahl in den verschiedenen Läsionen verglichen werden. Im normalen Lappchen gehören dieser Zellgruppe durchschnittlich 3,9% aller luminalen Epithelzellen an. Der Anteil dieser Gruppe variiert stark zwischen 0,9% und 8,8%. Wenn man die Einzelwerte dieser Zellgruppe für das normale Lappchen mit den Einzelwerten der CK8/18 positiven proliferierenden Zellen der anderen Doppelmarkierung vergleicht, so stellt man fest, dass diese beiden Zellgruppen in ihrer Größe nahezu äquivalent sind. In den normalen Gängen hat die Zellgruppe der CK5/6 negativen, Ki67 positiven Zellen mit durchschnittlich 0,7% einen geringeren Anteil als im normalen Lappchen. Die Werte dieser Zellgruppe variieren mit Werten zwischen 0,2% und 1,6% geringer als im normalen Lappchen. Die DH liegt in dieser Zellgruppe durchschnittlich bei 2,7%, die LN bei 1,1% und die FEA bei 2,3%. Die ADH zeigt hier einen Anteil von 6,6%. Im DCIS beträgt der Anteil durchschnittlich 7,7% und variiert zwischen 0,6% und 18,7%. Ein DCIS mit dem Wert dieser Zellgruppe von 18,7% liegt über dem Wert von 12,2%, den das tubuläre Karzinom für diese Zellgruppe erreicht.

Die vierte Zellgruppe, welche sich aus der immunhistochemischen Doppelmarkierung zwischen CK5/6 und Ki67 ergibt, ist die Gruppe der Zellen, welche CK5/6 und Ki67 koexprimieren. Diese Zellgruppe hat im normalen Lappchen einen geringen Anteil von durchschnittlich 0,5%. Die Werte für diese

Zellgruppe variieren im normalen Lappchen zwischen 0,2% und 1,0%. Die normalen Gänge haben, mit einem Durchschnittswert von 2,7%, von allen untersuchten Läsionen den größten Anteil an CK5/6 und Ki67 koexprimierenden Zellen gemessen an der Gesamtzellzahl. Minimal liegt der Wert dieser Zellgruppe in den normalen Gängen bei 1,7% und maximal bei 4,6%. Die DH erreicht einen Durchschnittswert von 0,9% und variiert zwischen 0,3% und 1,7%. Die Vorläuferläsionen LN und FEA zeigen maximal Werte bis 0,1% in der Zellgruppe der CK5/6 positiven proliferierenden Zellen, welche am ehesten dem ursprünglichen Epithel zuzuordnen sind. Der orientierend ausgewertete Fall einer ADH, sowie drei von vier Fällen der untersuchten DCIS zeigen ebenfalls Werte von 0,0% der CK5/6 exprimierenden proliferierenden Zellen und entsprechen damit dem Anteil, den diese Zellgruppe im tubulären Karzinom erreicht.

4 Diskussion

4.1 Konzepte der Tumorgenese

Viele Experten sind der Meinung, dass es eine gemeinsame Vorläuferläsion gibt, aus der sich der Tumor entwickelt. Die traditionelle Sichtweise der Brustkrebsentstehung geht aufgrund verschiedener Studien davon aus, dass die epitheliale CK5/14 positive Stammzelle der Ausgangspunkt der Tumorgenese der erwachsenen weiblichen Brust ist. Da diese Stammzellen langlebig sind und ein großes Replikationspotential haben, können sich Mutationen ansammeln, die ein malignes Potential besitzen. Studien führen zu einem Modell der Tumorgenese, in dem ER positiven Stammzellen und ER negativen Stammzellen des normalen Brustepithels eine primäre Rolle in der Entstehung des Brustkrebs nachgesagt wird [14]. Diese Autoren vermuten, dass die CK5/14 positiven Stammzellen als Krebsstammzellen zu betrachten seien, in welchen das funktionelle Potential der Zelldifferenzierung erhalten bliebe. Mit dieser Theorie seien die unterschiedlichen Phänotypen der Brustkarzinome zu erklären.

Immunphänotypische Auswertungen haben jedoch gezeigt, dass in den meisten Fällen nur 1-2% CK5/14 positive Stammzellen zu finden sind, welche unter normalen Bedingungen nur langsam den Zellzyklus durchlaufen, um Replikationsfehler zu vermeiden [1].

Eine der wichtigsten Fragen der Tumorgenese ist somit, ob Brustkrebs aus epithelialen Progenitorzellen, wie der erwähnten CK5/14 positiven potentiellen Stammzelle entsteht, oder aus einer nachfolgenden Zellgruppe, wie beispielsweise den CK8/18 exprimierenden glandulären Zellen.

Mit immunhistochemischen Markern wie CK5/14 und CK8/18 lassen sich die epithelialen Zellen des Brustgewebes sowohl in benignen, wie auch in neoplastischen Läsionen phänotypisch charakterisieren. Die Zellverteilung der unterschiedlich differenzierten Zellen lässt auf ein angepasstes Progenitorzellkonzept der Karzinogenese schließen. Hierbei gibt es eine myoepitheliale und eine glanduläre Zelllinie mit unterschiedlichen Differenzierungsgraden.

Mit den verschiedenen Differenzierungsstufen sind verschiedene Tumore in ihrer Entstehung assoziiert. So entstehen über 95% aller invasiven Karzinome aus der reifen glandulären Zelle, welche nur CK8/18 exprimiert [1]. Die auf diesem Entwicklungsweg entstandenen Karzinome lassen sich G1 bis G3 zuordnen. Weniger als 10% der invasiven und weniger als 5% der nichtinvasiven Karzinome exprimieren CK5/14 und sind immer dem G3 highgrade Typ zu zuordnen [1]. Aufgrund dieser unterschiedlichen Ursprungszellen geht man davon aus, dass es mehrere genetische Wege mit unterschiedlichen Vorläuferläsionen, entstanden aus eigenen klonalen Prozessen, gibt. Man scheint anhand der Zelldifferenzierung verschiedener

Tumorarten den Phänotyp der Zelle und den Punkt in der Zelldifferenzierung feststellen zu können, von dem aus der Tumor seinen Ursprung fand [1].

Das Progenitorzellkonzept, welches besagt, dass Brustkarzinome aus unterschiedlichen Differenzierungsstufen des Brustepithels entstehen, steht in Kontrast zu der bisherigen Ansicht der Tumorgenese, welche auf einer verantwortlichen Stammzelle und Vorläuferläsion basiert.

4.2 Immunphänotyp des normalen Mammagewebes

Das bisher angenommene Zweizell- Modell mit basalen myoepithelialen und luminalen glandulären Zellen lässt sich nach aktuellen Daten nicht aufrechterhalten.

Immunfluoreszenzuntersuchungen mit simultaner Darstellung basaler und luminaler Zytokeratine sowie myoepithelialer Marker haben gezeigt, dass sowohl in der inneren Zellreihe des Gangsystems, als auch in den Läppchen Progenitorzellen vorkommen, die durch ausschließliche Expression von basalen CK5/14 charakterisiert sind [9]. Diese Progenitorzellen lassen sich somit im Gegensatz zu denen in Speicheldrüsen keiner bestimmten Zellschicht zuordnen. In der glandulären Differenzierungslinie entsteht über eine intermediäre CK5/14 und CK8/18 positive Zelle eine reife Drüsenzelle, welche nur noch CK8/18 exprimiert. In der laktierenden Mamma sind die glandulären Zellen der lobulären Ductuli ausschließlich enddifferenzierte CK8/18 positive Zellen [5].

Die myoepitheliale Differenzierungslinie entwickelt aus der CK5/14 positiven Progenitorzelle eine CK5/14 und sm-Aktin koexprimierende Intermediärzelle, aus welcher schließlich die differenzierte Myoepithelzelle wird, welche nur noch sm-Aktin exprimiert.

In dieser Arbeit werden fünf Fälle normalen Mammagewebes ausgewertet, welche aus Mammareduktionsplastiken stammen. Die Proben werden unabhängig von Zyklusstatus oder Hormoneinnahme untersucht. In diesen Fällen werden pro Schnitt der vier verschiedenen Doppelmarkierungen so viele Läppchen ausgewertet, bis eine Gesamtzellzahl von 15000 Zellen erreicht wird. Von den interlobulären Gängen werden jeweils alle geeigneten Gänge ausgezählt.

CK5/6 und CK8/18 Expression im normalen Läppchen und normalen Gang:

Im Durchschnitt zeigte das lobuläre Epithel 87,8% CK8/18 exprimierende Zellen und 8,1% CK5/6 positive Zellen. Die Summe dieser beiden Merkmale liegt nicht bei 100%, da in den Färbungen für CK5/6 und CK8/18 nicht die identischen Läppchen ausgezählt wurden, sondern vielmehr die Strukturen ausgewertet wurden, welche im Schnitt die beste Färbungsintensität aufwiesen, bis eine Gesamtzahl von 15000 Zellen erreicht wurde. Da die prozentuale Zusammensetzung von CK5/6 und CK8/18 auch in den Läppchen eines

Schnittes unterschiedlich ist, kommt es bei der Addition von CK5/6 und CK8/18 positiven Zellen zu einer von 100% abweichenden Zahl, was nicht bedeuten muss, dass es Zellen gibt, welche für beide Merkmale negativ sind. Daher können in dieser Arbeit nur durchschnittliche prozentuale Anteile für die Merkmale der jeweiligen Doppelmarkierung berechnet werden. Über eine Koexpression der anderen untersuchten Merkmale können nur Tendenzen erkannt werden, es kann über eine Tripel- Expression keine Aussage getroffen werden.

CK8/18 Expression findet sich nach dem Progenitorzellmodell entweder in der reifen Drüsenzelle, welche CK8/18 in Abwesenheit von CK5/6 exprimiert, oder im Intermediärzelltyp, welcher eine Koexpression von CK8/18 und CK5/6 aufweist. Unter den CK5/6 positiven Zellen findet sich ein geringerer Teil nur CK5/14 exprimierender Stammzellen, welche für CK8/18 negativ sind, und ein größerer Teil CK5/6 positiver Zellen, die dem Intermediärzelltyp des Progenitorzellmodells zuzuordnen sind, da sie eine Koexpression mit CK8/18 zeigen. Da es im normalen Lämpchen 8,1% CK5/6 positive Zellen gibt, kann der Anteil intermediärer Zellen höchstens bei 8,1% liegen. Nach ersten Pilotuntersuchungen mit dreifacher Immunfluoreszenzmarkierung von CK18, CK5/6 und sm-Aktin kann dies bestätigt werden (Böcker, persönliche Aussage). Studien zeigen, dass 1-2% der CK5/6 positiven Zellen den CK5/14 positiven Progenitorzellen zuzuordnen sind, welche ausschliesslich basale Zytokeratine exprimieren [9] und somit zur Ermittlung des Anteils der Intermediärzellgruppe noch von den 8,1% abzuziehen wären. Der Anteil der CK8/18 exprimierenden Zellen, wie auch der Anteil der CK5/6 exprimierenden Zellen variiert in den ausgewerteten Fällen, was möglicherweise mit dem individuellen Zykluszeitpunkt bei Probenentnahme, dem Hormonstatus, sowie der Reifung und dem Differenzierungsgrad der Lämpchen zu begründen ist.

Das Verhältnis von CK8/18 positiven Zellen zu CK5/6 positiven Zellen unterscheidet sich im normalen Gang von den Werten im Lämpchen. Aus Diagramm 3.1 wird ersichtlich, dass im Gangsystem im Durchschnitt 43,6% der Zellen CK8/18 positiv und 93,1% CK5/6 positiv sind. Daraus ergibt sich eine Summe der beiden Prozentwerte von 136,7%. Die Überschneidung der beiden Zellgruppen zeigt tendenziell, dass der Anteil der CK5/6 und CK8/18 koexprimierenden Intermediärzellen im normalen Gang durchschnittlich mindestens 36,7% betragen muss und somit deutlich höher liegt als im normalen Lämpchen mit höchstens 8,1%. Im Gang sind die CK8/18 positiven Zellen somit überwiegend den Intermediärzellen zuzuordnen. Unter der Annahme, dass der Anteil von ausschließlich CK5/14 positiven Progenitorzellen nur etwa 1-2% der Epithelzellen ausmachen dürfte [1], würde man sowohl im Lämpchen als auch im Gang die meisten CK5/6 positiven Zellen dem Intermediärtyp des Progenitorzellmodells zuordnen müssen.

Expression von ER in Läppchen und Gang:

Nach Studien von Shoker [10] sind im Läppchen der normalen prämenopausalen Brust 4-15% der Zellen ER positiv. Sie liegen einzeln oder in kleinen Gruppen und sind von ER negativen Zellen umgeben. Mit dem Alter der Patientin steigt statistisch signifikant die Anzahl der ER positiven Zellen. Nach der Menopause wird ein Plateau erreicht und die ER positiven Zellen können den Hauptteil der Zellen eines Ductulus ausmachen. Bisher gibt es keine Hinweise, dass diese Zellen als präkanzerös zu betrachten sind [10].

Der von Shoker beschriebene Anteil ER positiver Zellen von 4-15% findet sich auch in dieser Arbeit wieder. Gemessen an der Gesamtzellzahl sind in den ausgewerteten fünf Fällen normalen prämenopausalen Brustepithels 3-9% der Zellen des Läppchenepithels ER positiv. Im normalen Gangepithel exprimieren 6-11% der Zellen den ER. Im Durchschnitt der fünf Fälle zeigt das normale Läppchen mit 7,1% einen ähnlichen Anteil ER positiver Zellen wie der normale Gang mit 7,9% ER exprimierenden Zellen.

Nach Shoker findet sich im Epithel der normalen Brust und in der DH keine Koexpression von ER und Ki67 [10]. Clarke postuliert auf Grund seiner Ergebnisse, dass ER positive Zellen eine langsam proliferierende Zellpopulation darstellen [16]. Auch Iqbal et al beschreiben, dass CK8/18 und ER positive Zellen eine langsam proliferierende Zellgruppe seien, was auch durch die dissoziierte Expression von ER und dem Proliferationsmarker Ki67 im normalen Brustepithel deutlich werde [11].

Gemessen an der Gesamtzellzahl hat das normale Läppchen mit durchschnittlich 7,1% ähnlich viele ER positive Zellen, wie der normale Gang mit durchschnittlich 7,9% (Diagramm 3.2). In dieser Arbeit zeigt sich, dass Östrogenrezeptoren nahezu ausschliesslich in Koexpression mit CK8/18 in der TDLE der normalen weiblichen Brust vorkommen. Diagramm 3.3 zeigt, dass im normalen Läppchen durchschnittlich 94,4% der ER positiven Zellen gleichzeitig CK8/18 exprimieren, während 12,9% für CK5/6 positiv sind. Mit der Summe dieser beiden Zellgruppen von 107,2% wird deutlich, dass mindestens 7,2% der ER positiven Zellen im Läppchen eine Koexpression basaler und luminaler Zytokeratine zeigen und somit der Intermediärzellgruppe des Progenitorzellmodells zuzuordnen wären.

Der überwiegende Teil der CK8/18 exprimierenden Zellen des Läppchens ist jedoch den Drüsenzellen zuzuordnen. Die durchschnittliche CK8/18 Expression liegt im Läppchen bei 87,8%. Mit 7,2% weisen die CK8/18 positiven Drüsenzellen eine niedrigere ER Expression auf, als die Gruppe der CK5/6 positiven potentiellen Intermediärzellen des Läppchens mit 12,1% (Diagramm 3.6).

Diagramm 3.3 zeigt den Anteil CK8/18 oder CK5/6 exprimierender Zellen an den ER positiven Zellen im Gangsystem. Hier sind 88,7% der ER exprimierenden Zellen CK8/18 positiv und 78,2% exprimieren CK5/6. Die große Überschneidung der beiden Werte macht deutlich, dass im Gangsystem ein

Großteil der ER positiven Zellen dem Intermediärzelltyp zuzuordnen ist. Da 88,7% der ER positiven Zellen CK8/18 exprimieren und 78,2% CK5/6 positiv sind, ergibt sich unter den ER positiven Zellen eine Differenz von mindestens 10,4%, welche nur CK8/18 exprimieren und somit den reifen Drüsenzellen zuzuordnen sind.

Wenn man bei den Daten in Diagramm 3.5 davon ausgeht, dass die CK8/18 exprimierenden Zellen im Gangsystem überwiegend dem Intermediärzelltyp angehören und in Diagramm 3.6 voraussetzt, dass abzüglich 1-2% [1] die CK5/6 exprimierenden Zellen im Gang auch dem Intermediärzelltyp entsprechen, so stellt man fest, dass es eine Differenz zwischen den Anteilen der jeweils ER positiven Zellen gibt. Im Gang sind 16,1% der CK8/18 positiven Zellen ER positiv und 6,7% der CK5/6 positiven Zellen sind ER positiv. Diese Differenz könnte man so interpretieren, dass es im Gang nicht nur CK8/18 positive Intermediärzellen gibt, welche CK5/6 koexprimieren, sondern auch CK8/18 positive Drüsenzellen, welche in Abwesenheit von CK5/6, den ER exprimieren. Diese Zellen dürften nach den Ergebnissen von Shoker Ki67 negativen Zellen entsprechen [11]. Gleichermäßen dürften die 4,7% der CK8/18 positiven Zellen, welche den Proliferationsfaktor aufweisen, ER negativ sein.

Expression von Ki67 in Läppchen und Gang:

Das Läppchensystem zeigt mit 4,3% eine leicht höhere Proliferationsrate als das Gangsystem mit 3,1% (Diagramm 3.2). Wenn man den Anteil Ki67 positiver Zellen auf die Koexpression von CK5/6 oder CK8/18 untersucht, wird deutlich, dass im Läppchen durchschnittlich 88,8% der proliferierenden Zellen CK8/18 positiv sind und nur 11,4% der proliferierenden Zellen CK5/6 exprimieren. Diese 11,4% CK5/6 positiven, proliferierenden Zellen beinhalten möglicherweise sowohl einzelne proliferierende CK5/14 positive Progenitorzellen, als auch einen proliferierenden Anteil von CK5/6 und CK8/18 positiven Intermediärzellen [9]. Insgesamt kann man sagen, dass unter den proliferierenden Zellen des Läppchens mindestens 77,4% den ausschließlich CK8/18 exprimierenden Drüsenzellen zuzuordnen sind und maximal 11,4% proliferierende Intermediär- und Progenitorzellen sind. Studien bestätigen, dass in der weiblichen Brust die CK8/18 positiven Zellen reife differenzierte glanduläre Zellen sind und ihnen die höchste mitotische Aktivität zugesprochen wird [17].

Im Gang sieht das Verhältnis anders aus. In Diagramm 3.4 erkennt man, dass von den proliferierenden Zellen 78,7% CK8/18 positiv sind und 79,3% CK5/6 exprimieren. Da die Summe dieser beiden Zellgruppen deutlich über 100% liegt, gibt es unter den proliferierenden Zellen eine Zellgruppe unbestimmter Größe, die sowohl CK8/18 als auch CK5/6 exprimiert und somit dem Intermediärzelltyp des Progenitorzellmodells zuzuordnen ist. Ein großer Anteil der proliferierenden Zellen des Gangs ist somit dem Intermediärzelltyp zuzuordnen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es im Gang mehr Intermediärzellen gibt als im Läppchen und dass von den Ki67 oder ER positiven Zellen im Gang ein großer Anteil den Intermediärzellen zuzuordnen ist, während im Läppchen die meisten Ki67 oder ER exprimierenden Zellen den CK8/18 positiven Drüsenzellen zuzuordnen sind. Desweiteren gibt es im Gang nicht nur CK8/18 positive Intermediärzellen, welche CK5/6 koexprimieren, sondern auch CK8/18 positive reife Drüsenzellen, welche in Abwesenheit von CK5/6, den ER exprimieren.

4.3 Intraduktale Proliferationen

Bei den intraduktalen Proliferationen handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Läsionen. Sie unterscheiden sich im Phänotyp der proliferierenden Zellen, in ihrem Aufbau und in ihrer Dignität. Intraduktale Proliferationen entstehen in der terminalen duktal lobulären TDLE und weiten sich im Verlauf auf das duktal lobuläre System aus. Sie besitzen ein unterschiedlich hohes Potential, sich in ein invasives Karzinom weiter zu entwickeln. Man kann die intraduktalen Proliferationen in benigne proliferative Läsionen mit einem sehr geringen Entartungsrisiko und in potentielle Vorläuferläsionen mit einem erhöhten Entartungsrisiko einteilen.

4.3.1 Benigne proliferative Läsionen

Als benigne proliferative Läsionen bezeichnet man Gewebeproben, die keine Atypie aufweisen. Hierzu gehören die normale duktale Hyperplasie (DH), die Sklerosierende Adenosis, Papillome und Fibroadenome. Diese Läsionen haben ein sehr geringes Entartungsrisiko. Sie sind als Progenitorzellläsionen zu bezeichnen, welche aus CK5/14 positiven Zellen entstehen die entweder glandulärer oder myoepithelialer Differenzierung unterliegen [1]. Benigne proliferative Läsionen sind keine direkten Vorstufen für invasive Brustkrebsformen, vielmehr zeigen sie die zelluläre Zusammensetzung des normalen Brustepithels und enthalten CK5/14 positive Zellen und ihre glandulären oder myoepithelialen Nachfolger. In dieser Arbeit soll das normale Brustgewebe mit der benignen proliferativen Läsion der DH verglichen werden. In der DH proliferieren CK5/14 positive Zellen sowie ihre glandulären Nachfolger und haben den Kontakt zur Myoepithelzellschicht verloren [1]. Trotzdem repräsentieren diese Läsionen benigne proliferative Prozesse, weil sich die Zellen eindeutig in glanduläre oder in myoepitheliale Zellen differenzieren. Im Vergleich zur normalen Brust gehen das räumliche Muster und der histologische Aufbau verloren. Es findet sich außerdem eine Imbalance in der Zusammensetzung von epithelialen Zellen, Stromazellen und Zellen der extrazellulären Matrix. Das sind Charakteristiken, die auch für andere benigne

Mammaläsionen gelten, wobei sie sich in der Ausprägung der glandulären oder myoepithelialen Differenzierung unterscheiden.

Studien mit comparativer genomischer Hybridisierung und LOH Analysen haben gezeigt, dass die DH möglicherweise klonal, jedoch genetisch nicht vergleichbar ist mit dem DCIS und dem invasiven Karzinom, da die gefundenen genetischen Veränderungen nur vereinzelt vorkommen und nicht kontinuierlich wieder zu finden sind, wie es an den Chromosomen von DCIS der Fall war [1]. Dass diese gefundenen genetischen Veränderungen in der DH nicht vergleichbar mit denen des DCIS sind, wird durch die Tatsache unterstützt, dass auch in normalem Brustgewebe genetische Veränderungen zu beobachten sind [18]. Man vermutet, dass feine genetische Veränderungen bereits an frühen Zellvorstufen stattfinden. Zusammen mit externen Stimuli stören sie den Wachstums- und Differenzierungsmechanismus und verändern die Zellanordnung.

Insgesamt kann man sagen, dass die benigne proliferative Läsion der duktaalen Hyperplasie den gleichen Prozess epithelialer Differenzierung durchläuft wie normales Brustgewebe. Die zelluläre Zusammensetzung von benignen proliferativen Läsionen unterscheidet sich stark von der Beschaffenheit maligner epithelialer Proliferationen wie den ADH, den DCIS, den LN, sowie invasiven Karzinomen, deren Zellen von Anfang an einen rein glandulären, CK8/18 positiven und CK5/14 negativen Phänotyp zeigen. Dieser immunophänotypische Unterschied lässt auf einen unterschiedlichen zellulären Ursprung schließen [1].

4.3.1.1 Duktale Hyperplasie

Die DH ist eine Läsion die auf intraduktaler Proliferation beruht, weshalb sie oft in Bezug zu Läsionen wie ADH und DCIS gesetzt wurde. Man hat die DH daher als lange als ersten Schritt in der Karzinogenese des Mammakarzinoms betrachtet. Aktuelle Studien stellen dieses Konzept jedoch in Frage [10], [11], [18]. Man hat festgestellt, dass die DH und das DCIS völlig anders aufgebaut sind. Immunfluoreszenzuntersuchungen haben gezeigt, dass in der DH sowohl CK5/14 positive Progenitorzellen, als auch CK5/14 und CK8/18 positive intermediäre Zellen und Zellen mit CK8/18 positivem Immunphänotyp vorkommen [1]. Da alle diese Zellen Stufen des normalen glandulären Differenzierungsweges sind, kann man die DH als Progenitorzellläsion bezeichnen. In den Vorläuferläsionen ADH und DCIS hingegen finden sich nur CK8/18 positive proliferierende Zellen im Sinne eines glandulären Phänotyps. CK5/14 positive Zellen fehlen. Hieraus ergibt sich die Sichtweise, dass die DH im Zelldifferenzierungsweg einen anderen zellulären Ursprung hat als die ADH und das DCIS. In dieser Arbeit werden vier Läsionen duktaaler Hyperplasie ausgezählt. Dabei werden jeweils rund 3000 Zellen den verschiedenen

immunphänotypischen Zellgruppen zugeordnet, welche sich aus den jeweiligen Doppelmarkierungen ergeben.

Wenn man in Diagramm 3.1 die Werte für CK8/18 und CK5/6 gemessen an der Gesamtzellzahl betrachtet, so stellt man fest, dass in den vier untersuchten Fällen von DH, der Anteil der CK8/18 positiven Zellen mit durchschnittlich 87,4% sehr nahe an dem Durchschnittswert des normalen Lämpchens mit 87,8% liegt. Allerdings weist die DH mit durchschnittlich 66,6% einen wesentlich höheren Anteil an CK5/6 exprimierenden Zellen auf als das normale Lämpchen mit 8,1%, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass die DH als Progenitorzellläsion zu betrachten ist. Der hohe Anteil von 93,1% CK5/6 positiven Zellen im Gang wird in der DH nicht erreicht.

Addiert man die Durchschnittswerte der DH für CK8/18 positive Zellen und CK5/6 exprimierende Zellen, so erkennt man, dass die Summe dieser beiden Zellgruppen bei 154,0% liegt. Somit gibt es eine Intermediärzellgruppe von mindestens 54,0% gemessen an der Gesamtzellzahl, welche sowohl CK8/18 als auch CK5/6 exprimiert. Die genaue Größe dieser Intermediärzellgruppe ist in dieser Arbeit nicht zu bestimmen, da keine Doppelmarkierung von CK8/18 und CK5/14 verwendet wird. Diese im Vergleich zum Normalgewebe große Intermediärzellgruppe wurde bereits 1979 von Azzopardi beschrieben. Azzopardi beschreibt die DH (als Epitheliosis bezeichnet), als eine abweichende Differenzierung von klar erkennbaren Epithelzellen einerseits und als große Masse von Übergangszellen andererseits [19].

Man kann die DH als das Ergebnis von Wachstumsstörungen und fehlerhafter räumlicher Anordnung betrachten, die in einer unzureichenden Anordnung der Zellen resultiert. Das CK5/14 Mosaik ist ein diagnostischer Faktor bei der Beurteilung der DH. Wenn die intraduktale epitheliale Proliferation CK5/14 negativ ist, schließt dies eine DH aus. Die typische Anordnung der CK5/14 exprimierenden Zellen steht in scharfem Kontrast zu low- und intermediate DCIS in denen sich CK8/18 positive klonale Proliferation findet und sogar zu den meisten highgrade DCIS in denen sich teilweise CK5/14 positive Zellen finden. Man kann die CK5/14 positiven Tumorzellen in highgrade DCIS von den CK5/14 positiven, benignen intermediären Zellen der DH dadurch unterscheiden, dass sie im DCIS als uniforme klonale Zellen auftreten und in der DH in einem typischen Mosaikmuster angeordnet sind [1].

Mit 66,6% gemessen an der Gesamtzellzahl zeigt die DH in dieser Arbeit durchschnittlich einen hohen Anteil CK5/6 positiver Zellen. Sie liegt mit diesem Wert deutlich über den Werten des normalen Lämpchens von 8,1% und grenzt sich von den Vorläuferläsionen LN, FEA, ADH und dem DCIS ab, welche mit Ausnahme der LN, die durchschnittlich bei 2,3% liegt, alle unter 1,0% CK5/6 positive Zellen aufweisen, die am ehesten dem ursprünglichen Epithel zuzuordnen sind.

In den Doppelmarkierungen von CK5/6 mit dem ER und mit Ki67 zeigt sich in Diagramm 3.6, dass die DH im Vergleich zum Normalgewebe einen geringeren Anteil von ER und Ki67 Expression in den CK5/6 exprimierenden Zellen zeigt.

Immunhistochemische Studien [1] haben gezeigt, dass in der DH CK5/14 positive Progenitorzellen und ihre glandulären Nachfolger proliferieren. Der Proliferationsmarker Ki67 weist bei der DH in den CK5/6 positiven Zellen jedoch nur einen Anteil von 1,3% auf und liegt damit im Durchschnitt niedriger als der Anteil der proliferierenden CK5/6 positiven Zellen im Normalgewebe, welcher im Läppchen bei 6,2% liegt und im Gang bei 2,9%. Die Gruppe der CK5/6 positiven Zellen in der DH hat somit eine niedrige Proliferationsrate als die CK5/6 positiven Zellen des Normalgewebes. Wenn die CK5/6 positiven Zellen der DH als Ursprungszellen der DH angesehen werden, so ist ihre Proliferationsrate niedrig, was den benignen Charakter dieser Progenitorzellläsion hervorhebt.

Auch bei den CK8/18 positiven Zellen der DH zeigt sich in Diagramm 3.5 mit 3,8% eine etwas niedrigere Proliferationsrate als im normalen Gang mit 4,7% und im normalen Läppchen mit 4,3%. Gemessen an der Gesamtzellzahl (Diagramm 3.2) liegt die Proliferationsrate der DH mit 3,9% zwischen der Proliferationsrate des Gangs mit 3,1% und der des Läppchens mit 4,3%. Eine Erhöhung der Ki67 Expression gegenüber dem Normalgewebe konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden, was den benignen Charakter der DH unterstreicht.

Diagramm 3.4 zeigt, dass von den proliferierenden, Ki67 positiven Zellen der DH 80,7% CK8/18 und 25,1% CK5/6 exprimieren. Da die Summe dieser beiden Zellgruppen über 100,0% liegt, kann man von einer proliferierenden, CK5/6 und CK8/18 exprimierenden Intermediärzellgruppe ausgehen, welche mindestens 5,8% groß ist. Über die exakte Größe dieser Zellgruppe kann ohne eine Tripelmarkierung von CK5/6, CK8/18 und Ki67 keine Aussage getroffen werden. Der Anteil der CK8/18 positiven Zellen an den proliferierenden Zellen liegt mit 80,7% zwischen dem normalen Gang mit 78,7% in dieser Zellgruppe und dem normalen Läppchen mit 88,8%.

Zugenommen im Vergleich zum normalen Läppchen mit 11,4%, hat in der DH mit durchschnittlich 25,1% der Anteil der Ki67 exprimierenden Zellen welche CK5/6 positiv sind. Somit hat entweder der Anteil der CK5/6 und CK8/18 positiven proliferierenden Intermediärzellen in der DH verglichen mit dem Läppchen zugenommen, oder die CK5/14 positiven proliferierenden Progenitorzellen haben in der DH einen größeren Anteil als im normalen Läppchen.

Shoker [10] fand heraus, dass der Anteil der ER positiven Zellen in der DH wie in der normalen Brust mit dem Alter ansteigt, was die These unterstützt, dass die DH eine benigne Läsion mit dem gleichen Differenzierungsweg wie normales Brustgewebe ist. In einigen Läsionen duktaler Hyperplasie liegen die ER positiven Zellen einzeln und sind wie im normalen Brustgewebe von ER negativen Zellen umrandet. Manche DH Läsionen zeigen jedoch zusammenhängende Gruppen ER positiver Zellen und gleichzeitig auch einen höheren Anteil ER positiver Zellen insgesamt. Die DH Läsionen mit nicht zusammenhängend liegenden ER positiven Zellen finden sich bei jüngeren

Patientinnen, wohingegen die DH Läsionen mit zusammenhängenden Gruppen ER positiver Zellen bei älteren Patientinnen zu finden sind [10]. In einzelnen DH Läsionen waren nach Shoker über 90,0% der Zellen ER positiv und zeigten eine abnormale Koexpression von Ki67, eine Verteilung, wie sie im DCIS und in der ADH gefunden wird. Solche Einzelfälle von DH mit hohen Anteilen ER positiver Zellen werden in dieser Arbeit nicht untersucht.

Die verwendeten Präparate zeigen zwischen 19,6% und 35,2% ER positive Zellen gemessen an der jeweiligen Gesamtzellzahl. Im Durchschnitt der untersuchten vier Fälle liegt der Anteil der ER positiven Zellen der DH, gemessen an der Gesamtzellzahl bei 29,5%. Dieser Wert ist gegenüber dem Normalgewebe deutlich erhöht. Im Lämpchen finden sich durchschnittlich 7,1% ER positive Zellen und im Gang durchschnittlich 7,9% ER positive Zellen. Mit einer ER Expression in durchschnittlich 29,5% der Zellen grenzt sich die DH auch von den Vorläuferläsionen LN, ADH, FEA und dem DCIS ab. Während in der LN eine ER Expression durchschnittlich bei 77,2% der Zellen zu finden ist, so weisen die anderen untersuchten Vorläuferläsionen Anteile dieser Zellgruppe von über 97,0% auf.

Diagramm 3.6 zeigt, dass sich in der Gruppe der CK5/6 positiven Zellen, welche in der DH 66,6% der Gesamtzellzahl ausmacht, mit 4,5% weniger ER positive Zellen finden als im Normalgewebe. Im Lämpchen hat die Zellgruppe der ER exprimierenden Zellen an den CK5/6 positiven Zellen einen Anteil von 12,1% und im Gang liegt diese Zellgruppe bei 6,7%. Dieser niedrige Anteil ER positiver Zellen an den CK5/6 exprimierenden Zellen in der DH ist möglicherweise damit zu erklären, dass die Gruppe der CK5/14 positiven Progenitorzellen an der Gesamtzahl der CK5/6 positiven Zellen in der DH zugenommen hat. Da sich in dieser Zellgruppe im Normalgewebe keine ER Expression findet [1], wäre es denkbar, dass dieses auch für die DH gilt und somit der potentiell hohe, ER negative Progenitorzellanteil den Anteil ER positiver Zellen an der Gesamtzahl der CK5/6 exprimierenden Zellen senkt.

Die CK8/18 exprimierenden Zellen der DH zeigen zu 33,2% eine ER Expression. Die CK8/18 positiven Zellen, welche diese gegenüber dem Normalgewebe erhöhte ER Expression zeigen, sind entweder dem CK8/18 positiven glandulären Zelltyp, oder dem CK8/18 und CK5/6 koexprimierenden Intermediärzelltyp zuzuordnen. Die ER Expression in den CK8/18 positiven Zellen in der DH ist, gegenüber dem Normalgewebe mit Anteilen dieser Zellgruppe von 16,1% im Gang und 7,2% im Lämpchen, deutlich erhöht. Shoker weist darauf hin, dass in der DH zwar eine offensichtliche Dysregulation der ER positiven Zellen vorzufinden ist, aber gleichzeitig Mechanismen vorhanden zu sein scheinen, welche die Homöostase regeln [10]. Er gibt als mögliches Beispiel den Zellkontakt zwischen ER positiven Zellen an. Das würde erklären, dass sich die DH mit durchschnittlich 33,2% ER positiven Zellen an den CK8/18 positiven Zellen deutlich von den Vorläuferläsionen abhebt, welche in der LN bereits einen Anteil von 80,9% in dieser Zellgruppe aufweisen, der bei FEA, ADH und dem DCIS bei über 97,0% liegt. Die Rolle der DH als benigne

proliferative Läsion wird durch die ER Expression sowohl in den CK5/6 positiven Zellen, als auch in den CK8/18 positiven Zellen verdeutlicht. Bei den CK5/6 positiven Zellen ist die ER Expression niedriger als im Normalgewebe und unterliegt somit möglicherweise erhaltenen Regulationsmechanismen und in den CK8/18 positiven Zellen ist die ER Expression deutlich weniger erhöht als in den Vorläuferläsionen.

Anhand der Koexpression von ER und Ki67 teilt Iqbal [11] die DH Läsionen in zwei Gruppen ein. Die Mehrheit der DH Läsionen weisen keine Zellen auf, die gleichzeitig ER und Ki67 exprimieren und sind der ersten Gruppe der DH Läsionen zuzuordnen, welche dem normalen Brustgewebe ähnlich ist. Die zweite Gruppe ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein von Zellen, welche sowohl ER als auch Ki67 exprimieren. Iqbal beschreibt, dass ein wachsender Anteil ER positiver Zellen in der DH mit einer fallenden Proliferationsrate einhergeht, wobei das Verhältnis Ki67 positiver Zellen zu ER positiven und ER negativen Zellen konstant bleibt. Diese Aussage lässt sich in dieser Arbeit für die CK8/18 positiven Zellen der DH bestätigen. In den CK8/18 positiven Zellen der DH, welche entweder dem glandulären CK8/18 positiven Zelltyp, oder dem CK8/18 und CK5/6 exprimierenden Intermediärzelltyp zuzuordnen sind, steigt der Anteil der ER exprimierenden Zellen auf 33,3% an und ist somit gegenüber dem Normalgewebe deutlich erhöht. Hierbei sinkt entsprechend der Aussage von Iqbal der Anteil der Ki67 exprimierenden Zellen unter den CK8/18 positiven Zellen. In den CK5/6 positiven Zellen lässt sich Iqbals Aussage nicht bestätigen, da bei den CK5/6 positiven Zellen, welche entweder dem CK5/14 positiven Progenitorzelltyp oder dem CK5/6 und CK8/18 positiven Intermediärzelltyp zuzuordnen sind, gegenüber dem Normalgewebe sowohl die ER als auch die Ki67 Expressionsrate sinken. Es gibt in der Expressionsrate von ER und Ki67 starke Unterschiede zwischen Patientinnen, aber auch zwischen verschiedenen DH Läsionen einer Patientin [10], [11]. In dieser Arbeit schwanken die Einzelwerte der Patientinnen für den ER in der DH zwischen 19,6% und 35,2% gemessen an der Gesamtzellzahl und für Ki67 reichen in der DH die Anteile an der Gesamtzellzahl von 1,6% bis 6,1%. Shoker schließt aus diesen Unterschieden, dass die von ihm untersuchten einzelnen Läsionen autonom sind und nicht direkt abhängig von Einflussfaktoren wie Alter und hormonellem Status.

Betrachtet man in Diagramm 3.3 die Gruppe der ER positiven Zellen in der DH, so sind 96,8% dieser ER positiven Zellen gleichzeitig CK8/18 positiv und 10,1% gleichzeitig CK5/6 positiv. Diese beiden Werte liegen in der Summe bei 106,9%, weshalb es eine gleichzeitig CK5/6, CK8/18 und ER positive Intermediärzellgruppe gibt, welche mindestens 6,9% der ER positiven Zellen beträgt. Wenn man diesen Wert von den 10,1% CK5/6 positiven Zellen an den ER positiven Zellen abzieht, so bleiben von den ER exprimierenden Zellen der DH nur 3,4% übrig, für die ein potentieller ER positiver CK5/14 exprimierender Progenitorzelltyp denkbar wäre. Folglich liegt für die DH eine erhaltene Regulation der ER Expression auf Ebene der CK5/14 positiven Progenitorzellen

nahe, was durch Tripelmarkierungen mit CK5/14, CK8/18 und ER geprüft werden kann.

4.3.2 Vorläuferläsionen invasiver Karzinome

Vorläuferläsionen sind von der WHO als biologisch und klinisch heterogene neoplastische Läsionen definiert, welche das Potential besitzen, sich direkt in ein invasives Karzinom weiterzuentwickeln. Zu den Vorläuferläsionen gehören die lobuläre Neoplasie (LN), die flach epitheliale Atypie (FEA), die atypisch duktale Hyperplasie (ADH), sowie das duktale Carcinoma in situ (DCIS). Diese atypischen epithelialen Proliferationen entstehen, bis auf einzelne highgrade DCIS, fast ausschließlich de novo aus glandulären Zellen der terminalen duktal lobulären Einheit und entwickeln sich genetisch und morphologisch unterschiedlich [3].

Man unterscheidet bei den Vorläuferläsionen unterschiedliche Wachstumsmuster. Als duktales Wachstumsmuster bezeichnet man einen Vorgang, bei dem normale Epithelzellen einzelner betroffener Läppchen von Tumorzellen ersetzt werden. Die neoplastischen Zellen breiten sich zusammenhängend aus, wobei es zu einer Erweiterung der lobulären Strukturen kommt. Sobald es intraluminal zu brückenbildenden Wachstumsmustern kommt, ist dies ein frühes Anzeichen für Malignität in duktalem Läsionen.

Kennzeichnend für das lobuläre Wachstumsmuster, wie es in der LN zu finden ist, sind nicht zusammenhängende Tumorzellen, denen das Adhäsionsmolekül E-Cadherin fehlt [1]. Die neoplastischen Zellen infiltrieren das Epithel und ersetzen die gesunden Zellen. Immunhistochemisch sind die Tumorzellen gut an der fehlenden CK5/14 Expression zu erkennen. Im Gegensatz zur kompletten Ausfüllung des Lumens mit Tumorzellen in duktalem Läsionen, bleibt beim lobulären Wachstumsmuster die lobuläre Struktur erhalten. In duktalem und lobulären Läsionen bleibt die Myoepithelzellschicht erhalten, wird jedoch von den proliferierenden Tumorzellen zurückgedrängt [1].

Der Entwicklungsschritt einer Vorläuferläsion zu einem invasiven Karzinom wird vom Differenzierungsgrad der Vorläuferläsion und der Ausbreitung der neoplastischen Zellen im duktal lobulären System mitbestimmt. Oft kommt die FEA gemeinsam mit einer ADH, einem low grade DCIS oder einer invasiven Brustkrebsform, besonders dem tubulären Karzinom vor. Studien haben gezeigt, dass diese Vorläuferläsionen dieselben genetischen Veränderungen zeigen, wie gleichzeitig vorkommende ipsilaterale invasive Karzinome [20].

Morphologisch unterscheidet sich das lowgrade DCIS durch eine zusätzliche intraluminale Proliferation der atypischen Zellen, welche vom selben Zelltyp sind wie bei der FEA und ADH. Immunhistochemisch zeigen diese Vorläuferläsionen und ihre nachfolgenden invasiven Formen einen glandulären

CK8/18 positiven und CK5/14 negativen Phänotyp. Sie exprimieren alle Östrogenrezeptoren und zeigen eine niedrige Proliferationsrate.

Epidemiologisch gesehen weichen die DH und das DCIS in Bezug auf das Entartungsrisiko stark voneinander ab. Die DH geht lediglich mit einem generell leicht erhöhten Krebsrisiko einher, wohingegen das DCIS als unmittelbare Krebsvorstufe gilt, wobei hier das lokale Krebsrisiko besonders hervorzuheben ist. Die Verteilung der Östrogenrezeptoren unterscheidet sich bei der ADH, der LN und dem DCIS erheblich von der Verteilung in der DH. Während sich bei der DH einzeln verteilte ER positive Zellen finden, welche von ER negativen Zellen umgeben sind und zusammenhängende Gruppen von zehn oder mehr ER positiven Zellen nur in etwa 50% der DH Läsionen vorkommen [10], zeigen sich bei ADH, LN und DCIS in allen Läsionen große Gruppen zusammenhängender ER positiver Zellen. Die ER positiven Zellen haben in diesen Vorläuferläsionen einen hohen Anteil gemessen an der Gesamtzellzahl. Das Verhältnis des Alters zur Anzahl der ER positiven Zellen ist in diesen Läsionen nicht mehr vorhanden [10].

Im Mammakarzinom sind nahezu alle Zellen ER positiv und liegen zusammenhängend. Aufgrund der ähnlichen Morphologie, der Architektur und der Ähnlichkeiten in den genetischen Veränderungen, ist zu vermuten, dass aus Vorläuferläsionen wie der FEA und der ADH ein lowgrade DCIS entsteht, aus dem sich ein G1 tubuläres Karzinom entwickelt [1]. Auch zwischen den highgrade Läsionen gibt es Ähnlichkeiten im Phänotyp und in genetischen Veränderungen. Sie haben alle eine signifikante cytologische Atypie mit maligner Zellkernmorphologie und exprimieren sowohl CK8/18 als auch CK5/14. Hierzu gehören 4% der in situ Vorstufen und 8% der invasiven Brustkarzinome. Die Entstehung dieser Karzinome, die dem highgrade Typ zuzuordnen sind, ist bisher nicht geklärt.

4.3.2.1 Lobuläre Neoplasie

Die LN ist eine charakteristische nichtinvasive Proliferation monomorpher atypischer Zellen im lobulären Brustgewebe. Die Tumorzellen liegen nicht aneinander an, da ihnen das Adhäsionsmolekül E-Cadherin, im Gegensatz zu den duktalem Läsionen, fehlt [21]. Sind mehr als 50% der Acini eines Läppchens von den Tumorzellen ausgefüllt und erweitert, so spricht man von einem lobulären Carcinoma in situ (LCIS), sind weniger als 50% betroffen, gilt die Läsion als atypisch lobuläre Hyperplasie (ALH). Da die Unterscheidung anhand der Anzahl der betroffenen Acini in der Praxis schwierig ist, bezeichnet die WHO beide Ausprägungen dieser charakteristischen Proliferation als lobuläre Neoplasie (LN). Im Gegensatz zur duktalem Neoplasie, bei der die lobulären Strukturen durch intraluminale Proliferation ausgeweitet werden, bleibt die ursprüngliche Architektur des Läppchens beim lobulären Wachstumsmuster der LN erhalten.

Das LCIS geht mit einem erhöhten relativen Risiko einher, ipsilateral oder kontralateral ein invasives Karzinom zu entwickeln. Ein Viertel aller Patientinnen mit einem LCIS entwickeln ein invasives lobuläres Karzinom [1]. Kennzeichnend für das LCIS ist sein multizentrisch multifokales Wachstum. Wird ein LCIS in einer Biopsie gefunden, ist davon auszugehen, dass es sowohl in derselben, als auch in der anderen Brust weitere Bereiche eines LCIS gibt. Molekulare Studien zeigen, dass chromosomale Veränderungen, welche in lobulären Neoplasien gefunden wurden, auch in invasiven lobulären Karzinomen zu sehen waren, was vermuten lässt, dass die LN eine direkte Vorläuferläsion des invasiven lobulären Karzinoms sein könnte [2]. Das LCIS kommt überwiegend prämenopausal vor. Nach der Menopause sind weniger als 10% der Fälle einzuordnen, was eventuell für einen Regress der LCIS nach der Menopause spricht. Fast immer handelt es sich bei der LN um eine Zufallsdiagnose in Biopsien, die aus anderen Gründen entnommen wurden.

In dieser Arbeit soll auf die immunphänotypischen Unterschiede zwischen der Vorläuferläsion LN und der benignen proliferativen Läsion DH eingegangen werden. Außerdem wird der Immunphänotyp der LN mit dem der übrigen Vorläuferläsionen verglichen, um diagnostische Unterschiede zwischen den Vorläuferläsionen hervorzuheben.

Die neoplastischen Zellen der LN sind nach Shoker typischerweise CK8/18 positiv und CK5/14 negativ [10] und exprimieren in hohem Anteil Östrogenrezeptoren. 60-90% der LN sind ER positiv [2]. In Diagramm 3.1 werden Durchschnittswerte der vier untersuchten Fälle für CK5/6 und CK8/18, gemessen an der Gesamtzellzahl über den Mittelwert der Doppelmarkierungen mit ER und mit Ki67, dargestellt. Im Durchschnitt sind 94,1% der Zellen der LN CK8/18 positiv. Es findet sich mit durchschnittlich 2,3% ein geringer Anteil CK5/6 positiver Zellen, welcher gemessen an der Gesamtzellzahl der einzelnen Fälle zwischen 0,7% und 3,4% liegt. Bei der Auswertung wurde darauf geachtet, dass es sich bei diesen CK5/6 exprimierenden Zellen um einzeln liegende, morphologisch der LN entsprechenden, Zellen handelt. CK5/6 exprimierende Zellen, welche sich in Bereichen der LN befinden, in denen noch Acini des ursprünglichen Gewebes erkennbar sind, werden nicht ausgewertet. Trotzdem ist zu bedenken, dass es sich bei diesen CK5/6 exprimierenden Zellen um Reste des gesunden ursprünglichen Epithels handeln könnte, welche von der Läsion nicht verdrängt wurden.

Man sagt den Vorläuferläsionen, zu denen die LN gehört nach, dass sie eine hohe ER Expression und eine niedrige Proliferationsrate aufweisen. Die Expressionsrate des Proliferationsfaktors Ki67 der Zellkerne ist niedrig und liegt laut Allred nur bei 2% [3]. Diagramm 3.2 zeigt für die vier untersuchten Fälle von LN durchschnittlich eine niedrige Proliferationsrate von 1,4% und einen hohen Anteil ER positiver Zellen von 77,2%. Mit durchschnittlich 1,4% liegt die LN mit der Ki67 Expression unter der des Normalgewebes, welche im Lappchen bei durchschnittlich 4,3% und im Gang bei 3,1% liegt. Die LN grenzt sich von den anderen Vorläuferläsionen ab, da sie die niedrigste Ki67

Expression aufweist. In der ER Expression liegt die LN mit durchschnittlich 77,2% deutlich höher als das Normalgewebe mit 7,1% im Läppchen und 7,9% im Gang. Auch von der benignen proliferativen Läsion der DH welche durchschnittlich 29,5% ER positive Zellen aufweist, grenzt sich die LN mit 77,2% ab. Es wird deutlich, dass sich die LN mit 77,2% ER positiven Zellen auch von den anderen Vorläuferläsionen abhebt, welche alle über 95,0% liegen. In Bezug auf die Ausprägung der ER Expression nimmt die LN somit eine Sonderposition, zwischen der benignen proliferativen Läsion der DH einerseits und den Vorläuferläsionen FEA, ADH und dem DCIS andererseits, ein.

Diagramm 3.6 zeigt, dass von den wenigen CK5/6 exprimierenden Zellen in der LN durchschnittlich 19,2% ER positiv sind und 2,4% den Proliferationsfaktor Ki67 exprimieren. Die ER Expression der LN in den CK5/6 positiven Zellen ist mit 19,2% in dieser Zellgruppe deutlich höher als im Normalgewebe. Im Läppchen exprimieren 12,1% der CK5/6 positiven Zellen gleichzeitig den ER, im Gang sind es 6,7% und in der DH nur 4,5%. Die CK5/6 positiven Zellen der LN unterscheiden sich somit in der Höhe der ER Expression von den CK5/6 positiven Zellen des Normalgewebes, was zeigen könnte, dass es sich bei den ausgezählten einzeln liegenden CK5/6 exprimierenden Zellen der LN tatsächlich um veränderte, der Läsion zuzuordnende CK5/6 positive Zellen handeln könnte und nicht um CK5/6 positive Restzellen des Ursprunggewebes. Die Proliferationsrate der CK5/6 positiven Zellen der LN liegt mit 2,4% unter der Proliferationsrate des Normalgewebes in dieser Zellgruppe.

In Diagramm 3.5 erkennt man, dass auch die Proliferationsrate der CK8/18 exprimierenden Zellen der LN mit durchschnittlich 1,6%, äquivalent zur Proliferationsrate der LN insgesamt, niedriger liegt, als in allen anderen untersuchten Läsionen. Die ER Expression in den CK8/18 positiven Zellen der LN ist mit durchschnittlich 80,9% erwartungsgemäß gegenüber dem Normalgewebe erhöht. Auch gegenüber der benignen proliferativen Läsion der DH grenzt sich die LN deutlich ab. Während in der DH noch durchschnittlich 33,2% der CK8/18 positiven Zellen den ER exprimieren, so sind es in der LN bereits 80,9%. Doch auch in dieser Zellgruppe nimmt die LN eine Sonderstellung gegenüber den anderen Vorläuferläsionen ein. Mit 80,9% ER exprimierenden Zellen an den CK8/18 positiven Zellen weist die LN in dieser Zellgruppe um mehr als 15% niedrigere Anteile auf, als die FEA, die ADH und das DCIS.

Betrachtet man in Diagramm 3.4 die Gruppe der Ki67 positiven Zellen, welche gleichzeitig CK5/6 positiv sind, so stellt man fest, dass die LN in dieser Zellgruppe auch hier eine Sonderposition gegenüber den Vorläuferläsionen FEA, ADH, und dem DCIS einnimmt. In der LN sind noch durchschnittlich 4,4% der Ki67 exprimierenden Zellen CK5/6 positiv, im Gegensatz zu den anderen Vorläuferläsionen, die in dieser Zellgruppe alle unter 1,0% liegen. Mit 94,2% CK8/18 positiven Zellen an den Ki67 exprimierenden Zellen hebt sich die LN von dem Normalgewebe und der DH ab. Der erhöhte Anteil von CK8/18

positiven Zellen an den ER exprimierenden Zellen weist auf eine Veränderung in der Gruppe der CK8/18 positiven Zellen hin. In Diagramm 3.3 werden die Anteile der CK8/18 und CK5/6 exprimierenden Zellen an den ER positiven Zellen dargestellt. Hierbei schließt sich die LN den Vorläuferläsionen FEA, ADH und dem DCIS an und weist in der Zellgruppe der CK5/6 positiven Zellen an den ER exprimierenden Zellen Werte unter 1,0% auf. Der Unterschied zwischen der DH als benigner proliferativer Läsion und der LN als Vorläuferläsion wird in dieser Zellgruppe besonders deutlich, da in der DH noch 10,1% der ER positiven Zellen CK5/6 exprimieren und diese Zellgruppe in der LN nur noch 0,6% beträgt. In der CK8/18 Expression liegt die LN im Bereich der anderen Vorläuferläsionen und zeigt, dass im Durchschnitt 99,8% der ER positiven Zellen CK8/18 exprimieren.

In der pathologischen Diagnostik ist es oft schwierig, ein low grade DCIS, welches sich in einzelne lobuläre Acini ausgebreitet hat ohne diese zu zerstören, anhand der Architektur von einer LN zu unterscheiden, vor allem wenn die LN auch noch sekundäre Lumina aufweist. Aktuell ist die einzige Möglichkeit, die LN von einem low grade DCIS zu unterscheiden, die e-cadherin Färbung, da e-cadherin in der LN charakteristischerweise fehlt und die Zellen einzeln und ohne Zellkontakt liegen [1]. Weiterhin kann mit sm-Aktin Färbungen die begrenzende Myoepithelzellschicht dargestellt werden und somit ist es möglich, die LN von einem invasiven Karzinom zu unterscheiden.

Diese Arbeit zeigt möglicherweise weitere Mittel auf, die LN von einem lowgrade DCIS zu unterscheiden. Es zeigt sich, dass die LN mit 77,2% im Durchschnitt mindestens 20,0% weniger ER positive Zellen zeigt, als das DCIS mit 98,9%. Es wäre zu überprüfen, welche auszuwertende Zellzahl in der Diagnostik mindestens nötig wäre, um diesen Unterschied zu belegen. Ein weiterer Unterschied zwischen der LN und dem DCIS welcher deutlich wird ist die Tatsache, dass es in der LN eine kleine Gruppe von CK5/6 positiven Zellen zu geben scheint, welche eine gegenüber dem Normalgewebe und der DH eine erhöhte ER Expression zeigen und somit vermutlich als veränderte, CK5/6 exprimierende Zellen der LN anzusehen sind. Im DCIS besteht die Gruppe der CK5/6 positiven Zellen lediglich aus einzelnen Zellen, die in ihrer ER Expression aufgrund der geringen Anzahl nicht zu beurteilen sind.

Insgesamt kann man sagen, dass in der LN sowohl in den wenigen CK5/6 positiven Zellen, als auch in den CK8/18 positiven Zellen eine Veränderung stattgefunden hat, welche zu erhöhter ER Expression und erniedrigter Ki67 Expression gegenüber dem Normalgewebe und der DH führt. Weiterhin ist zu erkennen, dass die ER Expression in der LN deutlich unter der ER Expression der Vorläuferläsionen FEA, ADH und dem DCIS liegt und die LN somit eine Sonderstellung unter den Vorläuferläsionen einnimmt. Sowohl die niedrigere ER Expression, als auch die niedrige Proliferationsrate der LN gegenüber den anderen untersuchten proliferativen Vorläuferläsionen machen deutlich, dass die LN unter den Vorläuferläsionen ein möglicherweise geringeres Malignitätspotential einzunehmen scheint.

4.3.2.2 Flach epitheliale Atypie, atypische duktale Hyperplasie und duktales Carcinoma in situ im Vergleich

Die FEA ist eine Läsion der terminalen duktal lobulären Einheit, deren Acini von einer oder mehreren Lagen monomorpher atypischer Zellen umrandet sind und das Lumen des Acinus stark erweitern. FEA und ADH unterscheiden sich in ihrem intraluminalen Wachstumsmuster. Während die Tumorzellen bei der FEA in wenigen Zellschichten liegen, ersetzen die Tumorzellen der ADH die Epithelzellen und füllen das Lumen nahezu aus, wobei sie Mikropapillen, Bögen und kribriforme Baumuster bilden. Es sind nur einzelne TDLE betroffen, eine Proliferation entlang des dukталen Systems, wie sie beim DCIS zu beobachten ist, fehlt. Die ADH ist differenzialdiagnostisch schwierig von einem lowgrade DCIS abzugrenzen. Der wichtigste diagnostische Unterschied zum DCIS ist das lokale Vorkommen der ADH in kleinen, ca. 2mm großen Strukturen der terminalen duktal lobulären Einheit, im Vergleich zum segmentalen Verteilungsmuster des DCIS entlang dukталer Strukturen [1]. Isolierte Läsionen atypisch dukталer Proliferation kommen nur selten in interlobulären größeren Gängen vor und werden, sobald sie in diesen erscheinen, von Tavassoli [22] als DCIS gewertet. Morphologisch unterscheidet sich das lowgrade DCIS von der FEA und der ADH durch eine zusätzliche intraluminale Proliferation der atypischen Zellen, welche vom selben Zelltyp sind, wie bei der FEA und ADH. Die drei verschiedenen Differenzierungsgrade des DCIS sind als direkte Vorstufen des invasiven Karzinoms zu betrachten.

Immunhistochemische Färbungen zeigen, dass die atypischen Zellen der FEA, ADH und des DCIS CK8/18 positiv und CK5/14 negativ sind und somit einen rein glandulären Ursprung haben [1]. Einzelne Zellen des normalen Epithels bleiben luminal erhalten und exprimieren CK5/14. Ein mosaikartiges Verteilungsmuster der CK5/14 positiven Zellen, wie es bei benignen epithelialen Proliferationen zu erkennen ist, fehlt. Während 95% der DCIS einen ausschließlich CK8/18 positiven und CK5/14 negativen glandulären Phänotyp aufweisen, finden sich in weniger als 3% der highgrade DCIS einzelne Fälle mit einem CK5/14 positiven Immunphänotyp [1]. Diese CK5/14 exprimierenden highgrade DCIS werden in dieser Arbeit nicht ausgewertet.

Betrachtet man in Diagramm 3.1 die Expression der Zytokeratine CK5/6 und CK8/18 in FEA, ADH und DCIS, so stellt man fest, dass sich diese drei Vorläuferläsionen immunphänotypisch sehr ähnlich sind. FEA, ADH und DCIS weisen durchschnittlich über 99,0% CK8/18 exprimierende Zellen auf, während die Expression von CK5/6 unter 1,0% liegt. Hierbei handelt es sich um einzelne CK5/6 positive Zellen, welche möglicherweise dem ursprünglichen Epithel angehören.

Die Vorläuferläsionen FEA, ADH und DCIS haben gemeinsam, dass sie eine hohe nukleäre Expressionsrate des Östrogenrezeptors, sowie eine niedrige Proliferationsrate aufweisen [3]. Die Verteilung der Östrogenrezeptoren unterscheidet sich bei der ADH, der LN und dem DCIS erheblich von der

Verteilung in der DH. Nach Shoker exprimieren 96% der Zellen der ADH Östrogenrezeptoren [10]. Das Verhältnis des Alters der Patientinnen zur Anzahl der ER positiven Zellen, welches in der DH noch vorhanden war, fehlt in der ADH und ist nach Shoker als Anzeichen einer Autonomie der ER Expression oder der proliferierenden Zellen zu sehen. Nach Shoker sind im DCIS über 90% der Zellen ER positiv [10]. Es ist eine inverse Korrelation mit dem nukleären Grading zu verzeichnen. Lowgrade DCIS sind zu 80-100% ER positiv und highgrade DCIS nur zu 36-75% [23]. ER negative DCIS gehören zur Gruppe der highgrade DCIS vom Komedityp [3]. In dieser Arbeit sind nur ER positive DCIS untersucht worden.

Diagramm 3.2 zeigt die Verteilung ER positiver Zellen und Ki67 positiver Zellen in den verschiedenen Läsionen. Die benigne proliferative Läsion DH, die eine durchschnittliche ER Expression von 29,5% zeigt, grenzt sich deutlich von den Vorläuferläsionen FEA, ADH und dem DCIS ab. Die LN hingegen, welche zu den Vorläuferläsionen gerechnet wird, weist durchschnittlich 77,2% ER positiven Zellen auf und hat damit im Vergleich zu den anderen Vorläuferläsionen FEA, ADH und dem DCIS eine niedrigere ER Expression, da FEA, ADH und DCIS in ihrer durchschnittlichen ER Expression alle über 97,0% liegen.

Betrachtet man die ER Expression in den CK5/6 positiven Zellen gegenüber der ER Expression in den CK8/18 positiven Zellen, so wird deutlich, dass sich die Vorläuferläsionen LN, FEA, ADH und das DCIS immunphänotypisch unterscheiden, was auf ein unterschiedlich hohes Malignitätspotential hinweisen könnte. In der vorhergehend betrachteten Vorläuferläsion der LN handelt es sich bei der CK5/6 positiven Zellgruppe nicht um wenige einzelne Zellen wie in FEA, ADH und DCIS, es zeigt sich vielmehr, dass in der LN bei immerhin 2,3% CK5/6 positiven Zellen gemessen an der Gesamtzellzahl eine, im Vergleich zum Normalgewebe, erhöhte ER Expression in den CK5/6 positiven Zellen findet, womit diese nicht mehr als Restzellen des Ursprunggewebes, sondern vielmehr als veränderte, der LN zuzuordnende CK5/6 positive Zellen aufzufassen sein könnten. Wenn man in den Vorläuferläsionen FEA, ADH und dem DCIS die Gruppe CK5/6 positiver Zellen auf zusätzliche ER Expression untersucht, so stellt man fest, dass auch hier ein verändertes ER Expressionsmuster gegenüber dem Normalgewebe und der benignen proliferativen Läsion der DH zu finden ist. Diagramm 3.6 zeigt, dass im normalen Lappchen durchschnittlich 12,1% der CK5/6 positiven Zellen den ER exprimieren. In Gang und DH liegt dieser Anteil mit 6,7% und 4,5% noch niedriger, was den benignen Charakter der DH verdeutlicht. In der LN zeigt die Gruppe der CK5/6 positiven Zellen durchschnittlich 19,2% ER positive Zellen, was bereits auf eine veränderte ER Expression in den CK5/6 positiven Zellen hinweist. In der FEA ist der Anteil der CK5/6 positiven Zellen an der Gesamtzellzahl mit 0,3% deutlich niedriger als in der LN mit 2,3%. Man erkennt, dass der Anteil der ER positiven Zellen an den CK5/6 positiven Zellen ansteigt und in der FEA bereits bei 25,0% liegt, womit sie sich etwas von dem ER

Expressionsmuster in den CK5/6 positiven Zellen der LN abhebt. LN und FEA liegen in dieser Zellgruppe jedoch deutlich unter der ADH und dem DCIS, welche mit 0,6% und 0,1% ebenfalls sehr geringe Anteile CK5/6 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl haben, diese wenigen CK5/6 positiven Zellen jedoch ausschließlich ER positiv sind. Durch diese ER Expression in allen CK5/6 positiven Zellen zeigen die ADH und das DCIS einen maligneren Phänotyp als die LN und die FEA. Diese Werte sind nur als Tendenz zu betrachten, da sie auf wenigen Einzelzellen beruhen, die am ehesten dem ursprünglichen Epithel zuzuordnen sind.

Auch in der ER Expression der CK8/18 positiven Zellen unterscheiden sich die Vorläuferläsionen untereinander. Diagramm 3.5 zeigt, dass in der LN durchschnittlich nur 80,9% der CK8/18 positiven Zellen eine ER Expression zeigen, während diese Zellgruppe in FEA, ADH und dem DCIS durchschnittlich über 97,0% liegt. Die LN hebt sich somit von den übrigen Vorläuferläsionen ab und zeigt auch in dieser Zellgruppe einen abweichenden, weniger maligne erscheinenden Immunphänotyp.

Untersucht man in Diagramm 3.3 die Gruppe der ER positiven Zellen auf die Koexpression von CK5/6 und CK8/18, so stellt man fest, dass in allen Vorläuferläsionen über 99,0% der ER positiven Zellen CK8/18 exprimieren und unter 1,0% CK5/6 exprimieren. Der wichtigste Unterschied zu den ER positiven Zellen im Normalgewebe und in der DH ist, dass es in den Vorläuferläsionen unter den ER positiven Zellen eine sehr viel kleinere CK5/6 und CK8/18 positive Intermediärzellgruppe gibt. Wenn man in Diagramm 3.3 die Anteile der CK5/6 positiven Zellen und die Anteile der CK8/18 positiven Zellen an den ER exprimierenden Zellen addiert und die Summe betrachtet, so liegt diese im Normalgewebe und in der DH deutlich über 100,0%. Somit ergibt sich für das normale Läppchen unter den ER exprimierenden Zellen eine Intermediärzellgruppe von mindestens 7,2%, im normalen Gang von mindestens 66,9% und in der DH von mindestens 6,9%. In den Vorläuferläsionen liegt der Anteil dieser Intermediärzellgruppe bei unter 0,5%, womit man erkennen kann, dass die maligne veränderte ER Expression fast ausschließlich von den CK8/18 positiven ehemaligen Drüsenzellen ausgeht und der Anteil der CK5/6 und CK8/18 koexprimierenden Intermediärzellgruppe, sowie der Anteil der CK5/14 positiven Progenitorzellgruppe an diesen malignen Veränderungen sehr gering ist.

FEA, ADH und DCIS werden in der Literatur als Vorläuferläsionen mit niedriger Proliferationsrate beschrieben. Allred [3] beschreibt eine durchschnittliche Proliferationsrate von 5% in ADH Läsionen. Das Wachstum der ADH Läsionen scheint sowohl auf erhöhter Proliferation, als auch auf geringerem Zelltod zu beruhen [4]. Die Proliferationsrate des DCIS ist im Vergleich zu benignen proliferativen Läsionen wie der DH und auch im Vergleich zu Vorläuferläsionen wie der ADH erhöht. In DCIS findet sich eine durchschnittliche Proliferationsrate

von 15%, mit 5% in lowgrade non-comedo Läsionen und 20% in highgrade Läsionen [3].

Diagramm 3.2 zeigt die durchschnittlichen Proliferationsraten der Läsionen. Bei der durchschnittlichen Ki67 Expression von FEA, ADH und DCIS erkennt man eine Zunahme, je maligner die Vorläuferläsion einzustufen ist. Während die LN mit durchschnittlich 1,4% Ki67 positiven Zellen die niedrigste Proliferationsrate unter den Vorläuferläsionen aufweist, so liegt auch die FEA mit durchschnittlich 2,5% Ki67 exprimierenden Zellen unter der Proliferationsrate des Normalgewebes. Zwischen FEA und ADH besteht ein deutlicher Unterschied in der Höhe der Ki67 Expression. Die ADH zeigt eine Proliferationsrate von 6,5% und hebt sich damit deutlich von der Ki67 Expression der FEA mit 2,5% und der DH mit einer Proliferationsrate von 3,9% ab. ADH und DCIS liegen in der Höhe der Proliferationsrate in einem ähnlichen Bereich. Während bei der ADH 6,5% der Zellen Ki67 positiv sind, so sind es im DCIS durchschnittlich 7,9%. Es fällt auf, dass die Ki67 Expression sich zwischen den einzelnen DCIS Fällen stark unterscheidet. Sie liegt minimal bei 0,6% und maximal bei 19,8%. Das DCIS mit dem hohen Anteil Ki67 positiver Zellen von 19,8% zeigt in den Doppelmarkierungen mit dem ER keinen Unterschied in der Verteilung ER positiver Zellen gegenüber den anderen DCIS. Auch in der Größe der CK5/6 positiven Zellgruppen unterscheidet es sich nicht von den DCIS mit niedriger Ki67 Expression. Es zeigt gegenüber den anderen DCIS jedoch einen stark erhöhten Wert in der Gruppe der Ki67 und CK8/18 positiven Zellen, womit nahe liegt, dass diese CK8/18 positiven Zellen mit der erhöhten Proliferationsrate als Ursprungszellen der malignen Proliferation gelten können. Alle untersuchten DCIS sind als lowgrade Läsionen einzustufen und weisen trotzdem große Variabilitäten in der Ki67 Expression auf. Das untersuchte DCIS mit der Ki67 Expressionsrate von 19,8% liegt sogar deutlich über den 12,7% Ki67 positiven Zellen, die das tubuläre Karzinom erreicht. Es ist auffällig, dass das DCIS welches direkt benachbart zu dem untersuchten tubulären Karzinom liegt, keine erhöhten Werte für Ki67 gegenüber dem DCIS Durchschnittswert dieser Zellgruppe aufweist und mit 6,0% Ki67 positiven Zellen gemessen an der Gesamtzellzahl sowohl unter dem benachbarten tubulären Karzinom, als auch unter dem DCIS mit der hohen Proliferationsrate von 19,8% liegt.

Die Proliferationsrate in den Vorläuferläsionen LN, FEA, ADH und dem DCIS kann in Proliferation der CK5/6 positiven Zellen und in Proliferation der CK8/18 positiven Zellen unterteilt werden. Diagramm 3.6 zeigt die Anteile der Ki67 positiven Zellen an den CK5/6 positiven Zellen in den unterschiedlichen Läsionen. Für die LN zeigt sich eine Proliferationsrate von 2,4% in den CK5/6 positiven Zellen, womit sie unter dem Wert des Normalgewebes für diese Zellgruppe liegt, welche für das Lappchen 12,1% beträgt und für den Gang 2,9%. Wenn man in diesem Diagramm die Ki67 Expression in den Vorläuferläsionen FEA, ADH und dem DCIS auszählt, so ist zu bedenken, dass sie auf sehr kleinen Zellgruppen beruhen. Die 7,7% welche kursiv für das DCIS eingetragen sind beruhen beispielsweise nur auf zwei Zellen welche CK5/6 und

Ki67 positiv gefärbt sind, bei einer Gesamtzellzahl von 14691 Zellen. Die kursiv eingetragenen 9,5% der FEA beruhen auf nur drei Zellen. Diese beiden Werte sind somit nicht zu bewerten, es zeigt sich nur die Tendenz, dass in den Vorläuferläsionen von den wenigen CK5/6 exprimierenden Zellen nahezu alle Ki67 negativ sind.

Wenn man Diagramm 3.5 betrachtet fällt auf, dass die Vorläuferläsionen LN und FEA mit der Proliferationsrate in den CK8/18 positiven Zellen unter dem Wert des normalen Brustgewebes liegen. In der LN proliferieren nur 1,6% und in der FEA nur 2,3% der CK8/18 positiven Zellen. Somit sind die LN und die FEA auch in dieser Zellgruppe in ihrem malignen Potential von der ADH und dem DCIS abzugrenzen, welche mit 6,4% und 8,0% höher liegen als das normale Brustgewebe, die LN und FEA. ADH und DCIS sind demnach in ihrem Malignitätspotential höher einzustufen, als die LN und die FEA.

Auffällig ist in Diagramm 3.5 weiterhin, dass im Normalgewebe und in der DH und LN die Summe der Ki67 positiven Zellen und der ER positiven Zellen an den CK8/18 positiven Zellen unter 100,0% liegt. Während für das Normalgewebe gilt, dass Zellen welche den ER exprimieren immer Ki67 negativ sind, so könnte dieses auch für die DH und die LN gelten. In FEA, ADH und DCIS liegen die Summen der Ki67 positiven Zellen und der ER positiven Zellen jedoch über 100,0%. Bei der FEA ergibt sich nur ein geringer Anteil von mindestens 0,7% der CK8/18 positiven Zellen, welcher ER und Ki67 koexprimieren muss. Bei der ADH sind es bereits mindestens 4,3% der CK8/18 positiven Zellen, welche sowohl ER als auch Ki67 exprimieren und beim DCIS hat dieser maligne Zelltyp mindestens einen Anteil von 6,9%. Die genaue Größe dieser sowohl ER als auch Ki67 exprimierenden, CK8/18 positiven Zellgruppe wäre nur in Tripelmarkierungen zu bestimmen, allerdings ist die Tendenz erkennbar, dass, je maligner die Vorläuferläsion einzustufen ist, der Anteil der proliferierenden ER positiven Zellen zunimmt. Es ist in dieser Arbeit jedoch nicht auszuschließen, dass in der LN ebenfalls Zellen vorkommen, welche ER und Ki67 gleichzeitig exprimieren. Man kann die LN und die FEA somit in ihrem Malignitätspotential erneut von der ADH und dem DCIS abgrenzen, da die ADH und das DCIS in der Zellgruppe der CK8/18 positiven Zellen eine deutlich größere Untergruppe von proliferierenden ER positiven Zellen aufweisen.

Diagramm 3.4 zeigt den durchschnittlichen Anteil der CK5/6 und CK8/18 exprimierenden Zellen an der Gruppe der proliferierenden Zellen. Alle untersuchten Vorläuferläsionen zeigen einen hohen Anteil der CK8/18 positiven, sowie einen niedrigen Anteil an CK5/6 positiven Zellen an den proliferierenden Zellen, doch auch hier wird ersichtlich, dass die Vorläuferläsionen LN und FEA in ihrem malignen Potential unter den Vorläuferläsionen ADH und DCIS liegen. Während in den LN durchschnittlich 94,2% und in den FEA 90,7% der proliferierenden Zellen CK8/18 positiv sind, so liegt dieser Anteil in der ADH bei 98,8% und in den DCIS bei 98,6%. Man

kann daraus schließen, dass die LN und FEA weniger maligne einzustufen sind als ADH und DCIS.

Nach Iqbal [11] exprimieren die Zellen des Normalgewebes und der DH entweder den ER oder Ki67. Wenn man in Diagramm 3.2 die Gruppe der Ki67 exprimierenden Zellen und die Gruppe der ER positiven Zellen betrachtet, so fällt auf, dass die Summe dieser beiden Zellgruppen im Normalgewebe, in der DH und in der LN nicht über 100,0% liegt und es somit nicht unbedingt eine Zellgruppe geben muss, welche sowohl Ki67 als auch den ER exprimiert. In den Vorläuferläsionen FEA, ADH und dem DCIS liegt die Summe der Ki67 positiven Zellen und der ER exprimierenden Zellen jedoch über 100,0%, weshalb es in der FEA eine Zellgruppe von mindestens 0,6% gemessen an der Gesamtzellzahl geben muss, welche gleichzeitig Ki67 als auch den ER exprimiert. In der ADH hat diese Zellgruppe bereits einen Anteil von mindestens 4,2% und beim DCIS sind es mindestens 6,8%. Die genaue Größe dieser Zellgruppe kann in dieser Arbeit ohne eine Doppelmarkierung zwischen ER und Ki67 nicht bestimmt werden. Ohne diese Doppelmarkierung kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass auch in der LN eine gleichzeitige Expression von ER und Ki67 stattfindet, allerdings beträgt diese Zellgruppe in der LN, da es nur 1,4% Ki67 positive Zellen gibt, maximal nur 1,4%. LN und FEA weisen folglich einen geringeren Anteil an Zellen auf, die eine maligne Koexpression von ER und Ki67 zeigen.

Somit kann man zusammenfassend sagen, dass die Vorläuferläsionen sich in ihrer Malignität unterscheiden und die LN und FEA in verschiedenen Zellgruppen aufgrund immunphänotypischer Unterschiede gegenüber den anderen Vorläuferläsionen, in ihrer Malignität deutlich von dem höheren malignen Potential der ADH und der DCIS abzugrenzen sind.

4.4 Karzinogenese des Mammakarzinoms in Bezug zur Progenitorzelltheorie

Die traditionelle Sichtweise der Brustkrebsentstehung beschreibt, dass ausgehend von normalen epithelialen Zellen, über die DH, die ADH und das DCIS ein invasives Karzinom entsteht [7]. Keine proliferative Läsion wurde hierbei mehr als erster Schritt in der Kanzerogenese diskutiert als die DH, da sowohl die DH als auch das DCIS mit intraduktaler Proliferation einhergehen. Aktuelle Studien haben jedoch gezeigt, dass große Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung der DH und des DCIS bestehen, die den Zusammenhang dieser beiden Läsionen in Frage stellen [10], [11], [18].

Immunfluoreszenz-, biochemische- und molekulare Untersuchungsmethoden unterstützen diese Sichtweise. Die Verwendung zellulärer Marker hat entscheidende Unterschiede zwischen den beiden Läsionen aufgezeigt. Immunhistochemische Färbungen mit CK8/18 und CK5/14 ermöglichen die

Unterscheidung zwischen benignen und malignen proliferativen Läsionen. Die benignen Läsionen sind mit CK5/14 spezifischen Antikörpern zu identifizieren.

In der DH, welche nach aktuellen Studien als benigne proliferative Läsion zu betrachten ist, finden sich sowohl CK5/14 positive Progenitorzellen, als auch CK5/14 und CK8/18 positive intermediäre Zellen und Zellen mit CK8/18 positivem Immunphänotyp. Diese Arbeit hat gezeigt, dass die DH mit durchschnittlich 66,6% einen wesentlich höheren Anteil an CK5/6 exprimierenden Zellen zeigt, verglichen mit dem normalen Lappchen welches nur 8,1% CK5/6 positive Zellen hat. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die DH als Progenitorzellläsion zu betrachten ist.

Die immunhistochemischen Doppelmarkierungen in dieser Arbeit haben ergeben, dass es in der DH nicht nur einen stark erhöhten Anteil CK5/6 positiver Zellen in der DH gibt, sondern auch die Gruppe der CK5/6 und CK8/18 exprimierenden Intermediärzellen des Progenitorzellmodells in der DH gegenüber dem Normalgewebe einen deutlich größeren Anteil von 54,0% beansprucht. Diese im Vergleich zum Normalgewebe große Intermediärzellgruppe der DH ist als das Ergebnis von Wachstumsstörungen und fehlerhafter räumlicher Anordnung zu betrachten.

Durch die in dieser Arbeit verwendeten Doppelmarkierungen ergibt sich eine weitere Differenzierung der in der DH proliferierenden CK5/6 positiven Zellen. Für die DH ergibt sich im Vergleich zum Normalgewebe eine geringere ER und Ki67 Expression in den CK5/6 exprimierenden Zellen. Wenn die CK5/6 positiven Zellen der DH als Ursprungszellen der DH eine niedrige Proliferationsrate als im Normalgewebe zeigen, unterstützt das den benignen Charakter der DH als Progenitorzellläsion.

Während die Proliferationsrate in der DH sich nicht von der des Normalgewebes unterscheidet, so hat sich die Zusammensetzung der proliferierenden Zellen deutlich verändert. Im normalen Lappchen sind 11,4% der Ki67 exprimierenden Zellen CK5/6 positiv und dieser Anteil ist in der DH auf 25,1% angestiegen. Somit hat entweder der Anteil der CK5/6 und CK8/18 positiven proliferierenden Intermediärzellen in der DH verglichen mit dem Lappchen zugenommen, oder die CK5/14 positiven proliferierenden Stammzellen haben in der DH einen größeren Anteil als im normalen Lappchen. Da alle diese Zellen Stufen des normalen glandulären Differenzierungsweges sind, kann man die DH als Progenitorzellläsion bezeichnen [1]. Wenn die intraduktale epitheliale Proliferation CK5/14 negativ ist, schließt dies eine DH aus. In den Vorläuferläsionen ADH und DCIS finden sich nur CK8/18 positive proliferierende Zellen im Sinne eines glandulären Phänotyps. CK5/14 positive Zellen fehlen.

Hieraus ergibt sich die Sichtweise, dass die DH im Zelldifferenzierungsweg einen anderen zellulären Ursprung hat als die ADH und das DCIS. Die Expression von CK5/14 ist somit absolut notwendig für die Unterscheidung zwischen DH und DCIS, vor allem in frühen Formen des DCIS, wo es nur zwei bis drei Zellreihen gibt. Durch das typische CK5/14 Expressionsmuster hat die

DH morphologisch keine Ähnlichkeit mit der ADH, dem DCIS oder invasiven Karzinomen. Auf molekulare Techniken wie comparative genomische Hybridisierung und LOH Untersuchungen muss nur zurückgegriffen werden, wenn in Routine- und immunhistochemischen Färbungen kein verlässliches Ergebnis erzielt werden kann. LOH Untersuchungen zeigen, dass in der DH feine genetische Veränderungen zu verzeichnen sind, welche ungleichmäßig verteilt und nicht wiederkehrend sind, während in nichtinvasiven und invasiven Brustkrebsformen eine typische wiederkehrende genetische Imbalance entdeckt wurde [1]. Einzelne DH Läsionen weisen zwar genetische Veränderungen auf und diese sind zum Teil für die proliferativen Veränderungen verantwortlich. Dies beweist jedoch nicht, dass eine Umwandlung von benignen proliferativen Läsionen zu invasiven Karzinomen stattfindet [18].

Auch in der ER Expression unterscheidet sich die DH mit durchschnittlich 29,5% ER positiven Zellen von den Vorläuferläsionen ADH, FEA und dem DCIS, welche alle über 97,0% liegen. Die Rolle der DH als benigne proliferative Läsion wird durch die ER Expression sowohl in den CK5/6 positiven Zellen, als auch in den CK8/18 positiven Zellen verdeutlicht. Bei den CK5/6 positiven Zellen ist die ER Expression mit 4,5% niedriger als im Normalgewebe mit 12,1% im Lappchen und 6,7% im Gang und unterliegt somit möglicherweise erhaltenen Regulationsmechanismen. In den CK8/18 positiven Zellen ist die ER Expression der DH mit 33,2% weniger hoch als in den Vorläuferläsionen FEA, ADH und dem DCIS, welche in dieser Zellgruppe über 97,0% aufweisen. In den CK8/18 positiven Zellen der DH, welche entweder dem glandulären CK8/18 positiven Zelltyp, oder dem CK8/18 und CK5/6 exprimierenden Intermediärzelltyp zuzuordnen sind, steigt der Anteil der ER exprimierenden Zellen auf 33,3% an und ist somit gegenüber dem Normalgewebe deutlich erhöht. Parallel zum Anstieg der ER Expression in den CK8/18 positiven Zellen sinkt in der DH der Anteil der Ki67 exprimierenden Zellen unter den CK8/18 positiven Zellen. Dies bestätigt die Ergebnisse von Iqbal [11], welche besagen, dass in der DH der Anteil des Proliferationsfaktors Ki67 sinkt, während die ER Expression ansteigt. In den CK5/6 positiven Zellen lässt sich diese Aussage nicht bestätigen, da in den CK5/6 positiven Zellen, welche entweder dem CK5/14 positiven Stammzelltyp oder dem CK5/6 und CK8/18 positiven Intermediärzelltyp zuzuordnen sind, gegenüber dem Normalgewebe sowohl die ER als auch die Ki67 Expressionsrate sinken.

Sowohl die Unterschiede in der Zytokeratinexpression als auch die abweichende ER und Ki67 Expression bestätigen die Einordnung der DH als benigne proliferative Läsion, welche in ihren immunphänotypischen Eigenschaften klar von den Vorläuferläsionen LN, FEA, ADH und dem DCIS abzugrenzen ist. Der Hauptunterschied zwischen dem traditionellen linearen Progressionsmodell und dem modifizierten Progressionsmodell, welches auf der Progenitorzelltheorie beruht ist, dass der DH nicht mehr die Rolle einer Vorstufe des DCIS in der Kanzerogenese zugeschrieben wird [1]. Die DH wird als

Progenitorzellläsion betrachtet, welche sich in ihrem Malignitätsgrad deutlich von den Vorläuferläsionen abhebt. Sie wird als Marker für ein generell leicht erhöhtes Krebsrisiko angesehen, jedoch nicht als Vorstufe maligner Kanzerosen.

Man erkennt in dieser Arbeit, dass die untersuchten Vorläuferläsionen unterschiedliche Malignitätspotentiale besitzen. Die LN ist von den Vorläuferläsionen FEA, ADH und dem DCIS abzugrenzen, da sie sich im Zytokeratinmuster und in der ER und Ki67 Expression von ihnen unterscheidet.

Im Gegensatz zur duktalem Neoplasie, bei der die lobulären Strukturen durch intraluminale Proliferation ausgeweitet werden, bleibt die ursprüngliche Architektur des Läppchens beim lobulären Wachstumsmuster der LN erhalten.

Ein Unterschied zwischen der LN und den Vorläuferläsionen FEA, ADH und dem DCIS welcher in dieser Arbeit deutlich wird, ist die Tatsache, dass es in der LN eine kleine Gruppe von CK5/6 positiven Zellen zu geben scheint, welche gegenüber dem Normalgewebe und der DH eine erhöhte ER Expression zeigen und somit vermutlich als veränderte, CK5/6 exprimierende Zellen der LN anzusehen sind. In den anderen Vorläuferläsionen besteht die Gruppe der CK5/6 positiven Zellen aus einzelnen Zellen, die aufgrund ihrer geringen Anzahl nicht auf ER Expression und Ki67 Expression untersucht werden können und möglicherweise als Restzellen des normalen Gewebes zu werten sind.

Die LN grenzt sich von den anderen Vorläuferläsionen ab, da sie die niedrigste Ki67 Expression aufweist und sogar unter den Werten des Normalgewebes liegt. In der Gruppe der proliferierenden Zellen nimmt die LN eine Sonderstellung gegenüber den Vorläuferläsionen FEA, ADH, und dem DCIS ein. In der LN sind noch durchschnittlich 4,4% der Ki67 exprimierenden Zellen CK5/6 positiv, im Gegensatz zu den anderen Vorläuferläsionen, die in dieser Zellgruppe alle unter 1,0% liegen.

Weiterhin ist zu erkennen, dass die ER Expression in der LN deutlich unter der ER Expression der Vorläuferläsionen FEA, ADH und dem DCIS liegt und die LN somit erneut eine Sonderstellung unter den Vorläuferläsionen einnimmt. Die LN liegt mit 77,2% einerseits deutlich über der ER Expression der DH mit 29,5% als benigner proliferativer Läsion. Andererseits grenzt sich die LN mit diesem Wert von den anderen Vorläuferläsionen ab, welche alle über 95,0% liegen.

Insgesamt kann man sagen, dass in der LN sowohl in den wenigen CK5/6 positiven Zellen, als auch in den CK8/18 positiven Zellen eine Veränderung stattgefunden hat, welche zu erhöhter ER Expression und erniedrigter Ki67 Expression gegenüber dem Normalgewebe und der DH führt. Sowohl die niedrigere ER Expression, als auch die niedrigere Proliferationsrate der LN gegenüber den anderen untersuchten proliferativen Vorläuferläsionen machen deutlich, dass die LN unter den Vorläuferläsionen eine Sonderposition mit einem möglicherweise geringeren Malignitätspotential einzunehmen scheint.

Während die DH durch ihr CK5/14 Mosaik, als benigne proliferative Läsion gut von den malignen Vorläuferläsionen mit CK8/18 positivem Phänotyp zu

unterscheiden ist, ähneln sich FEA, ADH und lowgrade DCIS stark. Zwischen der FEA und dem DCIS wurden von verschiedenen Autoren zytologische, immunphänotypische und genetische Ähnlichkeiten beschrieben [20]. Es wird vermutet, dass die FEA in einigen Fällen eine neoplastische Proliferation darstellt, die entweder eine Vorstufe, oder die erste Manifestation eines DCIS oder eines tubulären Karzinoms darstellt [3]. Oft kommt die FEA gemeinsam mit ADH, einem lowgrade DCIS oder einer invasiven Brustkrebsform, besonders dem gut differenzierten tubulären Karzinom vor. Kommt die FEA assoziiert mit dem DCIS vor, so liegen sie meist nah beieinander [24]. Im klinischen Alltag sollten daher Paraffinblöcke mit FEA Läsionen genau nach Anteilen von ADH und DCIS durchsucht werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten immunhistochemischen Doppelmarkierungen haben gezeigt, dass zwischen LN und FEA einerseits und ADH und DCIS andererseits, in Bezug auf die Ausprägung von Malignitätskriterien, unterschieden werden muss. Die Vorläuferläsionen FEA, ADH und DCIS haben gemeinsam, dass die atypischen Zellen CK8/18 positiv sowie CK5/14 negativ sind und somit einen rein glandulären Ursprung haben. FEA, ADH und DCIS weisen durchschnittlich über 99,0% CK8/18 exprimierende Zellen auf, während die Expression von CK5/6 unter 1,0% liegt. Hierbei handelt es sich um einzelne CK5/6 positive Zellen, welche möglicherweise dem ursprünglichen Epithel angehören. Die durchschnittliche ER Expression in FEA, ADH und dem DCIS liegt über 97,0%. Untersucht man die ER positiven Zellen auf zusätzliche CK5/6 oder CK8/18 Expression, so stellt man fest, dass die Summe der CK5/6 und CK8/18 positiven Zellen unter den ER exprimierenden Zellen im Normalgewebe über 100,0% liegt und somit eine Intermediärzellgruppe von gleichzeitig ER, CK5/6 und CK8/18 positiven Zellen vorhanden sein muss. Diese Gruppe liegt im Läppchen bei mindestens 7,2%, im Gang mindestens bei 66,9% und in der DH bei mindestens 6,9%. In den Vorläuferläsionen liegt diese Intermediärzellgruppe unter 0,5%, womit man erkennen kann, dass die maligne veränderte ER Expression von den CK8/18 positiven ehemaligen Drüsenzellen ausgeht und der Anteil der CK5/6 und CK8/18 positiven Intermediärzellgruppe, sowie der Anteil der CK5/14 positiven Progenitorzellgruppe an diesen malignen Veränderungen, sehr gering ist.

An der durchschnittlichen Ki67 Expression von FEA, ADH und DCIS wird deutlich, dass die Vorläuferläsionen unterschiedliche Malignitätspotentiale zu besitzen scheinen. Man erkennt eine Zunahme der Proliferationsrate, je maligner die Vorläuferläsion einzustufen ist. Die LN liegt in ihrer Proliferationsrate noch unter dem Normalgewebe und erscheint somit weniger maligne. Auch zwischen FEA und ADH besteht ein deutlicher Unterschied in der Höhe der Ki67 Expression. Die ADH zeigt eine Proliferationsrate von 6,5% und hebt sich damit deutlich von der Ki67 Expression der FEA mit 2,5% ab. ADH und DCIS liegen in der Höhe der Proliferationsrate in einem ähnlichen Bereich. Während bei der ADH 6,5% der Zellen Ki67 positiv sind, so sind es im

DCIS durchschnittlich 7,9%. ADH und DCIS sind demnach in ihrem Malignitätspotential höher einzustufen, als die LN und die FEA.

Ein weiteres Malignitätskriterium ist die Koexpression von ER und Ki67 in den CK8/18 positiven Zellen [11]. Addiert man im Normalgewebe, in der DH und in der LN die Ki67 positiven Zellen und die ER positiven Zellen an den CK8/18 positiven Zellen, so liegt die Summe unter 100,0%. Während nach Iqbal [11] für das Normalgewebe und die DH gilt, dass Zellen welche den ER exprimieren immer Ki67 negativ sind, so könnte dieses auch für die DH und die LN gelten. In FEA, ADH und DCIS liegen die Summen der Ki67 exprimierenden Zellen und der ER exprimierenden Zellen an den CK8/18 positiven Zellen jedoch über 100,0%. Bei der FEA ergibt sich nur ein geringer Anteil von mindestens 0,7% der CK8/18 positiven Zellen, welcher ER und Ki67 exprimieren muss. Bei der ADH sind es bereits mindestens 4,3% der CK8/18 positiven Zellen, welche sowohl ER als auch Ki67 exprimieren und beim DCIS hat dieser maligne Zelltyp mindestens einen Anteil von 6,9%. Die genaue Größe dieser sowohl ER als auch Ki67 exprimierenden, CK8/18 positiven Zellgruppe wäre nur in Tripelmarkierungen zu bestimmen, allerdings ist die Tendenz erkennbar, dass, je maligner die Vorläuferläsion einzustufen ist, der Anteil der proliferierenden ER positiven Zellen zunimmt. Gemessen an der Koexpression von ER und Ki67 zeigen ADH und DCIS somit einen deutlich maligneren Phänotyp als LN und FEA.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Vorläuferläsionen sich in ihrer Malignität unterscheiden und die LN und FEA in verschiedenen Zellgruppen aufgrund immunphänotypischer Unterschiede in ihrer Malignität deutlich von dem höheren malignen Potential der ADH und des DCIS abzugrenzen sind.

Dieses maligne Potential der ADH wird in anderen Studien bestätigt. Es gibt Hinweise, dass das Auftreten von ADH mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko in beliebigen Abschnitten beider Brüste einhergeht [25]. Das Brustkrebsrisiko steigt mit dem Auftreten von ADH sowohl für duktales als auch für lobuläres Karzinome, was auch auf eine generelle genetische Instabilität von Patientinnen mit ADH zurückzuführen ist.

Möglicherweise stellt die ADH eine Zwischenstufe dar, mit der FEA einerseits und dem lowgrade DCIS andererseits. Zytologisch und molekular betrachtet gibt es zwischen FEA und ADH keine Unterschiede. Auch die genetischen Veränderungen der FEA und der ADH sind identisch [26]. Während bei der FEA die proliferierenden Zellen in zwei bis fünf Zelllagen angeordnet sind, so proliferieren sie bei der ADH in brückenbildenden cribriformen Zellformationen. Dieses fortgeschrittene Muster intraluminalen Wachstums ist als qualitative Veränderung des proliferativen Prozesses zu werten [26]. Diese qualitative Veränderung des proliferativen Prozesses zeigt sich in den Doppelmarkierungen dieser Arbeit durch die ansteigende Ki67 Expression von FEA über ADH zum DCIS. Auch die maligne Koexpression von ER und Ki67 nimmt von FEA über ADH zum DCIS hin zu.

Die FEA und ADH zeigen eine ähnliche zelluläre Morphologie und Architektur wie das low grade DCIS und besitzen den gleichen Immunphänotyp. Die FEA und die ADH zeigen wiederkehrende genetische Veränderungen an bestimmten Stellen, welche auch im DCIS und im tubulären Karzinom zu finden sind [26]. Möglicherweise sind FEA und ADH Stufen entlang des low grade Entwicklungsweges, welche sich über ein low grade DCIS in ein tubuläres, duktales oder lobuläres Karzinom weiterentwickeln. Daher sollten Schnitte und Blöcke, in denen FEA Läsionen gefunden werden, genau auf parallel vorhandene DCIS oder tubuläre Karzinome durchsucht werden.

Das traditionelle Modell zur Karzinogenese des Mammakarzinoms beschreibt eine fortschreitende Malignitätsentwicklung intraduktaler epithelialer proliferativer Läsionen. Dieses Modell geht von einer linearen Progression, ausgehend von lowgrade Läsionen, resultierend in highgrade Läsionen, aus. Basierend auf der Abgrenzung zu benignen proliferativen Läsionen wird nach aktueller Studienlage ein anderes Modell der Karzinogenese für wahrscheinlicher gehalten, welches nicht auf linearer Progression, sondern vielmehr auf verschiedenen Wegen der Malignitätsentwicklung, ausgehend von unterschiedlichen Zellstufen des Progenitorzellmodells und den unterschiedlichen Differenzierungsgraden der DCIS und seinen invasiven Folgeläsionen, beruht. Wenn man den Prozess der malignen Tumorgenese in zwei Phasen einteilt [1], so ist die erste Phase als nicht invasive Phase zu betrachten, während der ein Wachstum der epithelialen neoplastischen Zellen in den Grenzen der duktal lobulären Einheiten stattfindet. Die Vorläuferläsionen FEA, ADH und das DCIS sind in dieser Phase einzuordnen. Die folgende zweite Phase der Tumorgenese ist die invasive Phase, in der das normale Brustgewebe von Tumorzellen zerstört wird. Hierbei entwickeln sich aus den vorbestehenden Vorläuferläsionen invasive Karzinome.

Die drei verschiedenen Differenzierungsgrade des DCIS sind als direkte Vorstufen des invasiven Karzinoms zu betrachten. Während 95% der DCIS einen ausschließlich CK8/18 positiven und CK5/14 negativen glandulären Phänotyp aufweisen, finden sich in weniger als 3% der highgrade DCIS einzelne Fälle mit einem CK5/14 positiven Immunphänotyp, was darauf hinweisen könnte, dass sie entsprechend dem Progenitorzellmodell aus einer intermediären glandulären Zelle, während einer früheren Stufe des Zelldifferenzierungsprozesses der glandulären Zelllinie, entstehen [1]. Lowgrade und highgrade DCIS zeigen unterschiedliche genetische Veränderungen und entwickeln sich auch zu unterschiedlichen Graden der invasiven Karzinome [9]. 30-50% aller DCIS entwickeln sich über einen unbekanntem Mechanismus zu invasiven Karzinomen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass DCIS und mit ihnen assoziiert vorkommende invasive Karzinome sowohl die gleichen Tumormarker, den gleichen Differenzierungsgrad, als auch starke Ähnlichkeiten in genetischen Veränderungen aufweisen [27], [28].

Mit dem Progenitorzellmodell lassen sich auch die Brustkarzinome analog zu den DCIS in zwei Gruppen einteilen. Über 90% der invasiven Karzinome zeigen einen ausschließlich glandulären Phänotyp mit CK8/18 positiven und CK5/14 negativen Zellen, den bereits frühe epitheliale maligne Veränderungen, wie FEA und ADH zeigen. Dieser Karzinomtyp entsteht auf dem Zelldifferenzierungsweg des Progenitorzellmodells aus der reifen glandulären Zelle und ist den lowgrade Läsionen zuzuordnen. Die CK8/18 positiven und ER negativen Zellen des Epithels der weiblichen Brust zeigen die höchste Proliferationsrate und sind als mitotisch aktivste Zellen des Brustgewebes als häufiger Ausgangspunkt für die Tumorgenese zu betrachten.

Eine weitere Gruppe bilden weniger als 10% der invasiven Karzinome. Sie exprimieren CK5/14 und CK8/18, sind aber ER negativ. Sie gehören zu den highgrade Karzinomen [1]. Laut Progenitorzellmodell finden sie ihren Ursprung aus einer intermediären glandulären Zelle, einer früheren Stufe des Zelldifferenzierungsprozesses der glandulären Zelllinie [1].

Seltene Progenitorzellkarzinome mit CK5/14 Expression zeigen, dass im Verlauf der Zelldifferenzierung zur reifen glandulären Epithelzelle, auch auf der Stufe der CK5/14 positiven und ER negativen Stammzelle ein Ausgangspunkt für die Karzinogenese liegen kann. Eine kleine Gruppe von 0,8% der invasiven Karzinome zeigt diese CK5/14 Expression [1]. Diese reinen Progenitorzellkarzinome sind den duktalem highgrade Karzinomen Grad 3 mit zentraler Nekrose zuzuordnen.

Das in dieser Arbeit orientierend ausgewertete tubuläre Karzinom unterscheidet sich, von dem im Schnitt direkt benachbarten low grade DCIS, welches optisch in das tubuläre Karzinom überzugehen scheint, durch verschiedene deutliche Veränderungen. Am tubulären Karzinom sind, gegenüber dem direkt benachbarten DCIS, keine CK5/6 positiven Zellen mehr nachweisbar. Die Expression von Ki67 ist nahezu doppelt so hoch wie im benachbarten DCIS und auch die Koexpression von ER und Ki67 ist größer als im direkt benachbarten DCIS.

Studien mit der comparativen genomischen Hybridisierung haben gezeigt, dass starke Ähnlichkeiten in den genetischen Veränderungen von DCIS und invasiven duktalem Karzinomen bestehen, welche einen kausalen Zusammenhang zwischen diesen Läsionen nahe legen [3]. So zeigen lowgrade DCIS ähnliche genetische Veränderungen wie G1 tubuläre/ duktalem Karzinome. Das intermediate DCIS entspricht in seinen genetischen Veränderungen ungefähr dem G2 und G3 invasiven Karzinom. Es liegt somit nahe, dass die DCIS eine heterogene Gruppe von Erkrankungen unterschiedlicher zellulärer Herkunft und mit unterschiedlichen Entwicklungswegen sind. Ein Fortschreiten von einem low grade DCIS über ein high grade DCIS, sowie vom hoch differenzierten invasiven Karzinom bis hin zu einem niedrig differenzierten invasiven Karzinom ist unwahrscheinlich. Die derzeitige Studienlage lässt vermuten, dass das hoch differenzierte invasive Karzinom aus einem low grade DCIS entsteht, wohingegen das niedrig differenzierte invasive Karzinom seinen

Ursprung in dem high grade DCIS findet [1]. Marker, welche den Schritt vom nichtinvasiven zum invasiven Karzinom charakterisieren, sind bis heute nicht identifiziert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die verschiedenen Differenzierungsgrade der Tumorzellen den Stufen des Zelldifferenzierungsweges entsprechen, von denen aus die Tumorgenese ihren Ursprung fand. Daher gleichen die proliferierenden Tumorzellen immunphänotypisch den Zellgruppen, die zu anderen Anteilen auch im normalen reifen Brustepithel zu finden sind. Dieses Modell der Tumorgenese besagt, dass jede Zelle des glandulären Zelldifferenzierungsweges als Ursprungszelle für den Beginn der malignen Proliferation gelten kann. Ziel dieser Theorie ist, verschiedene Entstehungswege in Abhängigkeit ihrer Ursprungszelle zu formulieren und linienspezifische Tumore zu klassifizieren, welche unterschiedliche Malignitätspotentiale besitzen. Wäre man in der Lage, den Regulationsmechanismus, der Wachstum und Zelldifferenzierung zugrunde liegt zu verstehen, könnte man mit Chemotherapie bereits auf frühen Stufen der Zellveränderung in diesen Mechanismus eingreifen.

Für den klinischen Alltag und die individuelle Prognose ist es am bedeutsamsten, zwischen lokalem Tumorwachstum in der terminalen duktal lobulären Einheit und der Ausbreitung in das Gangsystem, sowie dem Malignitätsgrad der Läsion zu unterscheiden. Wichtig ist die Unterscheidung benigner proliferativer Läsionen wie der DH von den Vorläuferläsionen LN, FEA, ADH und dem DCIS, da sie, wie in dieser Arbeit aufgeführt, unterschiedliche Malignitätspotentiale besitzen und somit verschiedene Behandlungskonzepte erfordern. Die Immunhistochemie ermöglicht in vielen Fällen die eindeutige Unterscheidung früher proliferativer Läsionen von in situ Läsionen und hilft im klinisch pathologischen Alltag Entscheidungen zu überprüfen, wenn die routinemäßige Histologie zu keiner eindeutigen Diagnose führt.

Die in dieser Arbeit verwendeten immunhistochemischen Doppelmarkierungen haben die Verteilungen der verschiedenen Immunphänotypen in den untersuchten Läsionen verdeutlicht. Durch Auswertung der Koexpression von ER und Ki67, oder durch die ermittelte Höhe der Proliferationsrate in den CK8/18 positiven Zellen, ergeben sich Malignitätskriterien, die die Einteilung der Läsionen ermöglichen. Zusätzlich geben die Anteile der Zytokeratine CK5/6 und CK8/18 einen funktionellen Einblick, aus welcher Ursprungszelle des Progenitorzellmodells die Läsion entstanden sein könnte.

Das Modell der Progenitorzelltheorie kann in der physiologischen Brustdrüsenentwicklung und als Grundlage für ein Progressionsmodell benigner und maligner proliferativer Läsionen als weiterer Schritt auf dem Weg zum Verständnis zellulärer Regulationsmechanismen angesehen werden.

Die Visualisation zellulärer Untergruppen in den einzelnen Läsionen zeigt ihre Hierarchie und Funktion im normalen Brustgewebe und in verschiedenen

benignen und malignen Läsionen, woraus möglicherweise neue therapeutische Konzepte entwickelt werden können.

5 Zusammenfassung

Im klinischen Alltag ist es für die individuelle Prognose bedeutsam, zwischen den verschiedenen proliferativen Läsionen der weiblichen Brust zu unterscheiden. Benigne proliferative Läsionen wie die DH besitzen ein anderes Malignitätspotential als die Vorläuferläsionen LN, FEA, ADH und DCIS, wodurch sich verschiedene Behandlungskonzepte ergeben. Die Immunhistochemie ermöglicht in vielen Fällen die eindeutige Unterscheidung früher proliferativer Läsionen von in situ Läsionen und hilft im klinisch pathologischen Alltag Entscheidungen zu überprüfen, wenn die routinemäßige Histologie zu keiner eindeutigen Diagnose führt.

Die in dieser Arbeit verwendeten immunhistochemischen Doppelmarkierungen verdeutlichen die verschiedenen Immunphänotypen in den untersuchten Läsionen. Während die Verteilung der Zytokeratine CK5/6 und CK8/18 einen funktionellen Einblick gibt, aus welcher Ursprungszelle des Progenitorzellmodells die Läsion entstanden ist, so zeigen die Auswertung der Koexpression von ER und Ki67, oder die ermittelte Höhe der Proliferationsrate in den CK8/18 positiven Zellen, Malignitätskriterien auf, die die Einteilung der Läsionen ermöglichen.

Das traditionelle Modell zur Karzinogenese des Mammakarzinoms beschreibt eine fortschreitende Malignitätsentwicklung intraduktaler epithelialer proliferativer Läsionen. Dieses Modell geht von einer linearen Progression, ausgehend von low grade Läsionen, resultierend in high grade Läsionen, aus. Basierend auf der Abgrenzung zu benignen proliferativen Läsionen wird nach aktueller Studienlage ein anderes Modell der Karzinogenese für wahrscheinlicher gehalten, welches nicht auf linearer Progression, sondern vielmehr auf verschiedenen Wegen der Malignitätsentwicklung, ausgehend von unterschiedlichen Zelltypen des Progenitorzellmodells und den unterschiedlichen Differenzierungsgraden der DCIS und seinen invasiven Folgeläsionen, beruht. Das Progenitorzellmodell geht von einer CK5/14 positiven Progenitorzelle aus, welche sich über eine CK5/14 und CK8/18 positive Intermediärzelle zu einer CK8/18 positiven glandulären Zelle differenziert. Die immunhistochemischen Färbungen mit CK8/18 und CK5/14 ermöglichen die Zuordnung der proliferierenden Zellen zu einem dieser Immunphänotypen, wodurch eine Unterscheidung zwischen benignen und malignen proliferativen Läsionen möglich wird. Man grenzt die benignen proliferativen Läsionen wie die DH einerseits, von den Vorläuferläsionen LN, FEA, ADH und DCIS andererseits ab, welche als direkte Krebsvorstufen gelten. Die DH wird als Progenitorzellläsion betrachtet, da sie einen erhöhten Anteil CK5/14 positiver Progenitorzellen zeigt und alle Zellen des normalen Zelldifferenzierungsweges aufweist. Der Anteil der CK5/6 positiven Zellen ist in der DH mit 66,6% gegenüber 43,6% im Gang und 8,1% im Läppchen erhöht. Somit hat entweder der Anteil der CK5/6 und CK8/18 positiven

Intermediärzellen in der DH verglichen mit dem Läppchen zugenommen, oder die CK5/14 positiven proliferierenden Stammzellen haben in der DH einen größeren Anteil als im Normalgewebe. Aufgrund dieser erhöhten Anzahl CK5/6 positiver Zellen wird die DH als Progenitorzellläsion bezeichnet, welche einen anderen zellulären Ursprung hat als die CK8/18 positiven Vorläuferläsionen FEA, ADH und DCIS, welche aus dem glandulären Zelltyp des Progenitorzellmodells entstehen [1].

Die Summe der CK5/6 positiven Zellen und der CK8/18 positiven Zellen führt in der DH zu einer deutlich angestiegenen Intermediärzellgruppe von mindestens 54,0%, gegenüber mindestens 36,7% im Gang und höchstens 8,1% im Läppchen. Durch diese große Intermediärzellgruppe hebt sich die DH deutlich von den Vorläuferläsionen ab, denn in der LN ist sie maximal 2,3% groß und in FEA, ADH und DCIS beträgt sie wie im tubulären Karzinom höchstens 0,6%. In diesen Vorläuferläsionen liegt jedoch der Anteil der CK8/18 exprimierenden Zellen, bei Ausnahme der LN mit 94,1%, bei über 99,0%. Hieraus ergibt sich die Sichtweise, dass die DH im Zelldifferenzierungsweg einen anderen zellulären Ursprung hat als die LN, FEA, ADH und das DCIS.

Auch in der ER Expression unterscheidet sich die DH mit durchschnittlich 29,5% ER positiven Zellen von den Vorläuferläsionen ADH, FEA und DCIS, welche alle über 97,0% liegen. Parallel zum Anstieg der ER Expression in den CK8/18 positiven Zellen sinkt in der DH der Anteil der Ki67 exprimierenden Zellen unter den CK8/18 positiven Zellen, was die Studien von Iqbal [11] bestätigt, die gezeigt haben, dass in der DH parallel zum Anstieg der ER Expression die Ki67 Expression abfällt. In den CK5/6 positiven Zellen sinkt gegenüber dem Normalgewebe sowohl die ER als auch die Ki67 Expressionsrate.

Sowohl die Unterschiede in der Zytokeratinexpression als auch die abweichende ER und Ki67 Expression bestätigen die Einordnung der DH als benigne proliferative Läsion, welche in ihren immunphänotypischen Eigenschaften klar von den Vorläuferläsionen LN, FEA, ADH und dem DCIS abzugrenzen ist.

Man erkennt in dieser Arbeit, dass auch die untersuchten Vorläuferläsionen unterschiedliche Malignitätspotentiale besitzen. Die LN ist von den Vorläuferläsionen FEA, ADH und dem DCIS abzugrenzen, da sie sich im Zytokeratinmuster und in der ER und Ki67 Expression von ihnen unterscheidet. Die LN weist unter den Vorläuferläsionen die niedrigste Ki67 Expression auf und liegt sogar unter den Werten des Normalgewebes. Mit 77,2% ER positiven Zellen liegt die LN einerseits deutlich über der ER Expression der DH mit 29,5% als benigner proliferativer Läsion. Andererseits grenzt sich die LN mit diesem Wert von den anderen Vorläuferläsionen ab, welche alle über 95,0% liegen. Ein weiterer Unterschied zwischen der LN und den Vorläuferläsionen FEA, ADH und dem DCIS welcher in dieser Arbeit deutlich wird, ist die Tatsache, dass es in der LN eine kleine Gruppe von CK5/6 positiven Zellen zu geben scheint, welche gegenüber dem Normalgewebe und der DH eine erhöhte ER

Expression zeigen und somit vermutlich als veränderte, CK5/6 exprimierende Zellen der LN anzusehen sind, welche aufgrund ihrer veränderten ER Expression möglicherweise nicht zum ursprünglichen Gewebe gehören.

Insgesamt kann man sagen, dass in der LN sowohl in den wenigen CK5/6 positiven Zellen, als auch in den CK8/18 positiven Zellen eine Veränderung stattgefunden hat, welche zu erhöhter ER Expression und erniedrigter Ki67 Expression gegenüber dem Normalgewebe und der DH führt. Sowohl die niedrigere ER Expression, als auch die niedrige Proliferationsrate der LN gegenüber den anderen untersuchten proliferativen Vorläuferläsionen machen deutlich, dass die LN unter den Vorläuferläsionen eine Sonderposition, mit einem möglicherweise geringeren Malignitätspotential, einzunehmen scheint.

Die Vorläuferläsionen FEA und ADH zeigen eine ähnliche zelluläre Morphologie und Architektur wie das lowgrade DCIS und besitzen den gleichen Immunphänotyp. FEA und ADH zeigen wiederkehrende genetische Veränderungen an bestimmten Stellen, welche auch im DCIS und im tubulären Karzinom zu finden sind [26]. Die in dieser Arbeit ausgewerteten immunhistochemischen Doppelmarkierungen haben gezeigt, dass zwischen LN und FEA einerseits und ADH und DCIS andererseits, in Bezug auf die Ausprägung von Malignitätskriterien, unterschieden werden muss.

Als erstes Malignitätskriterium kann die Zunahme der Proliferationsrate, je maligner die Vorläuferläsion einzustufen ist, gelten. Die LN liegt in ihrer Proliferationsrate noch unter dem Normalgewebe und erscheint somit wenig maligne. Die FEA zeigt eine Proliferationsrate von 2,5% und grenzt sich damit ebenfalls von der Ki67 Expression der ADH ab. ADH und DCIS liegen mit Proliferationsraten von 6,5% und 7,9% in einem höheren Bereich als LN und FEA und sind demnach in ihrem Malignitätspotential über der LN und FEA einzustufen.

Ein weiteres Malignitätskriterium ist die Koexpression von ER und Ki67 in den CK8/18 positiven Zellen [11]. Addiert man im Normalgewebe, in der DH und in der LN die Ki67 exprimierenden Zellen und die ER exprimierenden Zellen an den CK8/18 positiven Zellen, so liegt die Summe unter 100,0%. Während nach Iqbal [11] für die DH gilt, dass Zellen welche den ER exprimieren immer Ki67 negativ sind, so könnte dieses auch für die LN gelten. Bei der FEA ergibt sich bereits ein geringer Anteil von mindestens 0,7% der CK8/18 positiven Zellen, welcher eine Koexpression von ER und Ki67 zeigen muss. Bei der ADH sind es bereits mindestens 4,3% der CK8/18 positiven Zellen, welche sowohl ER als auch Ki67 exprimieren und beim DCIS hat dieser maligne einzustufende Zelltyp mindestens einen Anteil von 6,9%. Die genaue Größe dieser sowohl ER als auch Ki67 exprimierenden, CK8/18 positiven Zellgruppe wäre nur in Tripelmarkierungen zu bestimmen, allerdings ist die Tendenz erkennbar, dass, je maligner die Vorläuferläsion einzustufen ist, der Anteil der proliferierenden ER positiven Zellen zunimmt. Gemessen an der Koexpression von ER und Ki67

zeigen ADH und DCIS somit erneut einen deutlich maligneren Phänotyp als LN und FEA.

Als Malignitätskriterium kann auch der Immunphänotyp der ER positiven Zellen betrachtet werden, welcher durch die unterschiedliche Koexpression von CK5/6 und CK8/18 erkennen lässt, aus welchem Abschnitt des Zelldifferenzierungsweges des Progenitorzellmodells die Läsion hervorgeht.

Untersucht man die Summe der CK5/6 und CK8/18 positiven Zellen unter den ER exprimierenden Zellen im Normalgewebe, so liegt sie über 100,0%. Somit gibt es eine Intermediärzellgruppe von gleichzeitig ER, CK5/6 und CK8/18 positiven Zellen. Diese Gruppe liegt im Läppchen bei mindestens 7,2%, im Gang mindestens bei 66,9% und in der benignen proliferativen Läsion der DH bei mindestens 6,9%. In den Vorläuferläsionen hat diese Intermediärzellgruppe nur einen Anteil von unter 0,5%, womit man erkennen kann, dass die maligne veränderte ER Expression von den CK8/18 positiven Drüsenzellen ausgeht und der Anteil der CK5/6 und CK8/18 positiven Intermediärzellgruppe, sowie der Anteil der CK5/14 positiven Progenitorzellgruppe an diesen malignen Veränderungen gering ist.

Aufgrund des genetisch [26] und morphologisch gleichen proliferierenden Zelltyps in FEA, ADH und dem lowgrade DCIS, sowie aufgrund der von FEA über ADH zum DCIS hin ansteigenden Malignitätskriterien, kann man zu der Ansicht kommen, dass die ADH möglicherweise eine Zwischenstufe, mit der FEA einerseits und dem low grade DCIS andererseits, darstellt. Die FEA kommt oft gemeinsam mit ADH, einem lowgrade DCIS oder einer invasiven Brustkrebsform, besonders dem gut differenzierten tubulären Karzinom vor. Möglicherweise sind FEA und ADH Stufen entlang des lowgrade Entwicklungsweges, welche sich über ein lowgrade DCIS in ein tubuläres, duktales oder lobuläres Karzinom weiterentwickeln.

Dieser potentielle Übergang eines lowgrade DCIS in ein tubuläres Karzinom ist möglicherweise in dieser Arbeit zu beobachten, da das in dieser Arbeit orientierend ausgewertete tubuläre Karzinom im Schnitt direkt benachbart zu einem lowgrade DCIS liegt, welches optisch in das tubuläre Karzinom überzugehen scheint. Zwischen dem DCIS und dem benachbarten tubulären Karzinom sind deutliche Unterschiede durch eine Zunahme der formulierten Malignitätskriterien erkennbar. Am tubulären Karzinom sind gegenüber dem DCIS keine CK5/6 positiven Zellen mehr nachweisbar. Die Expression von Ki67 ist nahezu doppelt so hoch und auch die Koexpression von ER und Ki67 ist größer als im direkt benachbarten DCIS.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die verschiedenen Immunphänotypen der Tumorzellen in den untersuchten Läsionen den Stufen des Zelldifferenzierungsweges entsprechen, von denen aus die Tumorgenese ihren Ursprung fand. Daher gleichen die proliferierenden Tumorzellen immunphänotypisch den Zellgruppen, die zu anderen Anteilen auch im normalen reifen Brustepithel zu finden sind. Dieses Modell der Tumorgenese

besagt, dass jede Zelle des glandulären Zelldifferenzierungsweges als Ursprungszelle für den Beginn der malignen Proliferation gelten kann [1]. Ziel dieser Theorie ist es, verschiedene Entstehungswege in Abhängigkeit ihrer Ursprungszelle zu formulieren und linienspezifische Tumore zu klassifizieren, welche unterschiedliche Malignitätspotentiale besitzen.

Die Möglichkeiten der verwendeten Immunhistochemie sollen in der pathologischen Diagnostik die Abgrenzung der benignen proliferativen Läsionen gegenüber den malignen Vorläuferläsionen erleichtern. Auch die ermittelten unterschiedlichen Malignitätspotentiale der Vorläuferläsionen sind im klinischen Behandlungskonzept zu bedenken.

6 Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADH	Atypische duktale Hyperplasie
AK	Antikörper
ALH	Atypische lobuläre Hyperplasie
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
CK	Zytokeratin
DAB	Diaminbenzidin
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DH	Duktale Hyperplasie
ER	Östrogenrezeptor
FEA	Flach epitheliale Atypie
G1 - G3	Grad 1-3 der Karzinomdifferenzierung
HRP	Horseradish Peroxidase
Ki67	Proliferationsfaktor
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
LN	Lobuläre Neoplasie
LOH	Loss of heterozygosity
LSAB	Labelled Streptavidin Biotin
S.	Seite
Sm-Aktin	smooth-muscle-actin
Substrat RED	Fuchsin
Tab.	Tabelle
TBS	Trisbuffersalin
TDLE	terminale duktal lobuläre Einheit
TRS-Puffer	Target Retrieval Solution
Tub CA	Tubuläres Karzinom
WHO	World Health Organisation

7 Literaturverzeichnis

- [1] Boecker W, *Preneoplasia of the Breast*. Saunders, München 2006.
- [2] Tavassoli FA, Hoefler H, Rosai J et al., *World health Organisation classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. IARC, Lyon 2003.
- [3] Allred DC et al., *Histological and biological evolution of human premalignant breast disease*. *Endocrine-Related Cancer* (2001) 8; 47-61.
- [4] Prosser J et al., *Cell turnover (proliferation and apoptosis) in normal epithelium and premalignant lesions in the same breast*. *Laboratory Investigation* (1997) 76; 24A, Abstract No. 119.
- [5] Russo J et al., *Development of the human breast*. *Maturitas* (2004) 49; 2-15.
- [6] Lebeau A, *Prognostische Faktoren beim duktalem Carcinoma in situ*. *Der Pathologe* (2006) 5; 326-36.
- [7] Lakhani SR, *The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast*. *Journal of Pathology* (1999) 187; 272-278.
- [8] Elston CW, Ellis IO, *Systemic pathology*. Churchill Livingstone, London 1998.
- [9] Boecker W, Buerger H, *Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept*. *Cell Prolif.* (2003) 36 (Suppl. 1), 73-84.
- [10] Shoker BS et al., *Oestrogen receptor expression in the normal and pre-cancerous breast*. *Journal of Pathology* (1999) 188; 237-244.
- [11] Iqbal M et al., *Subgroups of non-atypical hyperplasia of breast defined by proliferation of oestrogen receptor-positive cells*. *Journal of Pathology* (2001) 193; 333-338.
- [12] Rickets D, et al., *Oestrogen and progesterone receptors in the normal female breast*. *Cancer Research* (1991) 51; 1817-1822.

- [13] Clarke RB et al., *Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast*. *Cancer Research* (1997) 57; 4987-4991.
- [14] Dontu G et al., *Stem cells in normal breast development and breast cancer*. *Cell Prolif.* (2003) 36 (Suppl.1), 59-72.
- [15] Potten CS et al., *The effect of age and menstrual cycle upon proliferative activity of the normal human breast*. *British Journal of Cancer* (1988) 58; 163-170.
- [16] Clarke RB et al., *Regulation of human breast epithelial stem cells*. *Cell Prolif.* (2003) 36 (Suppl. 1), 45-58.
- [17] Bankfalvi A et al., *Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in benign proliferative and early malignant breast diseases*. *Mod Pathol* (2004) 17; 1051-1061.
- [18] Bürger H et al., *Bedeutung des "Normalgewebes" in der Brustkrebsentstehung*. *Pathologe* (2006) 27; 319-325.
- [19] Azzopardi JG, *Problems in Breast Pathology*. Saunders, London 1979.
- [20] O'Connell P et al., *Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci*. *Journal of the National Cancer Institute* (1998) 90; 697-703.
- [21] Sinn HP et al., *Konzept und Problematik der lobulären Neoplasie*. *Pathologe* (2006) 26; 373-380.
- [22] Tavassoli FA et al., *A Comparison of the Results of Long-Term Follow-Up for Atypical Intraductal Hyperplasia und Intraductal Hyperplasia of the Breast*. *Cancer* (1990) 65; 518-529.
- [23] Lebeau A et al., *EG-FR, HER-2/neu, cyclin D1, p21 and p53 in correlation to cell proliferation and steroid hormone receptor status in ductal carcinoma in situ of the breast*. *Breast Cancer Res Treat* (2003) 79; 187-198.
- [24] Oyama T et al., *Atypical cystic lobule of the breast: an early stage of low grade ductal carcinoma in-situ*. *Breast Cancer* (2000) 7; 326-331.

- [25] Page DL et al., *Continued local recurrence of carcinoma 15-25 years after a diagnosis of low grade ductal carcinoma in-situ of the breast treated only by biopsy.* Cancer (1995) 76; 1197-1200.
- [26] Moinfar F et al., *Genetic abnormalities in mammary ductal intraepithelial neoplasia flat-type ("clinging ductal carcinoma in-situ"): a simulator of normal mammary epithelium.* Cancer (2000) 88; 2072-2082.
- [27] Bijker N et al., *Histological type and marker expression of the primary tumour compared with its local recurrence after breast-conserving therapy for ductal carcinoma in-situ.* British Journal of Cancer (2001) 84; 539-544.
- [28] Goldstein NS et al., *Intraductal carcinoma associated with invasive carcinoma of the breast. A comparison of the two lesions with implications for intraductal carcinoma classification systems.* American Journal of Clinical Pathology (1996) 106; 312-318.

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1.1, (S. 15):	Ermittelte Immunphänotypen in den durchgeführten Doppelmarkierungen
Tab. 2.1.2, (S. 16):	Anzahl der ausgewerteten Doppelmarkierungen in den unterschiedlichen Läsionen
Tab 2.1.3, (S. 16):	Ausgewertete Gesamtzellzahlen der verschiedenen Gewebe
Tab. 2.1.4, (S. 18):	Verwendete Antikörper
Tab. 3.3.1, (S. 25):	Gesamtzahlen der ausgewerteten ER positiven Zellen
Tab. 3.4.1, (S. 27):	Gesamtzahlen der ausgewerteten Ki67 positiven Zellen
Tab. 3.5.1, (S. 30):	Gesamtzahlen der ausgewerteten CK8/18 positiven Zellen
Tab. 3.6.1, (S. 31):	Gesamtzahlen der ausgewerteten CK5/6 positiven Zellen
Tab. 3.7.1.1, (S. 33):	Ausgewertete Gesamtzellzahlen der Doppelmarkierungen von CK8/18 und ER
Tab. 3.7.2.1, (S. 35):	Ausgewertete Gesamtzellzahlen der Doppelmarkierungen von CK5/6 und ER
Tab. 3.7.3.1, (S. 37):	Ausgewertete Gesamtzellzahlen der Doppelmarkierungen von CK8/18 und Ki67
Tab. 3.7.4.1, (S. 39):	Ausgewertete Gesamtzellzahlen der Doppelmarkierungen von CK5/6 und Ki67

9 **Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 1, (S. 21):** Doppelmarkierung des Gangepithels mit Darstellung der basalen Zytokeratine 5/6 und der luminalen Zytokeratine 8/18. (Fotographie, Immunfluoreszenzfärbung)
- Abbildung 2, (S. 24):** Triple- Fluoreszenz mit Darstellung luminaler Zytokeratine 8/18, basaler Zytokeratine 5/6 und ER in einer DH. (Fotographie, Immunfluoreszenzfärbung)
- Abbildung 3, (S. 26):** Triple- Fluoreszenz mit Darstellung von Ki67, luminalen Zytokeratinen 8/18 und basalen Zytokeratinen 5/6 in einer DH. (Fotographie, Immunfluoreszenzfärbung)
- Abbildung 4, (S. 29):** Doppelfluoreszenz mit Darstellung von ER und luminalen Zytokeratinen 8/18 am Beispiel eines DCIS. (Fotographie, Immunfluoreszenzfärbung)

10 Diagrammverzeichnis

- Diagramm 3.1, (S. 22):** Anteil CK8/18(+) Zellen und CK5/6(+) Zellen in verschiedenen Läsionen gemessen an der Gesamtzellzahl.
- Diagramm 3.2, (S. 23):** Anteil ER(+) Zellen und Ki67(+) Zellen in verschiedenen Läsionen gemessen an der Gesamtzellzahl.
- Diagramm 3.3, (S. 25):** Anteil der ER(+) // CK8/18(+) Zellen und der ER(+) // CK5/6(+) Zellen, gemessen an der Gesamtzahl der ER(+) Zellen.
- Diagramm 3.4, (S. 27):** Anteil der Ki67(+) // CK8/18(+) Zellen und der Ki67(+) // (CK5/6(+) Zellen, gemessen an der Gesamtzahl der Ki67(+) Zellen.
- Diagramm 3.5, (S. 30):** Anteil ER(+) Zellen und Ki67(+) Zellen in verschiedenen Läsionen, gemessen an der Gesamtzahl der CK8/18(+) Zellen.
- Diagramm 3.6, (S. 31):** Anteil ER(+) Zellen und Ki67(+) Zellen in verschiedenen Läsionen, gemessen an der Gesamtzahl der CK5/6(+) Zellen.
- Diagramm 3.7.1, (S. 33):** Immunphänotypen der Doppelmarkierungen von CK8/18 und ER anteilig an der jeweiligen Gesamtzellzahl.
- Diagramm 3.7.2, (S. 35):** Immunphänotypen der Doppelmarkierungen von CK5/6 und ER anteilig an der jeweiligen Gesamtzellzahl.
- Diagramm 3.7.3, (S. 37):** Immunphänotypen der Doppelmarkierungen von CK8/18 und Ki67 anteilig an der jeweiligen Gesamtzellzahl.
- Diagramm 3.7.4, (S. 39):** Immunphänotypen der Doppelmarkierungen von CK5/6 und Ki67 anteilig an der jeweiligen Gesamtzellzahl.

11 Rohdaten

11.1 Rohdaten, Einzelwerte der verschiedenen Läsionen

11.1.1 Lämpchen/ Gänge: ER gegen CK8/18

ER gegen CK 8/18						
Fallnummer (Läsion)	CK8/18(-) / ER(+)	CK8/18(-) / ER(-)	CK8/18(+) / ER(-)	CK8/18(+) / ER(+)	Gesamtzellzahl	Myothenl
25078/94 (normale Lämpchen)	33	1320	11442	1001	13796	1317
in %	0,24%	9,57%	82,94%	7,26%	100,00%	9,55%
6499/00 (normale Lämpchen)	40	1510	11732	468	13750	1270
in %	0,29%	10,98%	85,32%	3,40%	100,00%	9,24%
37389/03 (normale Lämpchen)	59	1549	11140	1002	13750	1333
in %	0,43%	11,27%	81,02%	7,29%	100,00%	9,69%
19862/04 (normale Lämpchen)	68	1938	10887	912	13805	1268
in %	0,49%	14,04%	78,86%	6,61%	100,00%	9,19%
7847/04 (normale Lämpchen)	63	1339	11427	995	13824	1250
in %	0,46%	9,69%	82,66%	7,20%	100,00%	9,04%
25078/94 (normale Gänge)	13	2027	1283	219	3542	88
in %	0,37%	57,23%	36,22%	6,18%	100,00%	2,48%
6499/00 (normale Gänge)	46	2920	676	197	3839	102
in %	1,20%	76,06%	17,61%	5,13%	100,00%	2,66%
37389/03 (normale Gänge)	23	2265	747	170	3205	82
in %	0,72%	70,67%	23,31%	5,30%	100,00%	2,56%
19862/04 (normale Gänge)	56	1322	2007	314	3699	106
in %	1,51%	35,74%	54,26%	8,49%	100,00%	2,87%
7847/04 (normale Gänge)	19	1368	1718	336	3441	117
in %	0,55%	39,76%	49,93%	9,76%	100,00%	3,40%

11.1.2 Läppchen/ Gänge: ER gegen CK5/6

Fallnummer (Läsion)	ER gegen CK 5/6				Gesamtzellzahl	Myothenl
	CK5/6(+) / ER(+)	CK5/6(+) / ER(-)	CK5/6(-) / ER(-)	CK5/6(-) / ER(+)		
25078/94 (normale Läppchen)	88	824	11983	1010	13905	1276
in %	0,63%	5,93%	86,18%	7,26%	100,00%	9,18%
6499/00 (normale Läppchen)	107	921	12516	543	14087	1276
in %	0,76%	6,54%	88,85%	3,85%	100,00%	9,06%
37389/03 (normale Läppchen)	65	1151	11594	1215	14025	1328
in %	0,46%	8,21%	82,67%	8,66%	100,00%	9,47%
19862/04 (normale Läppchen)	63	821	12071	839	13794	1272
in %	0,46%	5,95%	87,51%	6,08%	100,00%	9,22%
7847/04 (normale Läppchen)	349	1165	11286	954	13754	1326
in %	2,54%	8,47%	82,06%	6,94%	100,00%	9,64%
25078/94 (normale Gänge)	144	3194	145	95	3578	76
in %	4,02%	89,27%	4,05%	2,66%	100,00%	2,12%
6499/00 (normale Gänge)	211	3252	176	59	3698	84
in %	5,71%	87,94%	4,76%	1,60%	100,00%	2,27%
37389/03 (normale Gänge)	205	3126	219	42	3592	96
in %	5,71%	87,03%	6,10%	1,17%	100,00%	2,67%
19862/04 (normale Gänge)	183	2851	216	80	3330	90
in %	5,50%	85,62%	6,49%	2,40%	100,00%	2,70%
7847/04 (normale Gänge)	345	2842	94	26	3307	89
in %	10,43%	85,94%	2,84%	0,79%	100,00%	2,69%

11.1.3 Läppchen/ Gänge: Ki67 gegen CK8/18

Fallnummer (Läsion)	Ki67 gegen CK 8/18				Gesamtzellzahl	Myoethel
	CK8/18(-)/Ki67(+)	CK8/18(-)/Ki67(-)	CK8/18(+)/Ki67(-)	CK8/18(+)/Ki67(+)		
25078/94 (normale Läppchen)	29	1371	12437	77	13914	1256
in %	0,21%	9,85%	89,39%	0,55%	100,00%	9,03%
6499/00 (normale Läppchen)	61	1456	12014	245	13776	1361
in %	0,44%	10,57%	87,21%	1,78%	100,00%	9,88%
37389/03 (normale Läppchen)	52	1384	11638	737	13811	1283
in %	0,38%	10,02%	84,27%	5,34%	100,00%	9,29%
19862/04 (normale Läppchen)	166	2775	9486	1361	13788	1255
in %	1,20%	20,13%	68,80%	9,87%	100,00%	9,10%
7847/04 (normale Läppchen)	19	1600	12128	151	13898	1213
in %	0,14%	11,51%	87,26%	1,09%	100,00%	8,73%
25078/94 (normale Gänge)	16	2285	1801	57	4159	100
in %	0,39%	54,94%	43,30%	1,37%	100,00%	2,40%
6499/00 (normale Gänge)	23	2878	703	61	3665	78
in %	0,63%	78,53%	19,18%	1,66%	100,00%	2,13%
37389/03 (normale Gänge)	18	2562	1099	70	3749	99
in %	0,48%	68,34%	29,31%	1,87%	100,00%	2,64%
19862/04 (normale Gänge)	29	1182	2070	124	3405	103
in %	0,85%	34,71%	60,79%	3,64%	100,00%	3,02%
7847/04 (normale Gänge)	24	1354	2054	91	3523	99
in %	0,68%	38,43%	58,30%	2,58%	100,00%	2,81%

11.1.4 Läppchen/ Gänge: Ki67 gegen CK5/6

Fallnummer (Läsion)	Ki67 gegen CK 5/6				Gesamtzellzahl	Myothen
	CK5/6(+) / Ki67(+)	CK5/6(+) / Ki67(-)	CK5/6(-) / Ki67(-)	CK5/6(-) / Ki67(+)		
25078/94 (normale Läppchen)	21	778	12900	118	13817	1226
in %	0,15%	5,63%	93,36%	0,85%	100,00%	8,87%
6499/00 (normale Läppchen)	67	881	12651	213	13812	1235
in %	0,49%	6,38%	91,59%	1,54%	100,00%	8,94%
37389/03 (normale Läppchen)	56	1382	11578	792	13808	1295
in %	0,41%	10,01%	83,85%	5,74%	100,00%	9,38%
19862/04 (normale Läppchen)	139	861	11592	1218	13810	1262
in %	1,01%	6,24%	83,93%	8,82%	100,00%	9,14%
7847/04 (normale Läppchen)	64	1366	12125	343	13898	1230
in %	0,46%	9,83%	87,24%	2,47%	100,00%	8,85%
25078/94 (normale Gänge)	74	3644	217	7	3942	88
in %	1,88%	92,44%	5,50%	0,18%	100,00%	2,23%
6499/00 (normale Gänge)	64	3128	245	13	3450	72
in %	1,86%	90,67%	7,10%	0,38%	100,00%	2,09%
37389/03 (normale Gänge)	60	3124	282	13	3479	79
in %	1,72%	89,80%	8,11%	0,37%	100,00%	2,27%
19862/04 (normale Gänge)	108	2498	258	45	2909	70
in %	3,71%	85,87%	8,87%	1,55%	100,00%	2,41%
7847/04 (normale Gänge)	152	3016	104	41	3313	79
in %	4,59%	91,04%	3,14%	1,24%	100,00%	2,38%

11.1.5 DH: ER gegen CK8/18

ER gegen CK8/18						
Fallnummer (Läsion)	CK8/18(-) / ER(+)	CK8/18(-) / ER(-)	CK8/18(+) / ER(-)	CK8/18(+) / ER(+)	Gesamtzellzahl	Myothesel
37124/02 B4 (DH)	46	398	2073	1130	3647	187
in %	1,26%	10,91%	56,84%	30,98%	100,00%	5,13%
736/04 4 (DH)	60	227	1745	1011	3043	131
in %	1,97%	7,46%	57,34%	33,22%	100,00%	4,30%
13820/91 1_2 (DH)	14	706	1761	655	3136	99
in %	0,45%	22,51%	56,15%	20,89%	100,00%	3,16%
28374/05 F (DH)	7	166	2040	995	3208	59
in %	0,22%	5,17%	63,59%	31,02%	100,00%	1,84%

11.1.6 DH: ER gegen CK5/6

ER gegen CK 5/6						
Fallnummer (Läsion)	CK5/6(+) / ER(+)	CK5/6(+) / ER(-)	CK5/6(-) / ER(-)	CK5/6(-) / ER(+)	Gesamtzellzahl	Myothesel
37124/02 B4 (DH)	74	1968	403	1065	3510	175
in %	2,11%	56,07%	11,48%	30,34%	100%	4,99%
736/04 4 (DH)	211	1858	286	884	3239	112
in %	6,51%	57,36%	8,83%	27,29%	100,00%	3,46%
13820/91 1_2 (DH)	18	2118	374	591	3101	110
in %	0,58%	68,30%	12,06%	19,06%	100,00%	3,55%
28374/05 F (DH)	77	2127	90	832	3126	52
in %	2,46%	68,04%	2,88%	26,62%	100,00%	1,66%

11.1.7 DH: Ki67 gegen CK8/18

Ki67 gegen CK 8/18						
Fallnummer (Läsion)	CK8/18(-)/Ki67(+)	CK8/18(-)/Ki67(-)	CK8/18(+)/Ki67(-)	CK8/18(+)/Ki67(+)	Gesamtzellzahl	Myothesel
37124/02 B4 (DH)	28	342	2596	141	3107	204
in %	0,90%	11,01%	83,55%	4,54%	100,00%	6,57%
736/04 4 (DH)	25	250	2472	152	2899	104
in %	0,86%	8,62%	85,27%	5,24%	100,00%	3,59%

13820/91 1 2 (DH)	30	727	2556	85	3398	95
in %	0,88%	21,40%	75,22%	2,50%	100,00%	2,80%
28374/05 F (DH)	18	176	2964	44	3202	33
in %	0,56%	5,50%	92,57%	1,37%	100,00%	1,03%

11.1.8 DH: Ki67 gegen CK5/6

Fallnummer (Läsion)	Ki67 gegen CK 5/6				Gesamtzellzahl	Myoethel
	CK5/6(+) / Ki67(+)	CK5/6(+) / Ki67(-)	CK5/6(-) / Ki67(-)	CK5/6(-) / Ki67(+)		
37124/02 B4 (DH)	50	1827	1050	75	3002	177
in %	1,67%	60,86%	34,98%	2,50%	100,00%	5,90%
736/04 4 (DH)	35	1989	920	124	3068	92
in %	1,14%	64,83%	29,99%	4,04%	100,00%	3,00%
13820/91 1 2 (DH)	9	2080	812	91	2992	77
in %	0,30%	69,52%	27,14%	3,04%	100,00%	2,57%
28374/05 F (DH)	15	2201	751	34	3001	32
in %	0,50%	73,34%	25,03%	1,13%	100,00%	1,07%

11.1.9 LN/ FEA/ ADH/ DCIS/ tub CA: ER gegen CK8/18

Fallnummer (Läsion)	ER gegen CK8/18				Gesamtzellzahl	Myoethel
	CK8/18(-) / ER(+)	CK8/18(-) / ER(-)	CK8/18(+) / ER(-)	CK8/18(+) / ER(+)		
30045/05 1 (LN)	2	153	708	2147	3010	263
in %	0,07%	5,08%	23,52%	71,33%	100,00%	8,74%
26317/05 B2 (LN)	2	161	447	1802	2412	156
in %	0,08%	6,67%	18,53%	74,71%	100,00%	6,47%
9752/03 2 (LN)	9	155	516	2440	3120	367
in %	0,29%	4,97%	16,54%	78,21%	100,00%	11,76%
12398/05 2 (LN)	0	70	281	1891	2242	183
in %	0,00%	3,12%	12,53%	84,34%	100,00%	8,16%
12398/05 1 (FEA)	0	3	52	2972	3027	275
in %	0,00%	0,10%	1,72%	98,18%	100,00%	9,08%
37124/02 B4 (FEA)	3	9	38	3532	3582	208

	0,08%	0,25%	1,06%	98,60%	100,00%	5,81%
35220/05 (FEA)	0	46	95	2691	2832	328
in %	0,00%	1,62%	3,35%	95,02%	100,00%	11,58%
40909/02 (FEA)	5	20	44	4304	4373	446
in %	0,11%	0,46%	1,01%	98,42%	100,00%	10,20%
40909/02 (ADH)	16	35	90	4144	4285	266
in %	0,37%	0,82%	2,10%	96,71%	100,00%	6,21%
12398/05 2 (DCIS)	0	1	35	4865	4901	366
in %	0,00%	0,02%	0,71%	99,27%	100,00%	7,47%
237/02 2B (DCIS)	0	0	56	3389	3445	261
in %	0,00%	0,00%	1,63%	98,74%	100,00%	7,58%
28598/03 B1 (DCIS)	0	3	47	3169	3219	277
in %	0,00%	0,09%	1,46%	98,45%	100,00%	8,61%
30045/05 2 (DCIS)	0	7	26	3887	3920	329
in %	0,00%	0,18%	0,66%	99,16%	100,00%	8,39%
12398/05 2 (tub. CA)	0	0	153	3036	3189	25
in %	0,00%	0,00%	4,80%	95,20%	100,00%	0,78%

11.1.10. LN/ FEA/ ADH/ DCIS/ tub CA: ER gegen CK5/6

Fallnummer (Läsionen)	ER gegen CK 5/6				Gesamtzellzahl	Myothenel
	CK5/6(+)/ER(+)	CK5/6(+)/ER(-)	CK5/6(-)/ER(-)	CK5/6(-)/ER(+)		
30045/05 1 (LN)	30	72	830	2059	2991	230
in %	1,00%	2,41%	27,75%	68,84%	100,00%	7,69%
26317/05 B2 (LN)	15	63	456	1743	2277	179
in %	0,66%	2,77%	20,03%	76,55%	100,00%	7,86%
9752/03 2 (LN)	1	24	599	2535	3159	298
in %	0,03%	0,76%	18,96%	80,25%	100%	9,43%
12398/05 2 (LN)	5	55	342	1974	2376	197
in %	0,21%	2,31%	14,39%	83,08%	100,00%	8,29%
12398/05 1 (FEA)	2	6	41	2337	2386	233
	0,08%	0,25%	1,72%	97,95%	100,00%	9,77%
37124/02 B4 (FEA)	2	19	16	3706	3743	283

	0,05%	0,51%	0,43%	99,01%	100,00%	7,56%
35220/05 (FEA)	4	6	68	2666	2744	356
in %	0,15%	0,22%	2,48%	97,16%	100%	12,97%
40909/02 (FEA)	7	12	24	4293	4336	434
in %	0,16%	0,28%	0,55%	99,01%	100,00%	10,01%
40909/02 (ADH)	29	0	74	4081	4184	308
in %	0,69%	0,00%	1,77%	97,54%	100,00%	7,36%
12398/05 2 (DCIS)	7	0	41	4893	4941	384
in %	0,14%	0,00%	0,83%	99,03%	100,00%	7,77%
237/02 2B (DCIS)	3	0	64	3800	3867	300
in %	0,08%	0,00%	1,66%	98,27%	100,00%	7,76%
28598/03 B1 (DCIS)	0	0	45	3299	3344	256
in %	0,00%	0,00%	1,35%	98,65%	100,00%	7,66%
30045/05 2 (DCIS)	9	0	29	4153	4191	333
in %	0,22%	0,00%	0,69%	99,09%	100,00%	7,95%
12398/05 2 (tub. CA)	0	0	146	2987	3133	27
in %	0,00%	0,00%	4,66%	95,34%	100,00%	0,86%

11.1.11 LN/ FEA/ ADH/ DCIS/ tub CA: Ki67 gegen CK8/18

Fallnummer (Läsion)	Ki67 gegen CK 8/18				Gesamtzellzahl	Myothen
	CK8/18(-)/Ki67(+)	CK8/18(-)/Ki67(-)	CK8/18(+)/Ki67(-)	CK8/18(+)/Ki67(+)		
30045/05 1 (LN)	4	220	2757	67	3048	233
in %	0,13%	7,22%	90,45%	2,20%	100,00%	7,64%
26317/05 B2 (LN)	4	276	3134	24	3438	238
in %	0,12%	8,03%	91,16%	0,70%	100,00%	6,92%
9752/03 2 (LN)	0	206	3073	42	3321	322
in %	0,00%	6,20%	92,53%	1,27%	100,00%	9,70%
12398/05 2 (LN)	4	158	2824	56	3042	206
in %	0,13%	5,19%	92,83%	1,84%	100,00%	6,77%
12398/05 1 (FEA)	5	1	3371	100	3477	318
in %	0,14%	0,03%	96,95%	2,88%	100,00%	9,15%
37124/02 B4 (FEA)	0	0	3105	12	3117	228

in %	0,00%	0,00%	99,62%	0,38%	100,00%	7,31%
35220/05 (FEA)	14	11	2337	77	2439	290
in %	0,57%	0,45%	95,82%	3,16%	100,00%	11,89%
40909/02 (FEA)	11	10	3225	99	3345	328
in %	0,33%	0,30%	96,41%	2,96%	100,00%	9,81%
40909/02 (ADH)	3	18	3335	229	3585	230
in %	0,08%	0,50%	93,03%	6,39%	100,00%	6,42%
12398/05 2 (DCIS)	0	0	4610	308	4918	356
in %	0,00%	0,00%	93,74%	6,26%	100,00%	7,24%
237/02 2B (DCIS)	0	0	3307	154	3461	230
in %	0,00%	0,00%	95,55%	4,45%	100,00%	6,65%
28598/03 B1 (DCIS)	0	6	3143	15	3164	302
in %	0,00%	0,19%	99,34%	0,47%	100,00%	9,54%
30045/05 2 (DCIS)	17	18	2760	717	3512	214
in %	0,48%	0,51%	78,59%	20,42%	100,00%	6,09%
12398/05 2 (tub. CA)	2	0	2610	393	3005	30
in %	0,07%	0,00%	86,86%	13,08%	100,00%	1,00%

11.1.12 LN/ FEA/ ADH/ DCIS/ tub CA: Ki67 gegen CK5/6

Fallnummer (Läsion)	Ki67 gegen CK 5/6				Gesamtzellzahl	Myothen
	CK5/6(+) / Ki67(+)	CK5/6(+) / Ki67(-)	CK5/6(-) / Ki67(-)	CK5/6(-) / Ki67(+)		
30045/05 1 (LN)	2	88	2863	52	3005	206
in %	0,07%	2,93%	95,27%	1,73%	100,00%	6,86%
26317/05 B2 (LN)	2	66	3181	16	3265	236
in %	0,06%	2,02%	97,43%	0,49%	100,00%	7,23%
9752/03 2 (LN)	2	19	3018	28	3067	226
in %	0,07%	0,62%	98,40%	0,91%	100,00%	7,37%
12398/05 2 (LN)	0	89	3498	47	3634	263
in %	0,00%	2,45%	96,26%	1,29%	100,00%	7,24%
12398/05 1 (FEA)	0	7	3187	105	3299	289
in %	0,00%	0,21%	96,61%	3,18%	100,00%	8,76%
37124/02 B4 (FEA)	2	7	3232	8	3249	238

in %	0,06%	0,22%	99,48%	0,25%	100,00%	7,33%
35220/05 (FEA)	1	0	2402	74	2477	256
in %	0,04%	0,00%	96,97%	2,99%	100,00%	10,34%
40909/02 (FEA)	0	10	3336	103	3449	367
in %	0,00%	0,29%	96,72%	2,99%	100,00%	10,64%
40909/02 (ADH)	0	15	3029	214	3258	211
in %	0,00%	0,46%	92,97%	6,57%	100,00%	6,48%
12398/05 2 (DCIS)	0	9	4085	253	4347	348
in %	0,00%	0,21%	93,97%	5,82%	100,00%	8,01%
237/02 2B (DCIS)	2	4	3125	157	3288	238
in %	0,06%	0,12%	95,04%	4,78%	100,00%	7,24%
28598/03 B1 (DCIS)	0	2	3275	21	3298	291
in %	0,00%	0,06%	99,30%	0,64%	100,00%	8,82%
30045/05 2 (DCIS)	0	3	3054	701	3758	278
in %	0,00%	0,08%	81,27%	18,65%	100,00%	7,40%
12398/05 2 (tub. CA)	0	0	2777	387	3164	25
in %	0,00%	0,00%	87,77%	12,23%	100,00%	0,79%

11.2 Summentabellen

11.2.1 Summentabelle ER gegen CK8/18

ER gegen CK8/18						
Läsion	CK8/18(-) / ER(+)	CK8/18(-) / ER(-)	CK8/18(+) / ER(-)	CK8/18(+) / ER(+)	Gesamtzellzahl	Myothen
Normale Läppchen	263	7656	56628	4378	68925	6438
	0,38%	11,11%	82,16%	6,35%	100,00%	9,34%
Normale Gänge	157	9902	6431	1236	17726	495
In %	0,89%	55,86%	36,28%	6,97%	100,00%	2,79%
DH	127	1497	7619	3791	13034	476
in %	0,97%	11,49%	58,45%	29,08%	100,00%	3,65%
LN	13	539	1952	8280	10784	969
in %	0,12%	5,00%	18,10%	76,78%	100,00%	8,99%
FEA	8	78	229	13499	13814	1257
in %	0,06%	0,56%	1,66%	97,72%	100%	9,10%

ADH	16	35	90	4144	4285	266
in %	0,37%	0,82%	2,10%	96,71%	100,00%	6,21%
DCIS	0	11	164	15310	15485	1233
In %	0,00%	0,07%	1,06%	98,87%	100,00%	7,96%
tub. CA	0	0	153	3036	3189	25
in%	0,00%	0,00%	4,80%	95,20%	100,00%	0,78%

11.2.2 Summentabelle ER gegen CK5/6

ER gegen CK5/6						
Läsion	CK5/6(+) / ER(+)	CK5/6(+) / ER(-)	CK5/6(-) / ER(-)	CK5/6(-) / ER(+)	Gesamtzellzahl	Myothenel
Normale Lappchen	672	4882	59450	4561	69565	6478
in %	0,97%	7,02%	85,46%	6,56%	100,00%	9,31%
Normale Gänge	1088	15265	850	302	17505	435
in %	6,22%	87,20%	4,86%	1,73%	100,00%	2,49%
DH	380	8071	1153	3372	12976	449
in %	2,93%	62,20%	8,89%	25,99%	100,00%	3,46%
LN	51	214	2227	8311	10803	904
in %	0,47%	1,98%	20,61%	76,93%	100,00%	8,37%
FEA	15	43	149	13002	13209	1306
in %	0,11%	0,33%	1,13%	98,43%	100,00%	9,89%
ADH	29	0	74	4081	4184	308
in %	0,69%	0,00%	1,77%	97,54%	100,00%	7,36%
DCIS	19	0	179	16145	16343	1273
in %	0,12%	0,00%	1,10%	98,79%	100,00%	7,79%
tub. CA	0	0	146	2987	3133	27
in %	0,00%	0,00%	4,66%	95,34%	100,00%	0,86%

11.2.3 Summentabelle Ki67 gegen CK8/18

Ki67 gegen CK8/18						
Läsion	CK8/18(-) / Ki67(+)	CK8/18(-) / Ki67(-)	CK8/18(+) / Ki67(-)	CK8/18(+) / Ki67(+)	Gesamtzellzahl	Myothenel
Normale Lappchen	327	8586	57703	2571	69187	6368
in %	0,47%	12,41%	83,40%	3,72%	100,00%	9,20%
Normale Gänge	110	10261	7727	403	18501	479
in %	0,59%	55,46%	41,77%	2,18%	100,00%	2,59%

DH	101	1495	10588	422	12606	436
in %	0,80%	11,86%	83,99%	3,35%	100,00%	3,46%
LN	12	860	11788	189	12849	999
in %	0,09%	6,69%	91,74%	1,47%	100,00%	7,77%
FEA	30	22	12038	288	12378	1164
in %	0,24%	0,18%	97,25%	2,33%	100,00%	9,40%
ADH	3	18	3335	229	3585	230
in %	0,08%	0,50%	93,03%	6,39%	100,00%	6,42%
DCIS	17	24	13820	1194	15055	1102
in %	0,11%	0,16%	91,80%	7,93%	100,00%	7,32%
tub. CA	2	0	2610	393	3005	30
in %	0,07%	0,00%	86,86%	13,08%	100,00%	1,00%

11.2.4 Summentabelle Ki67 gegen CK5/6

Ki67 gegen CK5/6						
Läsion	CK5/6(+) / Ki67(+)	CK5/6(+) / Ki67(-)	CK5/6(-) / Ki67(-)	CK5/6(-) / Ki67(+)	Gesamtzellzahl	Myoepithel
Normale Lappchen	347	5268	60846	2684	69145	6248
in %	0,50%	7,62%	88,00%	3,88%	100,00%	9,04%
Normale Gänge	458	15410	1106	119	17093	388
in %	2,68%	90,15%	6,47%	0,70%	100,00%	2,27%
DH	109	8097	3533	324	12063	378
in %	0,90%	67,12%	29,29%	2,69%	100,00%	3,13%
LN	6	262	12560	143	12971	931
in %	0,05%	2,02%	96,83%	1,10%	100,00%	7,18%
FEA	3	24	12157	290	12474	1150
in %	0,02%	0,19%	97,46%	2,32%	100,00%	9,22%
ADH	0	15	3029	214	3258	211
in %	0,00%	0,46%	92,97%	6,57%	100,00%	6,48%
DCIS	2	18	13539	1132	14691	1155
in %	0,01%	0,12%	92,16%	7,71%	100,00%	7,86%
tub. CA	0	0	2777	387	3164	25
in %	0,00%	0,00%	87,77%	12,23%	100,00%	0,79%

12 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ihre Motivation und Unterstützung hat es mir ermöglicht, die Promotionsarbeit parallel zum Studium fertig zu stellen.

Herrn Prof. Dr. Werner Böcker möchte ich für die Überlassung des Themas, sowie für die freundliche Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit danken.

An Herrn Dr. Bernd Schulte ergeht mein Dank bezüglich der praktischen Umsetzung dieser Arbeit, sowie seines motivierten Einsatzes für die Koordination zwischen der Ruhruniversität Bochum und der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

Für die zeitnahe Erstellung der immunhistochemischen Färbungen möchte ich mich bei Frau Gabriele Krull bedanken.

Herrn Dr. Eberhard Korsching danke ich für seine geduldige Auseinandersetzung mit den aufgetretenen statistischen Fragestellungen.

