

Aus dem Medizinischen Zentrum für Pathologie

der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. R. Moll



# **CD34<sup>+</sup> FIBROZYTEN IM MÄNNLICHEN GENITALTRAKT**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Anne Katharina Münks**

**aus Krefeld**

Marburg, 2010

**Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg**

**am: 4. November 2010**

**Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.**

**Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund**

**Referent: Prof. Dr. P. J. Barth**

**1. Korreferent: PD Dr. A. Hegele**

**Für meine liebe Familie**

## **Inhaltsverzeichnis**

	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Das Bindegewebe des menschlichen Körpers	1
1.2. CD34 <sup>+</sup> Fibrozyten	1
1.2.1. Die Entdeckung der Fibrozyten	1
1.2.2. Verteilung und Morphologie der CD34 <sup>+</sup> Fibrozyten	4
1.2.3. Die Funktion der CD34 <sup>+</sup> Fibrozyten	5
1.3. Klinische Relevanz der CD34 <sup>+</sup> Fibrozyten	7
1.3.1. CD34 <sup>+</sup> Fibrozyten in malignen epithelialen Tumoren	7
1.3.2. CD34 <sup>+</sup> Fibrozyten in mesenchymalen Tumoren	9
1.3.3. CD34 <sup>+</sup> Fibrozyten als Auslöser fibrosierender Prozesse	9
1.4. Karzinome des männlichen Genitaltrakts	10
1.4.1. Hodenkarzinom	10
1.4.2. Prostatakarzinom	10
1.4.3. Peniskarzinom	10
<b>2. Fragestellung</b>	<b>11</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>12</b>

3.1.	Geräte	12
3.2.	Puffer und Lösungen	12
3.3.	Untersuchtes Material	12
3.4.	Das Prinzip der Immunhistochemie	17
3.4.1.	Schnittherstellung und Vorbereitung der Gewebe	17
3.4.2.	ABC-Peroxidase-Methode	17
3.4.3.	Doppelfärbung	19
3.4.4.	Modus zur Auswertung immunhistochemischer Präparate	20
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>22</b>
4.1.	CD34 <sup>+</sup> Fibrozyten und $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten im Hoden	22
4.1.1.	Normaler Hoden	22
4.1.2.	Seminom des Hodens	23
4.2.	CD34 <sup>+</sup> Fibrozyten und $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten in Prostata, Samenblase und Ductus deferens	31
4.2.1.	Normale Prostata	31
4.2.2.	Adenokarzinom der Prostata	36
4.2.3.	Normale Samenblase	44
4.2.4.	Normaler Ductus deferens	46
4.3.	CD34 <sup>+</sup> Fibrozyten und $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten im Penis	48

4.3.1.	Normaler Penis	48
4.3.2.	Karzinome und Carcinoma in situ des Penis	54
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
5.1.	Pathogenese des Stromaumbaus	63
5.2.	Hoden	66
5.2.1	CD34 <sup>+</sup> Fibrozyten und $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten in normalem und malignem Stroma des Hoden	66
5.2.2	SPARC und TGF- $\beta$ in normalem und malignem Stroma des Hoden	67
5.3.	Prostata	69
5.3.1	CD34 <sup>+</sup> Fibrozyten und $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten in normalem und malignem Stroma der Prostata	69
5.3.2.	Das Auftreten von CD34 <sup>+</sup> Fibrozyten in Abhängigkeit vom Tumorstadium und Gleason-Score	71
5.3.3.	SPARC und TGF- $\beta$ in normalem und malignem Stroma der Prostata	73
5.4.	Samenblase und Ductus deferens	73
5.4.1.	CD34 <sup>+</sup> Fibrozyten und $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten in normalem Stroma von Samenblase und Ductus deferens	73
5.5.	Penis	74
5.5.1	CD34 <sup>+</sup> Fibrozyten und $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten in normalen und malignen Stroma des Penis	74
5.5.2.	SPARC und TGF- $\beta$ in normalem und malignem Stroma des Penis	77

<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>79</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellarischer Anhang</b>	<b>82</b>
7.1.	Normaler Hoden	82
7.2.	Seminom des Hodens	83
7.3.	Normale Prostata	84
7.4.	Normale Prostata mit normaler Samenblase	85
7.5.	Adenokarzinom der Prostata	86
7.6.	Normaler Ductus deferens	87
7.7.	Normaler Penis	88
7.7.1	Normale penile Urethra	89
7.8.	Plattenepithelkarzinom des Penis	89
7.9.	Urothelkarzinom der penilen Urethra	89
7.10.	Malignes Melanom der Penishaut	90
7.11.	Modus zur Auswertung immunhistochemischer Präparate	90
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>91</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b>	<b>98</b>
9.1.	Tabellarischer Lebenslauf	98

9.2.	Verzeichnis der akademischen Lehrer	100
9.3.	Danksagung	101
9.4.	Ehrenwörtliche Erklärung	102

## Tabellenverzeichnis

<b>Nr.</b>	<b>Titel der Tabelle</b>	<b>Kapitel</b>
1	<i>Übersicht über Vorkommen von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in Organen des Menschen geordnet nach anatomischen Gesichtspunkten</i>	1.2.2.
2	<i>Übersicht über Wirkung und Funktion der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten (zusammengestellt aus: Abe et al., 2001; Bucala et al., 1994; Chesney et al., 1997, 1998; Hartlapp et al., 2001; Khan et al., 2003; Quan et al., 2004)</i>	1.2.3.
3	<i>Übersicht über histologischen Typ und Lokalisation der Karzinome, in denen ein Verlust der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im Tumorstroma beschrieben wurde</i>	1.3.1.
4	<i>Übersicht der ausgewählten Seminome unterteilt nach Geburtsjahr und TNM-Klassifikation</i>	3.3.
5	<i>Übersicht der ausgewählten Prostatakarzinome unterteilt nach Geburtsjahr, TNM-Klassifikation und Gleason-Score</i>	3.3.
6	<i>Übersicht der ausgewählten Peniskarzinome unterteilt nach Geburtsjahr, TNM-Klassifikation und Grading</i>	3.3.
7	<i>Primärantikörper und Gewebepvorbereitung für die Immunhistochemie</i>	3.4.2.
8	<i>Modus zur Auswertung immunhistochemischer Präparate</i>	3.4.4.
9	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Epithelzellen des normalen Hodens mit CD34 und <math>\alpha</math>-SMA (n(%))</i>	4.1.1.
10	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Epithelzellen des normalen Hodens mit SPARC und TGF-<math>\beta</math> (n(%))</i>	4.1.1.
11	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 14 Seminomen des Hodens mit CD34 und <math>\alpha</math>-SMA in Abhängigkeit von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors (pT1 und pT2/3) nach TNM (n(%))</i>	4.1.2.
12	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 14 Seminomen des Hodens mit SPARC und TGF-<math>\beta</math> in Abhängigkeit von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors (pT1 und pT2/3) nach TNM (n(%))</i>	4.1.2.

13	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Epithelzellen der normalen Prostata mit CD34 und <math>\alpha</math>-SMA (n(%))</i>	4.2.1.
14	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Epithelzellen der normalen Prostata mit SPARC und TGF-<math>\beta</math> (n(%))</i>	4.2.1.
15	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 32 Adenokarzinomen der Prostata mit CD34 und <math>\alpha</math>-SMA (n(%))</i>	4.2.2.
16	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 32 Adenokarzinomen der Prostata mit CD34 und <math>\alpha</math>-SMA in Abhängigkeit von Fehlen (pN0) bzw. Vorhandensein (pN1) von regionalen Lymphknotenmetastasen nach TNM (n(%))</i>	4.2.2.
17	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 32 Adenokarzinomen der Prostata mit CD34 und <math>\alpha</math>-SMA in Abhängigkeit von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors nach TNM (n(%))</i>	4.2.2.
18	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 32 Adenokarzinomen der Prostata mit CD34 und <math>\alpha</math>-SMA in Abhängigkeit vom Entdifferenzierungsgrad nach Gleason (n(%))</i>	4.2.2.
19	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 32 Adenokarzinomen der Prostata mit SPARC und TGF-<math>\beta</math> in Abhängigkeit von Fehlen (pN0) bzw. Vorhandensein (pN1) von regionalen Lymphknotenmetastasen nach TNM (n(%))</i>	4.2.2.
20	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 32 Adenokarzinomen der Prostata mit SPARC und TGF-<math>\beta</math> in Abhängigkeit von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors nach TNM (n(%))</i>	4.2.2.
21	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 32 Adenokarzinomen der Prostata mit SPARC und TGF-<math>\beta</math> in Abhängigkeit vom Entdifferenzierungsgrad nach Gleason (n(%))</i>	4.2.2.
22	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Epithelzellen der normalen Samenblase mit CD34 und <math>\alpha</math>-SMA (n(%))</i>	4.2.3.

23	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Epithelzellen der normalen Samenblase mit SPARC und TGF-<math>\beta</math> (n(%))</i>	4.2.3.
24	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Epithelzellen des normalen Ductus deferens mit CD34 und <math>\alpha</math>-SMA (n(%))</i>	4.2.4.
25	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Epithelzellen des normalen Ductus deferens mit SPARC und TGF-<math>\beta</math> (n(%)); TGF-<math>\beta</math> wurde hier nicht gefärbt</i>	4.2.4.
26	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas von Penishaut, Tunica albuginea, Fascia penis, Corpus spongiosum, Corpus cavernosum und Urethra sowie des Urethraepithels des normalen Penis mit CD34 und <math>\alpha</math>-SMA (n(%))</i>	4.3.1.
27	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas von Penishaut, Tunica albuginea, Fascia penis, Corpus spongiosum, Corpus cavernosum und Urethra sowie des Urethraepithels des normalen Penis mit SPARC und TGF-<math>\beta</math> (n(%))</i>	4.3.1.
28	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Zellen des Carcinoma in situ mit CD34 und <math>\alpha</math>-SMA (n(%))</i>	4.3.2.
29	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Zellen des Carcinoma in situ mit SPARC und TGF-<math>\beta</math> (n(%))</i>	4.3.2.
30	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 9 Plattenepithelkarzinomen des Penis mit CD34 und <math>\alpha</math>-SMA in Abhängigkeit von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors (pT1 und pT2/3) nach TNM (n(%))</i>	4.3.2.
31	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 9 Plattenepithelkarzinomen des Penis mit SPARC und TGF-<math>\beta</math> in Abhängigkeit von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors (pT1 und pT2/3) nach TNM (n(%))</i>	4.3.2.
32	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen des Urothelkarzinoms der penilen Urethra mit CD34 und <math>\alpha</math>-SMA (n(%))</i>	4.3.2.
33	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen des Urothelkarzinoms der penilen Urethra mit SPARC und TGF-<math>\beta</math> (n (%))</i>	4.3.2.
34	<i>Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von einem Malignen Melanom des Penis mit</i>	4.3.2.

*CD34 und  $\alpha$ -SMA (n(%))*

- 35 *Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen des Malignen Melanoms des Penis mit SPARC und TGF- $\beta$  (n(%))* 4.3.2.
- 36 *Modus zur Auswertung immunhistochemischer Präparate, die im tabellarischen Anhang mit einem Stern (\*) versehenen Zeichen markieren eine intrazelluläre Reaktion mit dem jeweiligen Antikörper* 7.1.

## Abbildungsverzeichnis

<b>Nr.</b>	<b>Abbildung</b>	<b>Kapitel</b>
<b>1</b>	<i>Elektronenmikroskopisches Bild eines zirkulierenden Fibrozyts (aus Bucala et al., 1994)</i>	1.2.1.
<b>2- 11</b>	<i>Immunhistochemie: Normaler Hoden und Seminom des Hodens</i>	4.1.2.
<b>12- 16</b>	<i>Immunhistochemie: Normale Prostata</i>	4.2.1.
<b>17- 22</b>	<i>Immunhistochemie: Adenokarzinom der Prostata</i>	4.2.2.
<b>23- 24</b>	<i>Immunhistochemie: Normale Samenblase</i>	4.2.3.
<b>25- 29</b>	<i>Immunhistochemie: Normaler Penis</i>	4.3.1.
<b>30- 34</b>	<i>Immunhistochemie: Plattenepithelkarzinom des Penis</i>	4.3.2.
<b>35</b>	<i>Übersicht über die Pathogenese des Stromas bei Tumoren und anderen Gewebeschäden (Abb. aus: Barth u. Westhoff, 2007)</i>	5.1.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ABC</b>	Avidin-biotinylated peroxidase complex
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Alpha- Smooth Muscle Actin
<b>Aqua dest.</b>	destilliertes Wasser (lateinisch: Aqua destillata)
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>Cis</b>	Carcinoma in situ
<b>CCR</b>	Chemokine receptor
<b>c-kit</b>	CD117, KIT oder Stammzellfaktor-Rezeptor
<b>CSF</b>	colony-stimulating factor
<b>DAB</b>	3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
<b>et al.</b>	und andere (lateinisch: et alii)
<b>etc.</b>	und so weiter (lateinisch: et cetera)
<b>Fa.</b>	Familie
<b>ggf.</b>	gegebenenfalls
<b>GM-CSF</b>	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
<b>GS</b>	Gleason-Score
<b>HCL</b>	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
<b>HLA</b>	human leukocyte antigen
<b>HPV</b>	Humane Papillomaviren
<b>Ig-G</b>	Immunglobulin G
<b>IL</b>	Interleukin
<b>k.A.</b>	Keine Angabe
<b>kD</b>	Kilodalton
<b>M</b>	Mol
<b>mg</b>	Milligramm
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimol
<b>MHC</b>	major histocompatibility complex
<b>min.</b>	Minuten
<b>MIP</b>	macrophage inflammatory proteins
<b>MMP</b>	matrix metalloproteinases

<b>M-CSF</b>	macrophage colony-stimulating factor
<b><i>n</i></b>	Anzahl
<b>Na</b>	Natrium
<b>Nr.</b>	Nummer
<b>PBS</b>	phosphate-buffered saline
<b>PDGF</b>	platelet derived growth factor
<b>pH</b>	Maßzahl für saure/alkalische Substanzen (lateinisch: potentia hydrogenii)
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>SPARC</b>	Secreted protein, acidic and rich in cystein
<b>TNM</b>	Stadieneinteilung für maligne Tumoren T= Tumor, N= Nodes, M=Metastasen
<b>TNF- α</b>	Tumornekrosefaktor-alpha
<b>TGF-β</b>	transforming growth factor-β
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TBS</b>	Tris-buffered saline
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>UK</b>	United Kingdom
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor
<b>W</b>	Watt
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>°C</b>	Grad Celsius

## **1. Einleitung**

### **1.1 Das Bindegewebe des menschlichen Körpers**

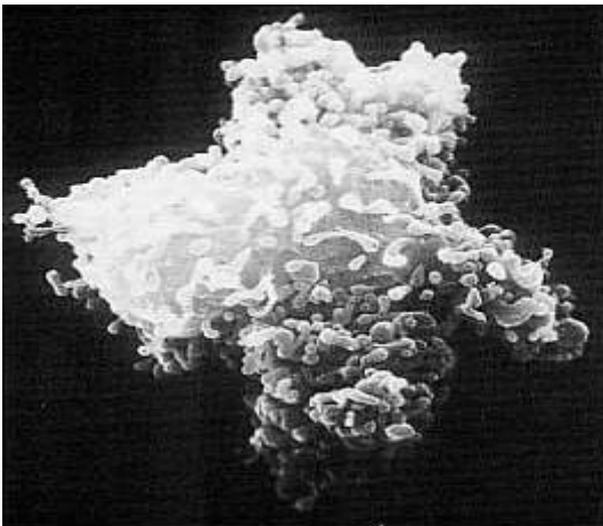
Das Bindegewebe des Menschen besitzt zahlreiche für den Körper essentielle Funktionen: Es spielt bei der Formgebung der Organe, der Fettspeicherung, dem Stoffwechsel sowie bei der Immunabwehr im menschlichen Organismus eine entscheidende Rolle (Schiebler u. Korf, 2007). Die Zellen des embryonalen Bindegewebes entstammen dem Mesenchym. Sie sind pluripotent und können sich im Laufe der Entwicklung in charakteristische, heterogene Zellarten differenzieren (Junqueira u. Carneiro, 2004). Im entwickelten Körper ist der Aufbau des Bindegewebes den jeweiligen lokalen Anforderungen der Organe angepasst, jedoch besteht es grundsätzlich aus zwei Komponenten: der Interzellulärsubstanz und den Bindegewebszellen. Die Interzellulärsubstanz, auch extrazelluläre Matrix genannt, bildet sich zu variablen Anteilen aus elastischen-, retikulären- und kollagenen Fasern sowie amorpher Grundsubstanz und Gewebeflüssigkeit. Kollagen ist der wichtigste Vertreter der Interzellulärsubstanz und macht ungefähr 30% des Gesamtkörperproteins aus. Damit stellt es das häufigste Protein im menschlichen Körper dar. Die Bindegewebszellen lassen sich in "freie" und "ortständige" Bindegewebszellen unterteilen. Unter "freien" Zellen versteht man mobile Zellen wie beispielsweise Makrophagen, Plasmazellen, Lymphozyten oder Granulozyten. Sie entstammen dem Knochenmark und treten vor allem bei Entzündungsvorgängen vom Blut in geschädigtes Gewebe über (Schiebler u. Korf, 2007). Dort übernehmen sie wichtige Funktionen in der Abwehr, sind dafür aber nicht an der Bildung der Interzellulärsubstanz beteiligt. Zu "ortständigen" Zellen zählt man typischerweise Fibrozyten und Fibroblasten, die vor Ort als Produzenten der extrazellulären Matrix für die mechanische Stabilität eines Gewebes verantwortlich sind. Darüber hinaus übernehmen Fibrozyten zahlreiche für den Menschen essentielle Funktionen, auf die folgend genauer eingegangen werden soll (Schiebler u. Korf, 2007).

### **1.2. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten**

#### **1.2.1. Die Entdeckung der Fibrozyten**

Die Herkunft und Funktion der Bindegewebszellen beschäftigt die Wissenschaft schon

seit langem. Über Jahrzehnte hinweg wurde diskutiert, inwieweit Bindegewebszellen aus ortständigen Mesenchymzellen oder aus frei zirkulierenden Vorläuferzellen hervorgehen (Dunphy, 1963). Die Berichte und Beschreibungen der uns heute als Fibrozyten bekannten Zellen lassen sich bis in die Mitte des neunzehnten Jahrhunderts zurückverfolgen. Der Brite Walter Paget diskutierte 1863 als erster die Theorie, dass Bindegewebszellen ursprünglich von Bestandteilen des peripheren Bluts abstammen könnten (Paget et al., 1863). Der gleichen Überzeugung waren auch Wissenschaftler wie Conheim (1867), Fischer (1925) und Maximov (1928), die diese These in den folgenden Jahren wiederholt aufgriffen. Stirling und Kakkar zeigten Ende der sechziger Jahre erstmals, dass Matrix-produzierende Zellen von zirkulierenden Blutelementen abstammen müssen und nicht - wie damals von vielen angenommen - von Endothelzellen (Stirling u. Kakkar, 1969). Die genaue Herkunft und Funktion dieser zirkulierenden Zellen blieb jedoch weitere 25 Jahre ungeklärt (Quan et al., 2004). Richard Bucala war es, dem 1994 erstmals der genaue Nachweis einer bis dahin unbekannt Population zirkulierender Blutzellen gelang. Bucala beschäftigte sich mit den Mechanismen der Wundheilung und zeigte anhand von experimentellen Untersuchungen an Mäusen, dass zirkulierende Zellen aus der Blutbahn in geschädigtes Gewebe invadierten und dort Kollagenfasern bildeten. Daher bezeichnete er diese Zellen als "circulating fibrocytes" (Bucala et al., 1994).



**Abb. 1** Elektronenmikroskopisches Bild eines zirkulierenden Fibrozyts (aus Bucala et al., 1994)

Der Name setzt sich aus den Bestandteilen "fibro" und "kytos" zusammen:

“Fibro“steht für den lateinischen Begriff für Faser, “kytos“ ist griechisch und bedeutet Zelle. Fibrozyten stammen von CD14<sup>+</sup> Monozyten ab, die nach Stimulation durch T-Zellen zu Fibrozyten differenzieren. Somit stellen Fibrozyten eine Subpopulation von Leukozyten dar, die ca. 0,5% der Blutleukozyten ausmacht. Die Fibrozyten weisen einen charakteristischen Phänotyp auf: Sie exprimieren das CD34-Zellantigen auf ihrer Zelloberfläche. Damit repräsentieren sie bis heute die einzige Zellgattung, die zur Kollagensynthese und Expression des CD34-Antigens zugleich befähigt ist (Schmidt et al., 2003). CD34 ist ein 110 kD schweres membranäres Glykoprotein, das auf hämatopoetischen Stammzellen nachweisbar ist (Bucala et al., 1994; Brown et al., 1991). Aus diesem Grunde galt der Nachweis dieses Antigens lange Zeit als Beweis einer hämatopoetischen Abstammung dieser Zellen (Bucala et al., 1994). Mittlerweile weiß man aber, dass CD34 auch auf Zelloberflächen von Endothelzellen, stromalen Knochenmarkzellen und embryonalen Fibroblasten exprimiert wird (Brown et al., 1991; Fina et al., 1990). Demnach ist die CD34-Expression nicht als alleiniger Indikator für einen hämatopoetischen Ursprung der Fibrozyten geeignet. In weiteren Untersuchungen konnten aber andere charakteristische Indikatoren auf der Oberfläche der Fibrozyten identifiziert werden (CD11a, CD11b, CD13, CD18, CD45RO, HLA-DR), die den hämatopoetischen Ursprung dieser Zellen endgültig belegen (Aiba u. Tagami, 1997; Bucala et al., 1994; Chesney et al., 1997; Kirchmann et al., 1994). Die Nomenklatur zur Beschreibung dieser speziellen Population von Bindegewebszellen ist in der Weltliteratur nicht einheitlich. Die im Laufe der Zeit gewonnenen Erkenntnisse über Eigenschaften und Morphologie der Fibrozyten haben in der Literatur zur Prägung verschiedener Namen geführt. So wird von “fibroblasts“ (Silverman u. Tamsen, 1997), “dendritic interstitial cells” (Soma et al., 2001), “adventitial fibroblastic cells“ (Nakayama et al., 2004) oder “CD34 positive stromal cells“ (Barth et al., 2002, 2005; Nakayama et al., 2001, 2003; Kuroda et al., 2004) gesprochen. Dennoch ist all diesen Begriffen gemein, dass sie eine Zellidentität mit den gleichen charakteristischen Eigenschaften beschreiben.

In dieser Arbeit benutzen wir den Begriff “CD34<sup>+</sup> Fibrozyten“ stellvertretend für Zellen, die zwei Kriterien erfüllen: Sie müssen immunhistochemisch die CD34-Expression aufweisen und dabei die charakteristischen morphologischen Kriterien der Fibrozyten erfüllen.

### 1.2.2. Verteilung und Morphologie der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten

CD34<sup>+</sup> Fibrozyten lassen sich bereits ab der 10. Schwangerschaftswoche in Embryonen nachweisen. In dieser Entwicklungsphase bilden sie den Hauptbestandteil des lockeren Stromas des embryonalen Gewebes. Auch im entwickelten Körper bilden ortsständige CD34<sup>+</sup> Fibrozyten einen grundlegenden Bestandteil des Stromas vieler Organe (Barth u. Westhoff, 2007). Ihr Vorkommen wurde im Stroma des Gastrointestinaltrakts, des Urogenitaltrakts und des Respirationstrakts sowie im Stroma von Haut, Mamma, Schilddrüse, Herz, Peritoneum und Cornea beschrieben (Tab. 1).

Anatomischer Bereich	Organe (Referenzen)
<i>Gastrointestinaltrakt</i>	Mundhöhle und Pharynx (Barth et al., 2004)
	Magen (Nakayama et al., 2001)
	Dickdarm (Nakayama et al., 2000)
	Pankreas (Barth et al., 2002a)
<i>Respirationstrakt</i>	Larynx (Barth et al., 2004)
	Lunge (Nakayama et al., 2003)
<i>Urogenitaltrakt</i>	Harnblase (Nimphius et al., 2006)
	- weiblich Cervix uteri (Barth et al., 2002c)
	Eileiter (Yamazaki u. Eyden, 1996b)
- männlich	Hoden (Kuroda et al., 2004)
<i>Sonstige</i>	Mamma (Barth et al., 2002b, 2005; Chauhan et al., 2003; Ebrahimsade et al., 2007; Ramaswamy et al., 2003)
	Haut (Humphreys et al., 2000; Illueca et al., 1998; Kirchmann et al., 1994, 1995; Swanson et al., 1998; Wessel et al., 2008)
	Schilddrüse (Yamazaki u. Eyden, 1997)
	Herzklappen (Barth et al., 2005)
	Peritoneum (Jimenez-Heffernan et al., 2004)
	Cornea (España et al., 2004)

**Tab. 1** Übersicht über Vorkommen von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in Organen des Menschen geordnet nach anatomischen Gesichtspunkten

CD34<sup>+</sup> Fibrozyten besitzen ein blasses Zytoplasma und einen kleinen, länglich geformten Zellkern. Die Länge einer einzelnen Zelle variiert zwischen 60 und 120 µm. Ihre schlanken Zellkörper können durch die langen dünnen bi- oder multipolaren Ausläufer mit benachbarten Fibrozyten über Gap Junctions eng verbunden sein. Auf diese Weise können sie auch zu Mono- und Lymphozyten in Verbindung treten.

Aufgrund dieses histomorphologischen Bildes wurde in der einschlägigen Literatur der Begriff "CD34-positive reticular network" geprägt (Barth et al., 2002a, 2002b; Bucala et al., 1994; Yamazaki u. Eyden, 1996a, 1996b). Die genaue Anzahl und Morphologie dieser Zellen kann in den verschiedenen Organen stark variieren. Beispielsweise weisen drüsige Gewebe wie Mamma, Schilddrüse oder Pankreas um die Drüsen dicht gepackte retikuläre Netzwerke aus CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in ihrem Stroma auf (Barth et al., 2002b, 2005; Ramaswamy et al., 2003; Yamazaki u. Eyden, 1997), wohingegen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in kollagenfaserreichen Geweben einen zu den Fasern parallel angeordneten eher bipolaren Aufbau zeigen (Barth et al., 2002c; Espana et al., 2004). Einen multipolaren Aufbau mit vielen langen zytoplasmatischen Zellfortsätzen zeigen beispielsweise die CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im Stroma des Peritoneums (Jimenez-Heffernan et al., 2004).

### **1.2.3. Die Funktion der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten**

Die Funktionen und Eigenschaften der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten sind vielfältig (Tab. 2) und bis heute immer noch nicht vollständig geklärt. Viele Organe beherbergen zahlreiche ortständige CD34<sup>+</sup> Fibrozyten, die ursprünglich von zirkulierenden CD34<sup>+</sup> Fibrozyten abstammen (Barth u. Westhoff, 2007). Sie exprimieren Adhäsionsmoleküle (CD11a, CD54, CD58) auf ihrer Zelloberfläche (Chesney et al., 1997), die für die Zelladhäsion im Bindegewebe und damit für die Entstehung und Aufrechterhaltung des Stromagerüsts vieler Organe mitverantwortlich sind (Majdic et al., 1994). Als Produzenten von Kollagen I, III und Fibronectin können CD34<sup>+</sup> Fibrozyten den Aufbau und Erhalt der extrazellulären Matrix gewährleisten. Die ersten Studien über CD34<sup>+</sup> Fibrozyten beschäftigten sich mit deren vielfältigen Aufgaben im Wundheilungsprozess (Bucala et al., 1994). Zirkulierende Fibrozyten dringen sehr schnell in geschädigtes Gewebe ein und spielen sowohl in der frühen inflammatorischen als auch in der proliferativen Phase der Wundheilung eine zentrale Rolle: CD34<sup>+</sup> Fibrozyten besitzen spezielle Chemokinrezeptoren (CCR3, CCR5 und CCR7), die eine Migration der zirkulierenden CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in das verletzte Gewebe vermitteln (Abe et al., 2001). Dort sezernieren sie unter den heutzutage bekannten Zellen eine einzigartige Zusammenstellung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Chemokinen (Chesney et al., 1998): Sie produzieren Angiogenese-stimulierende Faktoren (PDGF- $\alpha$ , VEGF, IL-8

und MMP-9) sowie Kolonie-stimulierende Faktoren für Makrophagen, Granulozyten und Fibroblasten (Hartlapp et al., 2001). Zusätzlich werden inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und Interleukine von ihnen gebildet (Chesney et al., 1997). In Endothelien fungiert CD34 auf den Fibrozyten als Ligand für L-Selektin, das die Adhäsion von Leukozyten an den Endothelien und folgend die Invasion in das geschädigte Gewebe vermittelt (Kahn et al., 2003). In geschädigtem Gewebe kommt es zur Freisetzung von TGF- $\beta$ , was sowohl in ortständigen als auch in zirkulierenden CD34<sup>+</sup> Fibrozyten eine Differenzierung zu  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten stimuliert. Durch diese Umwandlung gewinnen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten die Fähigkeit zur Produktion von Kollagenen, was für die proliferative Phase der Wundheilung von großer Bedeutung ist (Bucala et al., 1994). Das im Blut zirkulierende Serum Amyloid P hemmt im zirkulierenden Fibrozyten die Differenzierung zu  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten, so dass eine unerwünschte intravaskuläre Kollagenbildung verhindert wird (Pilling et al., 2003).  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten besitzen zusätzlich kontraktile Aktin- und Myosinfilamente, die bei der Ausrichtung und Organisation von Narbengewebe von Bedeutung sind (Abe R. et al., 2001). Auslöser für eine Freisetzung von TGF- $\beta$  kann vermutlich jeder erdenkliche Gewebeschaden sein. So lassen sich im Stroma von entzündlichen Läsionen, Karzinomen oder auch Verbrennungen  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten nachweisen (Barth u. Westhoff, 2007). Zusätzlich zu ihrer Funktion als Matrixstabilisator spielen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten eine bedeutende Rolle in der direkten Immunabwehr. Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass CD34<sup>+</sup> Fibrozyten aus geschädigtem Gewebe in regionale Lymphknoten einwandern, um dort Antigene über MHC-II und andere kostimulierende Moleküle (CD80,CD86) zu präsentieren und naive T-Zellen zu prägen (Chesney et al., 1997).

Funktion	vermittelt über		
	Rezeptoren	Stimulierende Moleküle	Produkte
<b>Matrixproduktion und -stabilisation</b>	CD11a CD54 CD58	TGF- $\beta$	Kollagen I Kollagen III Prokollagen I Fibronectin Vimentin
<b>Inflammation und Migration</b>	CCR3 CCR5 CCR7	L- Selektin	TNF- $\alpha$ IL 6 GM-CSF M-CSF
<b>Angiogenese</b>			PDGF- $\alpha$ VEGF MMP-9 IL-8 b-FGF
<b>Antigenpräsentation</b>	MHC II CD 80 CD 86	IL1- $\beta$ TGF- $\beta$	MIP-1 $\alpha$ MIP-1 $\beta$

**Tab. 2** Übersicht über Wirkung und Funktion der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten (zusammengestellt aus: Abe et al., 2001; Bucala et al., 1994; Chesney et al., 1997, 1998; Hartlapp et al., 2001; Khan et al., 2003; Quan et al., 2004)

### 1.3. Klinische Relevanz der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten

#### 1.3.1. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in malignen epithelialen Tumoren

In verschiedenen epithelialen Geweben wurde nach Entstehung eines Karzinoms ein charakteristischer Umbau des tumornahen Stromas beobachtet: Das Stroma zeigte einen Verlust der ortsständigen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und einen gleichzeitigen Gewinn an  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten, die im gesunden tumorfreien Stroma nicht nachgewiesen werden können. Die  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten zeigten im Tumorstroma eine willkürliche Anordnung und einen eher plumpen, spindelförmigen Zelleib (Barth et al., 2002a, 2002b, 2002c, 2004, 2005; Nimphius et al., 2006; Ramaswamy et al., 2003; Wessel et al., 2008). Ein Verlust der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten wurde bei Karzinomen der Haut (Humphreys et al., 2000; Illueca et al., 1998; Kirchmann et al., 1994, 1995; Swanson et al., 1998; Wessel et al., 2008), der Mamma (Barth et al., 2002b, 2005; Chauhan et al., 2003; Ebrahimsade et al., 2007; Ramaswamy et al., 2003), der Lunge (Nakayama et al., 2003), des Magen und Dickdarms (Nakayama et al., 2000, 2001), des Pankreas (Barth et al., 2002a), der Harnblase (Nimphius et al., 2006), der

Cervix uteri und des Oropharyngealtrakts (Barth et al., 2002c, 2004) beschrieben.

<b>Histologischer Typ</b>	<b>Lokalisation (Referenzen)</b>
<i>Adenokarzinom</i>	Mamma (Barth et al., 2002b, 2005; Ramaswamy et al., 2003; Chauhan et al., 2003)
	Magen (Nakayama et al., 2001)
	Kolon (Nakayama et al., 2000)
	Pankreas (Barth et al., 2002a)
<i>Plattenepithelkarzinom</i>	Mundhöhle, Pharynx u. Larynx (Barth et al., 2004)
	Cervix uteri (Barth et al., 2002c)
	Lunge (Nakayama et al., 2003)
<i>Urothelkarzinom</i>	Harnblase (Nimphius et al., 2006)
<i>Melanom</i>	Haut (Wessel et al., 2008)
<i>Basalzellkarzinom</i>	Haut (Humphreys et al., 2000; Kirchmann et al., 1994, 1995; Swanson et al., 1998)
<i>Neuroendokrines Karzinom</i>	Pankreas (Barth et al., 2002a)

**Tab. 3** Übersicht über histologischen Typ und Lokalisation der Karzinome, in denen ein Verlust der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im Tumorstroma beschrieben wurde

Verschiedene Studien beschäftigten sich überdies mit dem diagnostischen Wert der immunhistochemischen Darstellung der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in den Karzinomen. In vielen Tumoren ermöglicht die An- oder Abwesenheit der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten eine zuverlässigen Unterscheidung zwischen benignem und malignem Gewebe. So lassen sich das Basalzellkarzinom (Humphreys et al., 2000; Kirchmann et al., 1994), das Kolorektale- und das Magenkarzinom (Nakayama et al., 2000, 2001), das invasive duktales Mammakarzinom (Barth et al. 2002), das kleinzellige Bronchialkarzinom (Nakayama et al., 2003) und verschiedene Plattenepithelkarzinome (Barth et al., 2002, 2004) auf Grund des veränderten Verteilungsmusters der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten von gutartigen Läsionen des entsprechenden Gewebes abgrenzen. Somit kann eine differentialdiagnostische Beurteilung des Gewebes erleichtert werden. Es ist aber zu beachten, dass auch in unspezifischen Entzündungsreaktionen ein Stromaumbau wie der in invasiven Karzinomen beobachtet werden konnte. Aus diesem Grund sollte ein Fehlen dieser Zellen nie als Beweis für Malignität gewertet werden (Chauhan et al., 2003).

### **1.3.2. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in mesenchymalen Tumoren**

CD34<sup>+</sup> mesenchymale Tumorzellen ließen sich in einer Reihe gut- und bösartiger mesenchymaler Tumoren finden, insbesondere in gastrointestinalen Stromatumoren, in Fibroadenomen und Phylloidotumoren der Mamma, in solitären fibrösen Tumoren sowie im Dermatofibrosarkoma protuberans (Barth et al., 2002; Chauhan et al., 2003; Dotto et al., 2006; Haycox et al., 1997; Humphreys et al., 2000; Illueca et al., 1998; Kirchmann et al., 1994, 1995; Lüttges et al., 1999; Min, 2010; Seidal u. Edvardsson, 1999; Silverman u. Tamsen, 1996, 1997; Sircar et al., 1999; Swanson et al., 1998; Yakirevich et al., 1999). Im Gegensatz zu invasiven epithelialen Karzinomen konnte in diesen Tumoren eine gesteigerte Expression des CD34-Stammzellantigens festgestellt werden. Infolgedessen wird eine Abstammung der Tumorzellen von ortständigen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten bzw. eine Ähnlichkeit zu diesen Zellen diskutiert.

### **1.3.3. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten als Auslöser fibrosierender Prozesse**

Den CD34<sup>+</sup> Fibrozyten wird eine Schlüsselrolle bei der Entstehung fibrosierender Krankheitsbilder zugeschrieben. Schmidt und seine Kollegen zeigten, dass zirkulierende Fibrozyten nach Allergenexposition in das Bronchialgewebe eindringen und dort zu  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten differenzieren. Diese bewirken durch Produktion von Kollagen einen fibrotischen Umbau des Lungenstromas und werden somit als Mitverursacher fibrosierender Prozesse in der Lunge betrachtet (Gomperts et al., 2006; Phillips et al., 2004; Schmidt et al., 2003). Bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen werden CD34<sup>+</sup> Fibrozyten als Auslöser pathologischer Fibrosierungsvorgänge angesehen, die über Entzündung, Fibrosierung und Vaskulopathie zur irreversiblen Fibrosierung von Haut und Organen führen können. Bei der Nephrogenen Fibrosierenden Dermathopathie, einer fibrosierenden Erkrankung ähnlich dem Myxödem und der Sklerodermie (Cowper et al., 2001), zeigten Biopsien eine gesteigerte Proliferation von CD34<sup>+</sup> Fibroblasten. Anders ist es bei der Sklerodermie, hier lassen sich im Gewebe weniger CD34<sup>+</sup> Fibrozyten finden als bei gesunden oder an anderen Kollagenosen erkrankten Patienten. Hier wird vermutet, dass CD34<sup>+</sup> Fibrozyten die Zielstruktur der Autoimmunreaktion darstellen (Aiba et al., 1994; Hartlapp et al., 2001).

## **1.4. Karzinome des männlichen Genitaltrakts**

### **1.4.1. Hodenkarzinom**

Hodentumoren stellen das häufigste Malignom bei Männern im Alter zwischen 20 und 40 Jahren dar. Die Inzidenz für Hodenkarzinome beträgt derzeit 7 Neuerkrankungen pro 100.000 männliche Einwohner pro Jahr (Karow u. Lang-Roth, 2009). Nach Angaben des Robert Koch Instituts wird seit 1969 weltweit eine steigende Tendenz beobachtet. Angehörige der weißen Rasse sind wesentlich häufiger davon betroffen (Hautmann u. Hufeland, 2006). Der größte Risikofaktor für Hodenkrebs ist der Hodenhochstand (Maldescensus testis). Histologisch unterscheidet man zwischen Keimzelltumoren, Tumoren des Gonadenstromas oder Mischtumoren. Der Großteil (85-90%) der Hodentumoren sind Keimzelltumoren. Der häufigste Hodentumor ist das Seminom (Böcker et al., 2008).

### **1.4.2. Prostatakarzinom**

Das Prostatakarzinom ist mit 30% das häufigste Malignom des Mannes und tritt typischerweise erst im höheren Lebensalter auf. Die Inzidenz beträgt 60 Neuerkrankungen bei 100.000 Einwohnern pro Jahr. In 95% der Fälle handelt es sich um Adenokarzinome (Karow u. Lang-Roth, 2009). Es gibt starke geographische und ethnische Unterschiede in der Häufigkeit: Schwarze US-Amerikaner haben die höchste Inzidenzrate, am niedrigsten ist sie bei Asiaten (Hoffmann et al., 2001). Es scheinen jedoch auch exogene Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen, da die Inzidenz bei nach Amerika ausgewanderten Asiaten wiederum deutlich höher ist als in Asien selbst. Der größte bekannte Risikofaktor für die Entstehung eines Prostatakarzinoms ist das Alter. Der Entdifferenzierungsgrad von Adenokarzinomen wird nach dem Gleason-Score eingeteilt. Ein GS von 2 bis 4 steht für gut differenzierte Tumoren, die in den ausgewählten Fällen nicht vorkamen. Ein Score von 5 bis 6 beschreibt mittelgradig differenzierte Tumoren und ein Score von 7 bis 10 steht für schlecht- bis entdifferenzierte Tumore (Böcker, 2008).

### **1.4.3. Peniskarzinom**

Das Peniskarzinom ist in der westlichen Welt mit einer Inzidenz von 0,9 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner ein eher seltener Tumor des Mannes, wobei

vor allem die Altersgruppe der über 50-jährigen betroffen ist. In Bezug auf die geographische Häufigkeit lassen sich große Unterschiede feststellen. In Deutschland macht es nur 0,4 bis 0,65% der Tumorerkrankungen des Mannes aus, wohingegen es beispielsweise in Asien bis zu 10%, in Südamerika sogar bis zu 20% der männlichen Krebserkrankungen ausmacht. Risikofaktoren sind vor allem die Smegmaretention bei mangelnder Hygiene und Phimose, aber auch zunehmend HPV-Infektionen. Daher gilt die Zirkumzision weiterhin als effektivste Präventivmaßnahme bezüglich der Entwicklung eines Peniskarzinoms (Schoeneich et al., 1999). Der häufigste histologische Typ ist mit 95% das Plattenepithelkarzinom (Böcker et al., 2008).

## **2. Fragestellung**

Obwohl der Wissenstand über Funktion und Eigenschaften der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in den letzten beiden Jahrzehnten beträchtlich zugenommen hat, sind die Fähigkeiten dieser Zellen in vielerlei Bereichen immer noch ungeklärt. Ihre mögliche pathophysiologische Beteiligung an gut- und bösartigen Neubildungen sowie an entzündlichen Erkrankungen lässt vermuten, dass sie eines Tages eine potentielle Zielstruktur innovativer Therapien darstellen könnten. Daher ist es uns ein Anliegen, das Wissensspektrum über die CD34<sup>+</sup> Fibrozyten zu erweitern.

Nach unserem Wissensstand ist über CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in den Organen des männlichen Genitaltrakts zum heutigen Zeitpunkt nur wenig bekannt. Ziel der hier durchgeführten Studie ist es, einen Überblick über das Vorkommen und die topographische Verteilung von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in Hoden, Prostata, Samenblase, Samenleiter und Penis zu geben. Desweiteren soll die Frage beantwortet werden, ob sich die Verteilung der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten in normalem Gewebe von der in malignem Gewebe des männlichen Genitaltrakts unterscheidet. Die Klärung dieses Sachverhalts ermöglicht die Beurteilung, ob Unterschiede in den Stromazellpopulationen in der histopathologischen Diagnostik von Nutzen sein könnten und welche biologische Bedeutung diesen zukommt. TGF- $\beta$  und SPARC soll insbesondere bei den Karzinomen in die Auswertung miteinbezogen werden, um das Wissen über die Pathomechanismen des Stromaumbaus zu erweitern. Auf Grund der

klinischen Relevanz soll ein besonderes Augenmerk auf Prostata- und Hodenkarzinome gelegt werden.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Geräte**

- DAKO®- Autostainer plus (DakoCytomation, Dänemark)
- Einbettautomat VIP (Sacura, Japan)
- Inkubations- und Trockenschränke (Ehret, Emmendingen)
- Kühl- und Friergeräte (Liebherr, Biberach an der Riss; Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe)
- Laborwaage (Kern & Sohn, Balingen- Frommern)
- Magnetrührer (Janke & Kunkel, Staufen)
- Mikroskopie (Olympus, Hamburg; Zeiss, Göttingen)
- Mikrotom Jung SM 2000 R (Leica, Bensheim)
- Mikrowellengerät (Panasonic, Hamburg)
- pH-Meter (WTW, Weilheim)
- Wasserbäder (GFL, Burgwedel)

#### **3.2. Puffer und Lösungen**

- 10 × PBS-Puffer
- 10 × TBS-Puffer
- 0,05 M Tris-HCl-Puffer
- 10mM Na-Citrat-Puffer
- Trypsinlösung 0,1%
- Aqua dest.

#### **3.3. Untersuchtes Material**

Das Untersuchungsmaterial wurde am Klinikum der Philipps-Universität Marburg im Zeitraum von 1999 bis 2007 intraoperativ entfernt und zur weiteren Diagnostik an das

Institut für Pathologie der Universität Marburg übergeben. Dort wird es routinemäßig 24 Stunden in 4% Formaldehydlösung (Fa. Brenntac) fixiert. Nach makroskopischer Begutachtung erfolgt der Zuschnitt aussagekräftiger Gewebebezirke. Dem folgt die Einbettung in flüssiges Paraffin (Fa. Merck), so dass ein Paraffinblock entsteht. Aus diesem können am Schlittenmikrotom zwischen 3-8µm dicke Schnitte hergestellt werden. Folgend wird es in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Mittels der Lösung Toluol (Fa. Merck) wird der Alkohol wieder entzogen. Danach kann die nötige Routinediagnostik vorgenommen werden. Dies beinhaltet immer eine Färbung der Gewebeschnitte mit Hämatoxylin-Eosin als Übersichtsfärbung und je nach Fragestellung auch andere spezifische Färbemethoden. Die Auswahl der Färbemethode begründet sich meist in der Affinität bestimmter darzustellender Gewebestrukturen zu bestimmten Farbstoffen. Nach Diagnosestellung werden die gefärbten Präparate und Gewebeblöcke archiviert und im Institut für Pathologie der Universität Marburg aufbewahrt.

So konnte bei dieser Arbeit auf archivierte Gewebeproben von insgesamt 60 malignen Tumoren des männlichen Genitaltrakts aus den Jahren 1999 bis 2007 zurückgegriffen werden. Daher entspricht diese Dissertation einer anonymisierten Studie an Archivmaterial.

*Hoden:* In der vorliegenden Studie wurden 14 Seminome des Hodens untersucht (Tab. 4). Das Alter dieser Patienten lag zwischen 21 und 55 Jahren. Zum Zeitpunkt der Diagnose war für die Seminome lediglich das Stadium der Ausdehnung des Primärtumors (pT) nach TNM bekannt (Tab. 4).

Seminom			
Auftrag	Geburtsjahr	Block	TNM-Klassifikation
12837/05	1984	1a	pT1 pNX pMX
12197/05	1976	1a	pT1 pNX pMX
11103/05	1950	1a	pT3 pNX pMX
9664/05	1971	1	pT1 pNX pMX
8895/05	1965	1	pT1 pNX pMX
8650/05	1955	1	pT2 pNX pMX
6770/05	1975	1a	pT1 pNX pMX
3774/05	1976	1a	pT1 pNX pMX
18004/04	1942	1a	pT3 pNX pMX
12757/04	1969	1a	pT1 pNX pMX
11533/04	1970	1a	pT1 pNX pMX
9708/04	1969	1Aa	pT2 pNX pMX
13553/04	1974	1a	pT1 pNX pMX
2678/04	1965	1a	pT1 pNX pMX

**Tab. 4** Übersicht der ausgewählten Seminome unterteilt nach Geburtsjahr und TNM-Klassifikation

*Prostata:* Es wurden 32 Adenokarzinome der Prostata erfasst (Tab. 5). Das Alter dieser Patienten lag zwischen 47 und 75 Jahren. Beim Diagnosezeitpunkt waren die Daten für Gleason-Score, Fehlen bzw. Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen (pN) nach TNM und Ausdehnung des Primärtumors (pT) nach TNM für alle Fälle bekannt.

Prostatakarzinom				
Auftrag	Geburtsjahr	Block	TNM-Klassifikation	Gleason-Score
1665/06	1945	B2b	pT2c pN1 pMX	4+5=9
2904/06	1941	D2, G2b	pT3a pN1 pMX	2+3=5
182/05	1939	G2a, X2	pT3b pN1 pMX	4+5=9
4454/05	1934	2	pT3b pN1 pMX	2+3=5
7546/06	1936	E2a	pT3b pN1 pMX	4+5=9
16206/05	1929	G1b	pT3b pN1 pMX	4+3=7
1711/04	1936	I1b	pT 3b pN1 pMX	2+4=6
4660/04	1940	1	pT4 pN1 pMX	5+3=8
7789/04	1934	F1	pT3b pN1 pMX	3+5=8
9126/04	1941	E1a	pT3b pN1 pMX	5+3=8
16794/04	1957	K1a, X2	pT4 pN1 pMX	4+5=9
17392/04	1956	D1	pT2c pN1 pMX	2+3=5
5359/03	1929	H1b	pT2c pN1 pMX	3+2=5
8173/03	1936	F1b	pT2c pN1 pMX	2+4=6
10098/03	1937	F1, X2	pT3b pN1 pMX	4+5=9
110022/99	1925	F1	pT2a pN1 pMX	2+3=5
13600/99	1926	Gh1	pT3a pN1 pMX	2+3=5
14277/99	1924	11	pT3b pN1 pMX	2+3=5
14976/99	1940	B2, 10	pT3b pN1 pMX	5+4=9
16158/99	1923	x1	pT3b pN1 pMX	4+4=8
11433/06	1938	F1a	pT2c pN0 pMX	2+4=6
4253/06	1933	D1b	pT3b pN0 pMX	5+3=8
4267/06	1940	X1	pT3a pN0 pMX	3+3=6
4475/06	1941	G2a	pT2c pN0 pMX	2+3=5
5081/06	1941	F2b	pT3a pN0 pMX	2+3=5
5079/06	1946	D2	pT2c pN0 pMX	3+4=7
5169/06	1940	E1a	pT2c pN0 pMX	2+3=5
5202/06	1940	F2b	pT2c pN0 pMX	2+3=5
6121/06	1946	X1	pT3a pN0 pMX	2+3=5
6613/06	1938	F2a	pT2c pN0 pMX	2+3=5
6828/06	1939	F2	pT2c pN0 pMX	2+3=5
6467/06	1942	E1	pT2c pN0 pMX	2+3=5

**Tab. 5** Übersicht der ausgewählten Prostatakarzinome unterteilt nach Geburtsjahr, TNM-Klassifikation und Gleason-Score

*Penis:* In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 14 Penisläsionen erfasst: 1

Carcinoma in situ des Plattenepithels, 9 Plattenepithelkarzinome, 3 Urothelkarzinome der penilen Urethra und 1 Malignes Melanom (Tab. 6). Das Alter dieser Patienten lag zwischen 46 und 78 Jahren. Hierfür war zum Zeitpunkt der Diagnose das Grading (G1-G3) für die Plattenepithel- und Urothelkarzinome sowie die Ausdehnung des Primärtumors (pT) nach TNM für alle Fälle bekannt.

Auftrag	Geburtsjahr	Block	Grading	TNM-Klassifikation
<b>Carcinoma in situ</b>				
6064/06	1938	1.SS	G1	<b>Cis</b>
<b>Plattenepithelkarzinome</b>				
17554/05	1938	2a	G2	pT1 pNX pMX
9811/04	1942	2	G2	pT3 pN2 pMX
365/04	1937	2b	G2	pT2 pN0 pMX
9287/02	1942	2A	G1	pT2 pN0 pMX
3675/00	1926	2A	G1	pT2 pN0 pMX
7537/01	1954	1	G1	pT1 pN0 pMX
12258/03	1937	1. SS	G2	pT1 pN0 pMX
3382/00	1922	SS	G1	pT2 pN0 pMX
12296/03	1937	1	G2	pT1 pNX pMX
<b>Urothelkarzinome</b>				
11847/05	1937	2	G2	pT3 pNX pMX
17031/04	1926	2a	G2	pT3 pNX pMX
4444/03	1941	5Aa, 5c	G3/G4	pT4 pNX pMX
<b>Malignes Melanom</b>				
8906/04	1934	2.SS	k.A.	pT3a pN1b pM1

**Tab. 6** Übersicht der ausgewählten Peniskarzinome (und eines Carcinoma in situ) unterteilt nach Geburtsjahr, Grading und TNM-Klassifikation

Normales Gewebe stammte aus Randbereichen sowie aus tumorfreien Abschnitten der 60 ausgewählten Fälle. Hierdurch war eine Beurteilung von normalem Gewebe in Hoden, Prostata, Penis und Samenblase möglich. Die im Rahmen einer Prostatektomie routinemäßig entfernten Samenblasen und Ductus deferentes wurden in 10 Fällen zusätzlich ausgewertet.

Die Auswertungen jedes untersuchten Gewebeabschnittes sind im Tabellarischen Anhang einzeln aufgeführt.

### **3.4. Das Prinzip der Immunhistochemie**

Mit dem Grundprinzip der Immunhistochemie befassten sich Forscher schon seit den siebziger Jahren. In Mitte der achtziger Jahre wurde die Immunhistochemie auf Grund standardisierter Techniken in die Routine der histopathologischen Diagnostik aufgenommen. Man nutzt die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von bestimmten Antigenen im histologischen Gewebe sichtbar zu machen. Wenn man einen Gewebeschnitt mit Antikörpern benetzt, werden diese Antikörper an der Stelle binden, wo sich das passende Antigen befindet. Dazu eignen sich besonders solche Antigene, die nur in bestimmten Zelltypen oder nur in bestimmten Geweben auftreten. Um diese Antigen-Antikörper Bindung nachzuweisen, muss man die Antikörper sichtbar machen. Dafür stehen verschiedene Methoden zur Verfügung (Lang, 2006). In dieser Studie wurde nach der ABC-Peroxidase Methode vorgegangen.

#### **3.4.1. Schnittherstellung und Vorbereitung der Gewebe**

Aus den aus dem Archiv ausgewählten Gewebeblöcken wurden mit einem Schlittenmikrotom der Familie Leica etwa 5 µm dicke Schnitte hergestellt. Die Schnitte wurden nach Zwischenlagerung in einem kühlen Wasserbad auf Objektträger (SuperFrostPlus, Fa. Menzel-Gläser) aufgezogen und durch kurzes Eintauchen in ein 55°C warmes Wasserbad gedehnt. Anschließend stellte man die Schnitte über Nacht in einen 60°C warmen Trockenofen. Am nächsten Tag folgte die Entparaffinisierung der Schnitte. Hierfür wurden die Schnitte jeweils 3×10 Minuten in Xylol eingelegt und dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100%-, 96%-, 70%- und 50%iges Ethanol) rehydriert.

#### **3.4.2. ABC-Peroxidase-Methode**

Als erster Schritt erfolgte die Methanolblockade. Hierzu stellte man die Schnitte für 30 Minuten in 200ml Methanol unter Zugabe von 6ml 30%iges Wasserstoffperoxid. Dies bewirkte eine irreversible Blockade der endogenen Peroxidase, so dass ein späteres Anfärben spezifischer Strukturen mit künstlich zugesetzter Peroxidase ermöglicht wurde. Nach Spülen mit Aqua dest. begann man mit der Vorbehandlung der Schnitte. Sinn dieser Vorbehandlung war eine Auflockerung des Gewebes und die Demaskierung der Antigene im Gewebe. So konnten die durch die Formalinfixierung verborgenen

Antigene wieder darstellbar gemacht werden. Die Methode der Vorbehandlung und die Verdünnung ist abhängig vom dem jeweils verwendeten Antikörper (Tab. 7).

*Mikrowellenvorbehandlung:* Die Schnitte wurden unter Zugabe von 4°C-kaltem 10mM Na-Citrat-Puffer (pH=6,0) in spezielle Copeline-Gefäße (Fa. Sigma) gestellt und für 3×5 Minuten in der Mikrowelle bei 600 Watt erhitzt. Zwischen den Erhitzungsintervallen musste der Citratpuffer immer wieder aufgefüllt werden, um eine Austrocknung der Schnitte zu vermeiden. Nach 20 minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurde mit TBS gespült.

*Gewebeandau mit 0,1% Trypsinlösung:* Die Schnitte wurden in 0,1% Trypsinlösung gegeben, für 15 Minuten bei 37°C im Ofen inkubiert und hiernach mit Aqua dest. gespült.

Die anschließenden Arbeitsschritte wurden mit Hilfe des Färbesystems Sequenza (Fa. Shandon) vollzogen. Dafür wurden die Objektträger vorsichtig mit der Seite des vorbehandelten Gewebes auf speziellen Coverplates befestigt und mit PBS-Puffer gespült. So entstand zwischen Coverplates und Schnitten ein Kapillarspalt, der durch den entstehenden Sog die Verteilung der verschiedenen Substanzen auf die Schnitte erleichterte. Vor Behandlung mit den Primärantikörpern musste eine 20-minütige Vorinkubation mit Normalserum vom Pferd (Fa. Vector) erfolgen, um das endogene Biotin im Bindegewebe zu blockieren und so einer unspezifischen Hintergrundfärbung des Bindegewebes vorzubeugen. Nach einer einstündigen Inkubation des jeweiligen Primärantikörpers (Tab.4) bei 37°C wurde erneut mit PBS gespült. Hiernach konnte der Sekundärantikörper aufgetragen werden, der an den entsprechenden Primärantikörper bindet. Die Herkunftsspezies des Primärantikörpers muss der des Sekundärantikörpers entsprechen. Wir verwendeten Sekundärantikörper gegen Maus (anti-mouse IgG; Fa. Vector) oder Kaninchen (anti-rabbit IgG; Fa. Vector). An den Sekundärantikörper ist wiederum Biotin gekoppelt, das später für die Farbreaktion von Bedeutung ist.

Nach 30 Minuten und erneutem Spülen mit PBS wurde der sogenannte ABC-Komplex (ABC-Elite Kit; Fa. Vector) auf die Coverplates gegeben. Bei der ABC-Methode wird die starke Bindung zwischen Biotin und Avidin ausgenutzt. Das an eine Peroxidase gebundene Avidin ist ein kleines Protein mit vier Bindungsstellen für Biotin, von denen aber nur zwei besetzt werden können. So kann das Avidin an Biotin-Gruppen des Sekundärantikörpers binden. Daher kann man den Sekundärantikörper auch als

Brückenantikörper bezeichnen. Dadurch werden pro gebundenem Primärantikörper viele Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe an den Schnitt gekoppelt. Um die Reaktion des Primärantikörpers mit dem eigentlich gesuchten Antigen sichtbar zu machen, musste zusätzlich mit einem Chromogen gearbeitet werden, das mit der Peroxidase des Avidins ein Farbprodukt bildet und somit den Nachweis des Antigens ermöglicht. Dafür verwendeten wir einen Ansatz aus 200ml Tris-HCl-Puffer und 200mg des Chromogens DAB (Fa. Sigma). Sobald sich die Schnitte in der Lösung befanden, wurde 10%iges Wasserstoffperoxid hinzugefügt. Als sich nach 5-10 Minuten eine kräftige Braunfärbung einstellte, wurde die Reaktion durch Spülen mit Aqua dest. gestoppt. Dann führen wir mit der Gegenfärbung mit Mayers Hämalaunlösung (Fa. Merck) mit anschließendem Bläuen in Leitungswasser fort. Im Anschluß daran erfolgte die nötige Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%-, 70%-, 96%- und 100%iges Ethanol) und das Einlegen der Schnitte in Xylol. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit Entellan (ProSciTech) eingedeckt, so dass diese bei entsprechend dunkler Lagerung für einige Jahre konserviert werden können.

<b>Primärantikörper (Clon)</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Vorbehandlung</b>	<b>Verdünnung</b>
CD34 (Qbend10) monoklonal	Dako, Hamburg, Deutschland	Mikrowelle 3×5 min, 600 W	1:50
SPARC monoklonal	Novocastra, UK	Mikrowelle 3×5 min, 600 W	1:40
α-SMA (ASM-1) monoklonal	Progen, Heidelberg, Deutschland	0,1% Trypsinlösung 15 min bei 37°C	1:200
TGF-β monoklonal	Novocastra, UK	Mikrowelle 3×5 min, 600 W	1:40

**Tab. 7** Primärantikörper und Gewebepreparation für die Immunhistochemie

### 3.4.3. Doppelfärbung

Eine Doppelfärbung ist eine gleichzeitige oder aufeinander folgende Färbung zweier Antigene innerhalb eines Präparats, so dass eine genauere Übersicht über die Verteilung der beiden angefärbten Strukturen erlangt werden kann. In den von uns ausgewählten Gewebeschnitten wurden CD34 und α-SMA zusätzlich mittels Doppelfärbung

dargestellt. Die Inkubationen bei den Doppelfärbungen erfolgten mit Hilfe des DAKO®-Autostainer plus-Gerätes (DakoCytomation). Der erste Schritt dieser Färbung, die Darstellung von CD34, entspricht dem Prinzip der Einfachfärbungen mittels der ABC-Methode. Nach manueller Blockierung der endogenen Peroxidase und ausreichender Mikrowellenvorbehandlung erfolgte die Inkubation des CD34 Primärantikörpers in dem Autostainer-Gerät. Nach anschließendem Spülen folgte dann die Inkubation der Schnitte mit der Lösung der Flasche A des ChemMate Detection Kit Peroxidase/DAB (DakoCytomation). Darin waren der biotinylierte Sekundärantikörper, das an Peroxidase konjugierte Streptavidin und DAB als Chromogen enthalten. Letzteres bewirkte auch hier die Braunfärbung des CD34 Antigens. Nach erneuter Mikrowellenbehandlung wurden die Schnitte nun mit dem monoklonalen Antikörper gegen  $\alpha$ -SMA behandelt (Tab. 4). Für die Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde das gleiche ChemMate Detection Kit benutzt wie oben beschrieben, nur die Farbreaktion wurde mit HistoGreen (Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland) als Chromogen erzeugt. Dadurch färbten sich  $\alpha$ -SMA kräftig grün. Die Gegenfärbung wurde mit Nuclear Fast Red durchgeführt. Zur Kontrolle der erzielten Antigennachweise ersetzten wir den CD34-Antikörper des ersten Färbeschrittes durch einen anderen für uns nicht relevanten Antikörper, wobei die restlichen Schritte unverändert blieben. Ebenso verfahren in einem neuen Kontrollversuch mit dem Primärantikörper des zweiten Färbeschrittes. Beide Kontrollen zeigten keine Positivität bezüglich der nachzuweisenden Antigene.

#### **3.4.4. Modus zur Auswertung immunhistochemischer Präparate**

Einzelfärbungen der Antikörper CD34,  $\alpha$ -SMA, SPARC und TGF- $\beta$  stellen sich im Gewebe braun dar. In der Doppelfärbung zeigt sich  $\alpha$ -SMA grün und CD34 braun. Für die semiquantitative Auswertung immunhistochemischer Reaktionen wurde ein Modus festgelegt, nach dem alle 60 Fälle untersucht wurden. Da auch positive Reaktionen in Tumorzellen oder Epithelzellen möglich sind, sollen diese ggf. auch mit aufgeführt werden. Vier Kategorien beschreiben, in welchem prozentualen Anteil des Stromas bzw. der Tumor- oder Epithelzellen eine positive Reaktion für einen bestimmten Antikörper nachzuweisen ist, unabhängig von der Intensität der jeweiligen Färbungen. Präparate, die keinerlei Reaktion oder nur in einzelnen Zellen in weniger als 10 % eine positive

Reaktion zeigen, fallen in die Kategorie “negativ“. Als “positiv“ gelten Präparate, die in einem relevanten Anteil eine positive Reaktion zeigen. Je nach Anteil erfolgt eine Unterteilung in fokal positiv (10% - 49%), überwiegend positiv (50% - 89%) und einheitlich positiv (90% - 100%). Für eine vereinfachte Übersicht werden in den Ergebnistabellen die quantitativ höchsten Anteile durch eine fette Druckweise hervorgehoben (Tab. 8).

<b>Nomenklatur</b>	<b>Zeichen</b>	<b>Anteil der Stromazellen/ Epithelzellen/ Tumorzellen mit positiver Reaktion</b>
Negativ	-	0% - 9%
Fokal positiv	- / +	10% - 49%
Überwiegend positiv	+ / -	50% - 89%
Einheitlich positiv	+	>90%

**Tab. 8** *Modus zur Auswertung immunhistochemischer Präparate*

## 4. Ergebnisse

### 4.1. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten im Hoden

#### 4.1.1. Normaler Hoden

*CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten:* In allen untersuchten Fällen bildeten CD34<sup>+</sup> Fibrozyten ein dichtes retikuläres Netzwerk um das Keim- und Stützepithel der Tubuli seminiferi sowie um die Leydigzellen im Interstitium. Die Tubuli wurden von einer zarten Lamina Propria umhüllt, deren innerer Anteil aus mehreren Schichten konzentrisch angeordneter  $\alpha$ -SMA-reaktiver Myofibroblasten gebildet wurde. Diese besaßen lange schmale Zellfortsätze, die sich um die Tubuli herumschlängten. Der äußere Anteil der Lamina Propria bestand aus konzentrisch angeordneten CD34<sup>+</sup> Fibrozyten. Die höchste Dichte an CD34<sup>+</sup> Fibrozyten konnte konstant in direkter Nähe zu arteriellen, weniger auch zu venösen Gefäßen ausgemacht werden. Im Stroma des Hoden zeigten CD34<sup>+</sup> Fibrozyten einen bipolaren, gelegentlich auch multipolaren Aufbau mit einem kleinen Zelleib und auffällig kleinen Zellkernen. Die Zytoplasmafortsätze dieser Zellen schienen mit denen anderer Fibrozyten in Kontakt zu stehen, so dass ein Bild eines retikulären Netzwerkes entstand. Zudem zeigten Gefäß- und Lymphendothelien eine typische starke Reaktion mit CD34. Von außen wurde das Hodengewebe von einer kräftigen Tunica albuginea bedeckt, die sich in erster Linie aus parallel verlaufenden  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten zusammensetzte. Dazwischen fanden sich vereinzelt im Vergleich zu den Myofibroblasten kräftige glatte Muskelfasern. Gelegentlich ließen sich insbesondere in den inneren Schichten der Tunica albuginea CD34<sup>+</sup> Fibrozyten darstellen, die sich parallel zu den Myofibroblasten anordneten. Ausgehend von der Tunica albuginea zogen septenartig Bindegewebsplatten ins Organinnere. Diese wurden allerdings nicht aus  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten, sondern aus gleichgerichtet verlaufenden CD34<sup>+</sup> Fibrozyten gebildet. Neben Tunica albuginea und Lamina Propria zeigte die glatte Muskulatur der Gefäße eine starke charakteristische Reaktion mit Glattmuskelaktin.

		CD34				α-SMA			
		-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Stroma</b>	<i>n</i> (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>14</b> <b>(100)</b>	0 (0)	<b>14</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)
<b>Epithel</b>	<i>n</i> (%)	<b>14</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>14</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)

**Tab. 9** *Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Epithelzellen des normalen Hodens mit CD34 und α-SMA (n (%))*

*TGF-β und SPARC:* In allen untersuchten Fällen ließ sich in Keimepithel, Sertolizellen und Leydigzellen eine starke intrazelluläre Reaktion mit SPARC-Antikörpern darstellen. Das übrige Stroma des normalen Hodens war mit Ausnahme der Gefäßendothelien sowie weniger Zellen in der Tunica albuginea negativ für SPARC.

TGF-β konnte in den untersuchten Fällen ausschließlich in Leydigzellen nachgewiesen werden. Stroma, Keim- und Stützepithel zeigten hierfür keinerlei Reaktivität.

		SPARC				TGF-β			
		-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Stroma</b>	<i>n</i> (%)	<b>14</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>14</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Epithel</b>	<i>n</i> (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>14</b> <b>(100)</b>	0 (0)	<b>14</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)

**Tab. 10** *Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Epithelzellen des normalen Hodens mit SPARC und TGF-β (n (%))*

#### 4.1.2. Seminom des Hodens

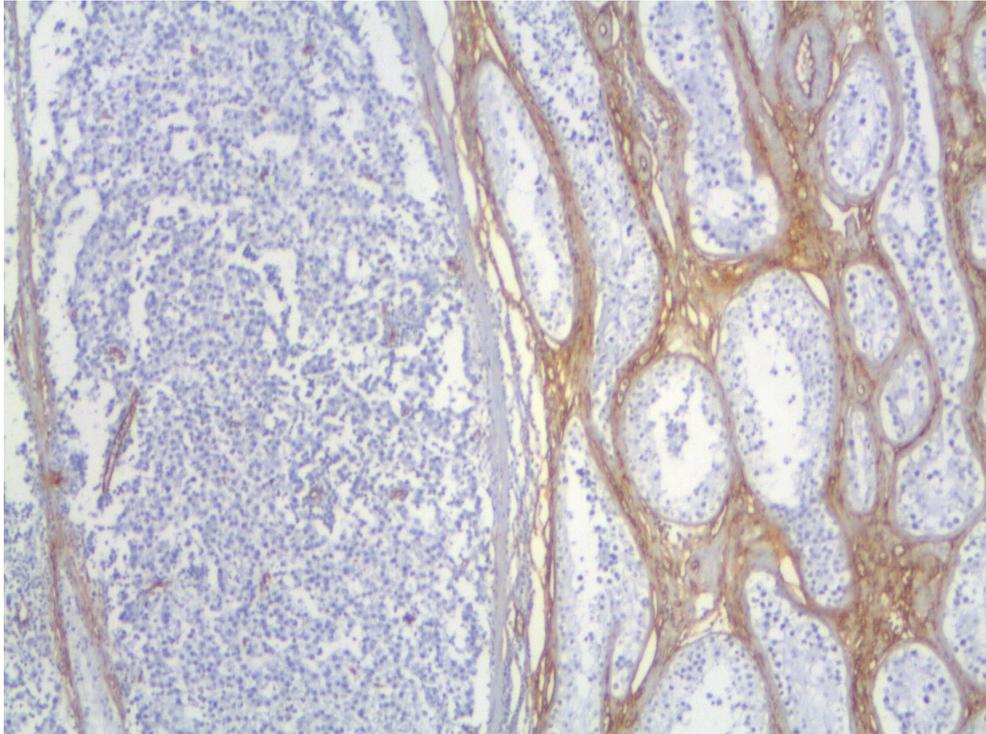
*CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und α-SMA-reaktive Myofibroblasten:* Im Stroma des Seminoms kam es in allen untersuchten Fällen zu einem Verlust von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten. In 9 von 14 Fällen zeigte sich ein kompletter Verlust dieser Zellen, so dass sich lediglich Gefäßendothelien CD34-positiv darstellten. In den übrigen 5 Fällen ließen sich in weniger als 20% des Tumorstromas fokale Ansammlungen von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten nachweisen, wobei dies vornehmlich Areale in direkter Nähe zu normalem Hodengewebe oder zu großen arteriellen Gefäßen betraf. Hier nahm die Dichte dieser Zellen mit zunehmendem Abstand von den genannten Strukturen ab. Eine Assoziation zwischen dem Verlust dieser Zellen und der Lokalisation im Hodengewebe konnte nicht beobachtet werden. Komplementär dazu war in allen 13 untersuchten Fällen ein

Auftreten von  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten im Großteil des Tumorstromas zu beobachten (Tab. 11). Die zumeist ballenartig angeordneten Tumormassen wurden häufig von einer kräftigen Schicht aus zahlreichen, parallel angeordneten  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten umgeben, die augenscheinlich an die Stelle der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten getreten waren. Anhand der Doppelfärbung ließ sich verifizieren, dass es sich hierbei um 2 voneinander verschiedene Zellidentitäten handelte. Es schien, als bildeten die Bündel aus  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten einen dichten Wall zwischen Seminomzellen und normalem Hodengewebe. Innerhalb der Tumormassen stellen sich ebenso diffus zerstreute, zarte Septen aus  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten dar.

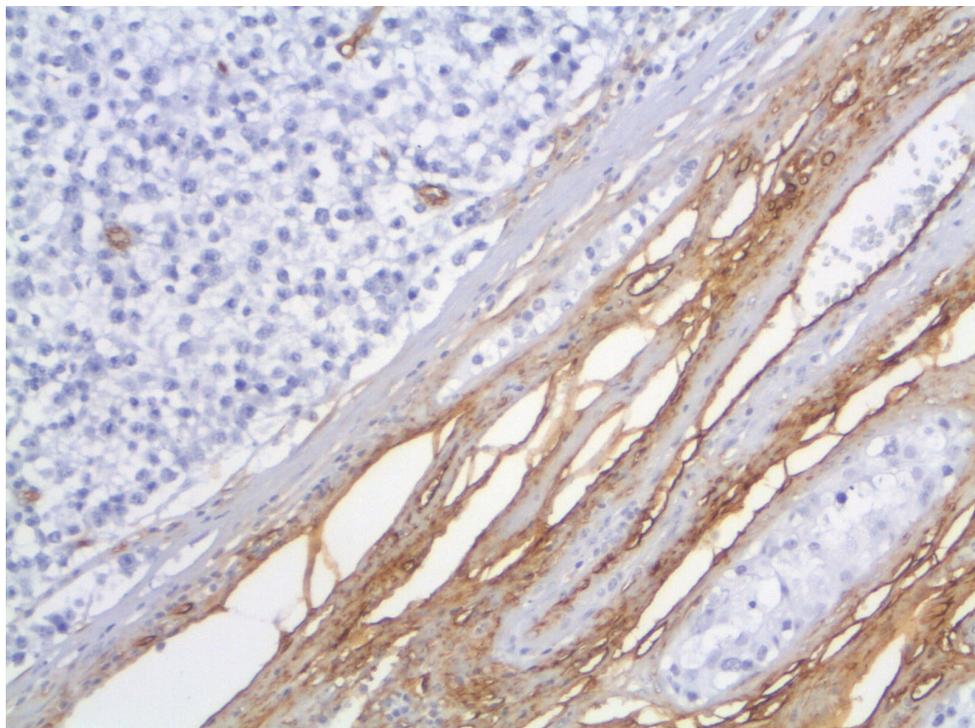
Im an die Tumorfront angrenzenden normalen Gewebe fanden sich dicht gelagerte CD34<sup>+</sup> Fibrozyten, dagegen ließen sich hier mit Ausnahme der inneren Lamina Propria keine  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten nachweisen.

	CD34					$\alpha$ -SMA			
	-	-/+	+/-	+		-	-/+	+/-	+
<b>Tumorstroma</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>9</b>
<i>n</i>	<b>(64)</b>	<b>(36)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>		<b>(0)</b>	<b>(7)</b>	<b>(29)</b>	<b>(64)</b>
<i>(%)</i>									
pT1	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>
<i>n</i>	<b>(60)</b>	<b>(40)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>		<b>(0)</b>	<b>(10)</b>	<b>(30)</b>	<b>(60)</b>
<i>(%)</i>									
pT2/ pT3	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<i>n</i>	<b>(75)</b>	<b>(25)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>		<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(25)</b>	<b>(75)</b>
<i>(%)</i>									
<b>Tumorzellen</b>	<b>14</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>		<b>14</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>n</i>	<b>(100)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>		<b>(100)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>
<i>(%)</i>									
pT1	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>		<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>n</i>	<b>(100)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>		<b>(100)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>
<i>(%)</i>									
pT2/ pT3	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>		<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>n</i>	<b>(100)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>		<b>(100)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>
<i>(%)</i>									

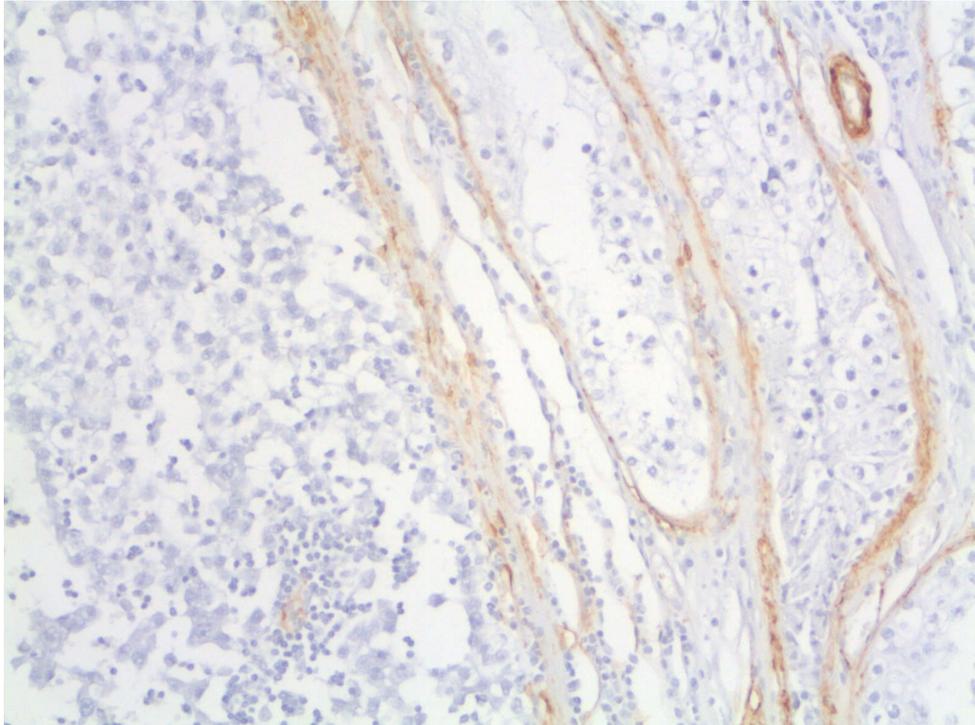
**Tab. 11** Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 14 Seminomen des Hodens mit CD34 und  $\alpha$ -SMA in Abhängigkeit von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors (pT1 und pT2/3) nach TNM (*n* (%))



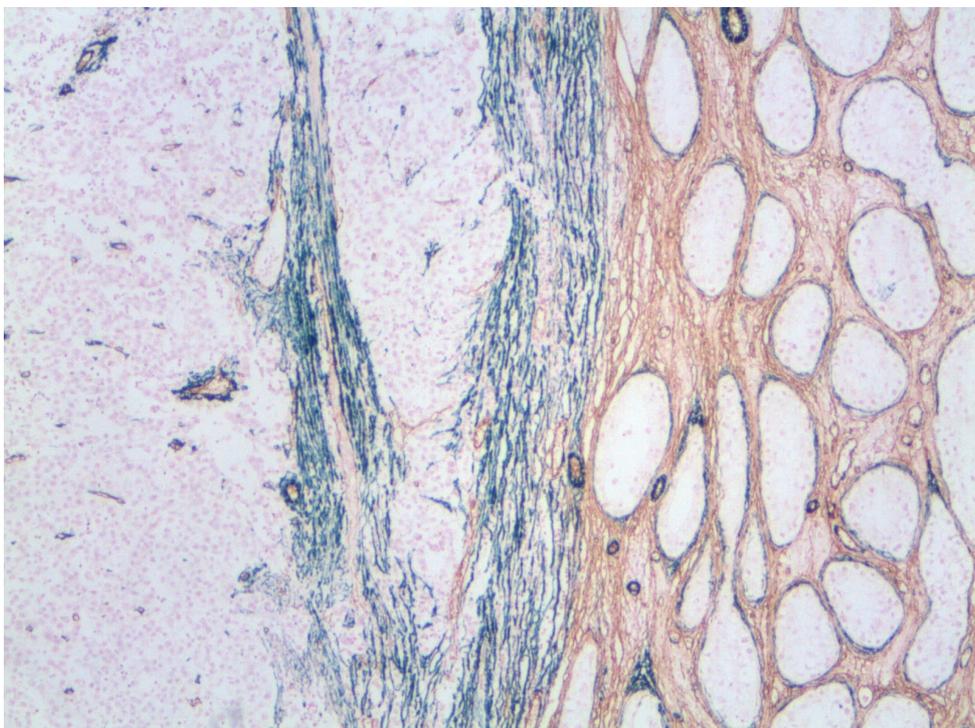
**Abb. 2** Immunhistochemie CD34: CD34<sup>+</sup> Fibrozyten bilden im normalen Hoden ein dichtes retikuläres Netzwerk um die Tubuli seminiferi sowie um die Leydigzellen im Interstitium (rechts). Das Seminom hingegen (links) zeigt keine CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in seinem Stroma.



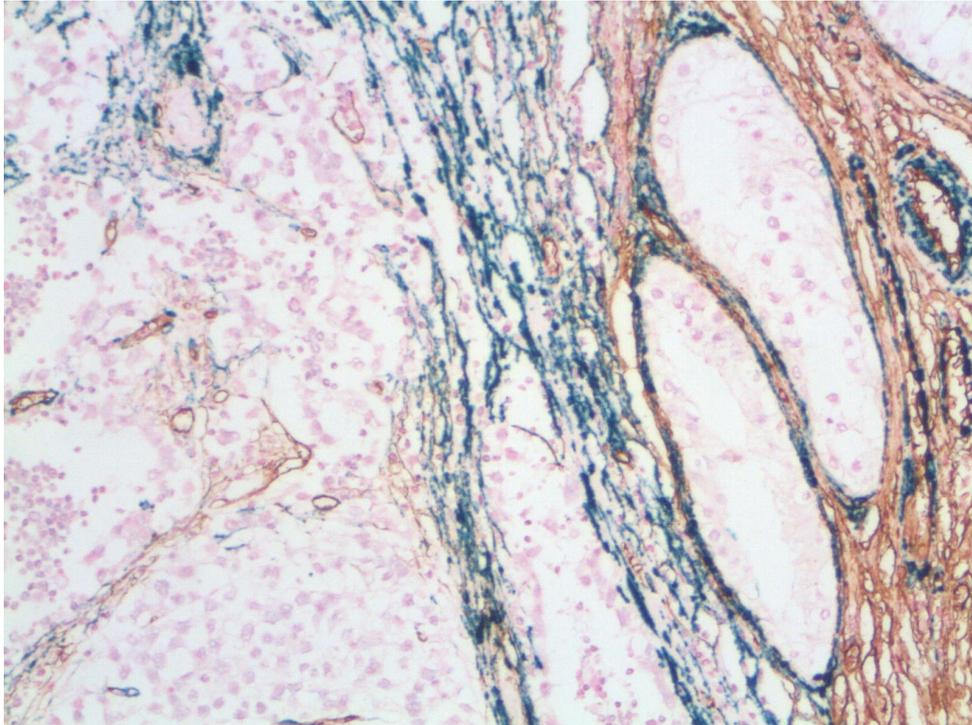
**Abb. 3** Immunhistochemie CD34: Das Stroma nahe der Seminomzellen (links) weist im Vergleich zum normalen Hoden (rechts) keine CD34<sup>+</sup> Fibrozyten mehr auf. Nur Gefäßendothelien reagieren im Tumorstroma positiv für CD34.



**Abb. 4** Immunhistochemie  $\alpha$ -SMA: In der Lamina Propria des normalen Hoden (rechts) zeigen sich konzentrisch angeordnete  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten. Auch die Myoepithelien der Gefäße sind positiv für  $\alpha$ -SMA (rechts oben).



**Abb. 5** Immunhistochemische Doppelfärbung CD34 und  $\alpha$ -SMA: Abrupter Verlust der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im Stroma des Seminoms (links). Dafür erscheinen zahlreiche parallel angeordnete  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten im Tumorstroma. Im normalen Hoden (rechts) ist das Stroma reich an CD34<sup>+</sup> Fibrozyten.

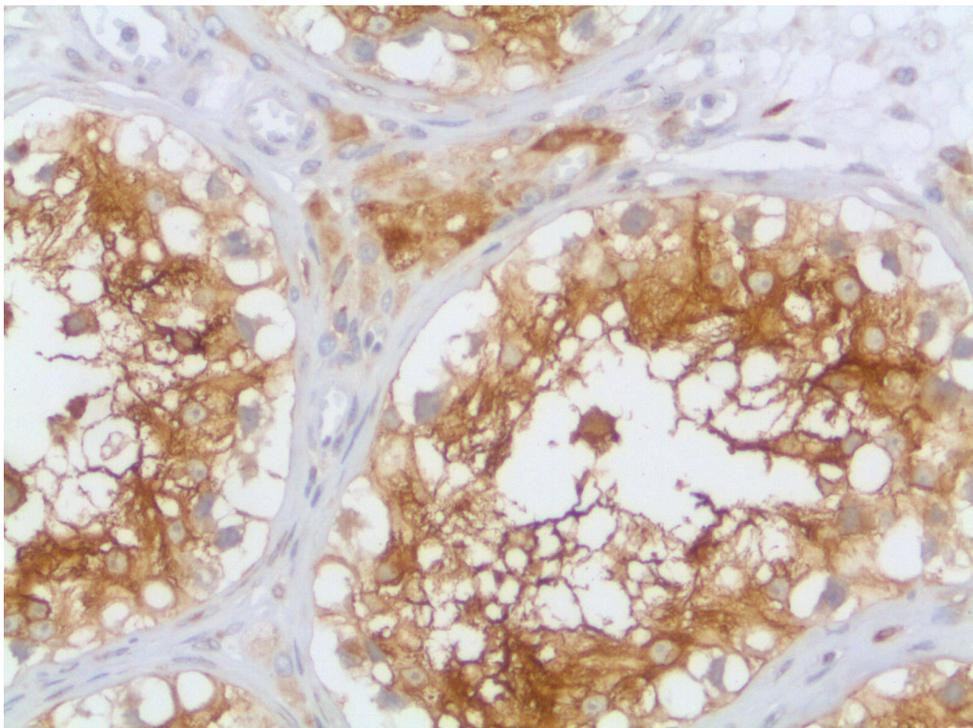


**Abb. 6** Immunhistochemische Doppelfärbung von CD34 und  $\alpha$ -SMA: Es stellen sich zwei verschiedene Zelltypen nebeneinander dar:  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten im Tumorstroma (mitte) und CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im normalen Stroma des Hodens (rechts). Auch die Lamina Propria und die Myoepithelien der Gefäße des normalen Hodens sind positiv für  $\alpha$ -SMA.

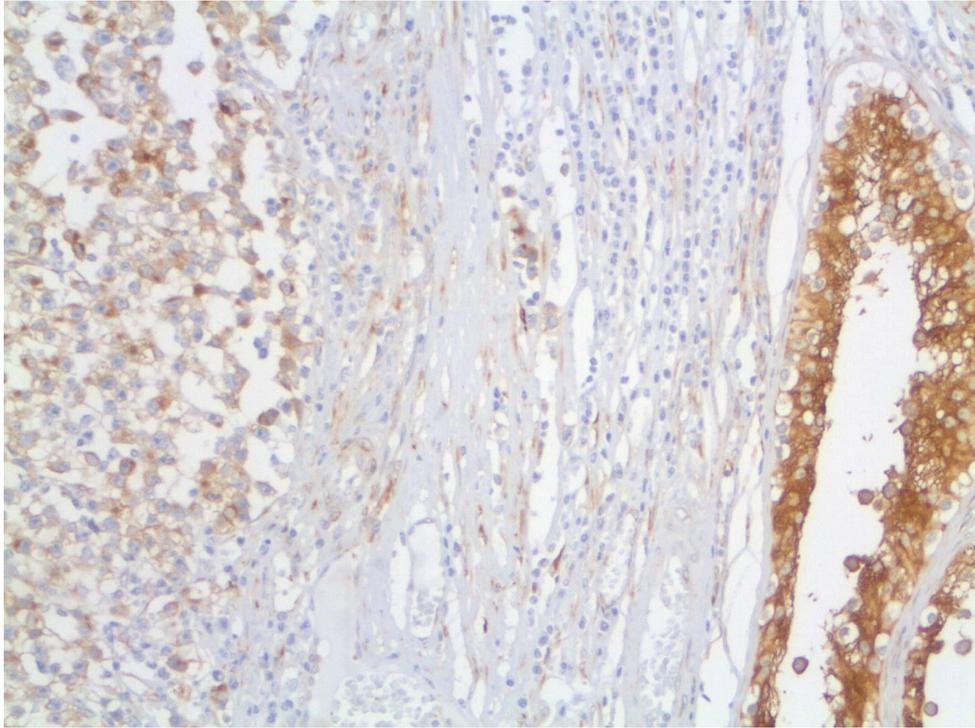
*TGF- $\beta$*  und SPARC: SPARC zeigte in Seminomen eine sehr heterogene Reaktion. In 10 der 14 Fälle konnte man im Tumorstroma in unterschiedlich hohem Anteil SPARC-positive Zellen nachweisen, wobei davon nur in 2 dieser 10 Fälle eine überwiegend positive Reaktion feststellbar war (Tab. 12). Die restlichen Fälle zeigten lediglich fokale Ansammlungen oder gar keine Reaktion. Eine positive Reaktion der Seminomzellen selber konnte in 6 von 14 Fällen gezeigt werden. In diesen Fällen war die Mehrheit der Tumorzellen positiv. Eine Korrelation zwischen intrazellulärer und stromaler Reaktion bestand nicht. Im Stadium pT1 ließen sich intrazellulär in 3 von 10 Fällen eine positive Reaktion für SPARC nachweisen, in höheren Stadien in 3 von 4 Fällen. Für TGF- $\beta$  wies das Stroma der Seminome keinerlei Reaktivität auf, lediglich Leydigzellen zeigten wie im normalen Hoden eine positive Reaktion mit dem verwendeten Antikörper.

		SPARC				TGF- $\beta$			
		-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Tumorstroma</b>	<i>n</i> (%)	4 (29)	<b>8</b> <b>(57)</b>	2 (14)	0 (0)	<b>14</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
pT1	<i>n</i> (%)	3 (30)	<b>6</b> <b>(60)</b>	1 (10)	0 (0)	<b>10</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
pT2/ pT3	<i>n</i> (%)	1 (25)	<b>2</b> <b>(50)</b>	1 (25)	0 (0)	<b>4</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Tumorzellen</b>	<i>n</i> (%)	<b>8</b> <b>(57)</b>	0 (0)	1 (7)	5 (36)	<b>14</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
pT1	<i>n</i> (%)	<b>7</b> <b>(70)</b>	0 (0)	0 (0)	3 (30)	<b>10</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
pT2/ pT3	<i>n</i> (%)	1 (25)	0 (0)	1 (25)	<b>2</b> <b>(50)</b>	<b>4</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)

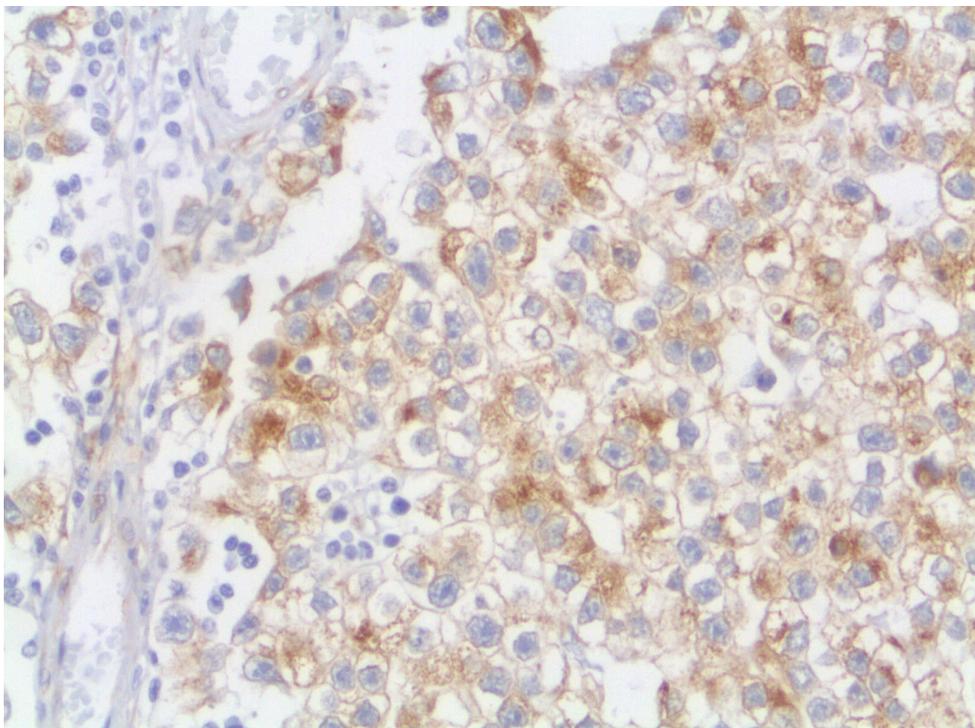
**Tab. 12** *Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 14 Seminomen des Hodens mit SPARC und TGF- $\beta$  in Abhängigkeit von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors (pT1 und pT2/3) nach TNM (n (%))*



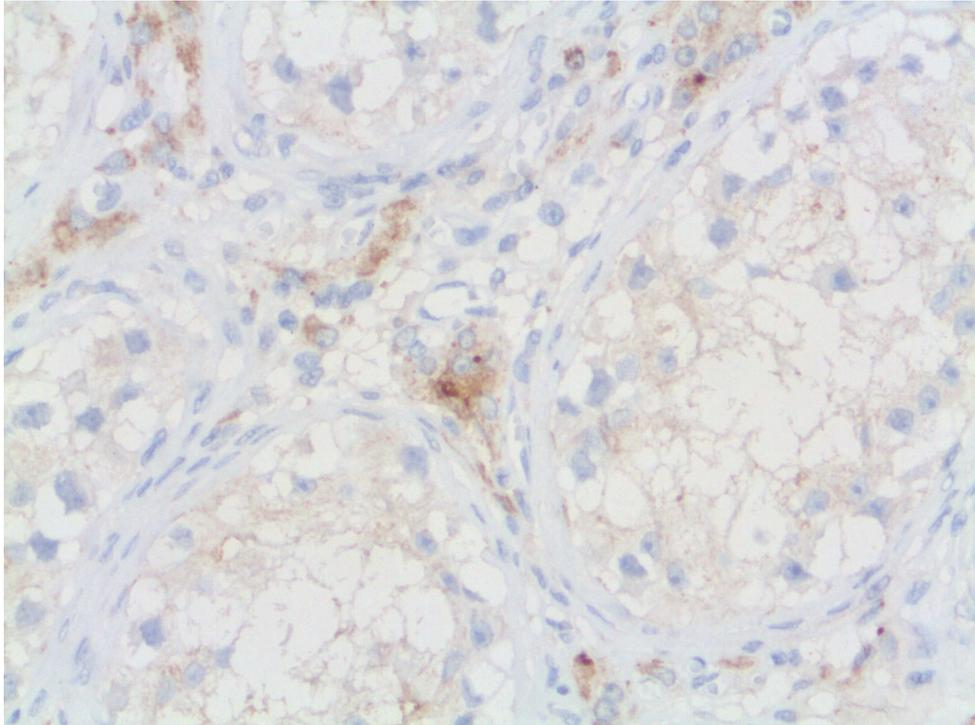
**Abb. 7** *Immunohistochemie SPARC: Im normalen Hoden zeigen Keimepithel und Sertolizellen der Tubuli Seminiferi sowie Leydigzellen im Interstitium eine spezifische Reaktion für SPARC. Das Stroma hingegen zeigt keine Reaktion für den verwendeten Antikörper.*



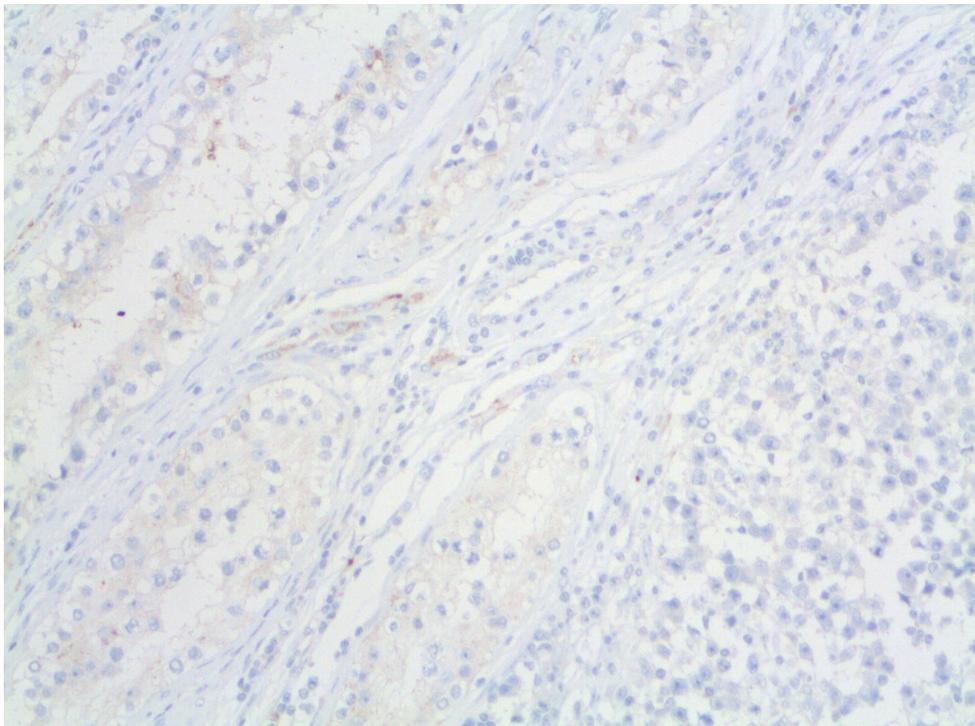
**Abb. 8** Immunhistochemie SPARC: Die Zellen des Seminoms (links) zeigen eine positive Reaktivität für SPARC. Das Tumorstroma hingegen weist nur in einzelnen Fällen eine positive Reaktivität auf. Endothelien zeigen sich positiv für SPARC.



**Abb. 9** Immunhistochemie SPARC: Die Zellen des Seminoms zeigen intrazellulär eine starke Reaktivität für SPARC. Das Stroma nahe des Tumors (links) reagiert in nur wenigen Fällen mit dem verwendeten Antikörper.



**Abb. 10** Immunhistochemie TGF- $\beta$ : Leydigzellen zeigen konstant eine positive Reaktivität für TGF- $\beta$ . Stroma, Keim- und Stützepithel zeigen hierfür keinerlei Reaktion.



**Abb. 11** Immunhistochemie TGF- $\beta$ : Für TGF- $\beta$  weist das Stroma der Seminome (links oben) keinerlei Reaktivität auf. Im normalen Hoden (rechts) reagieren lediglich Leydigzellen positiv.

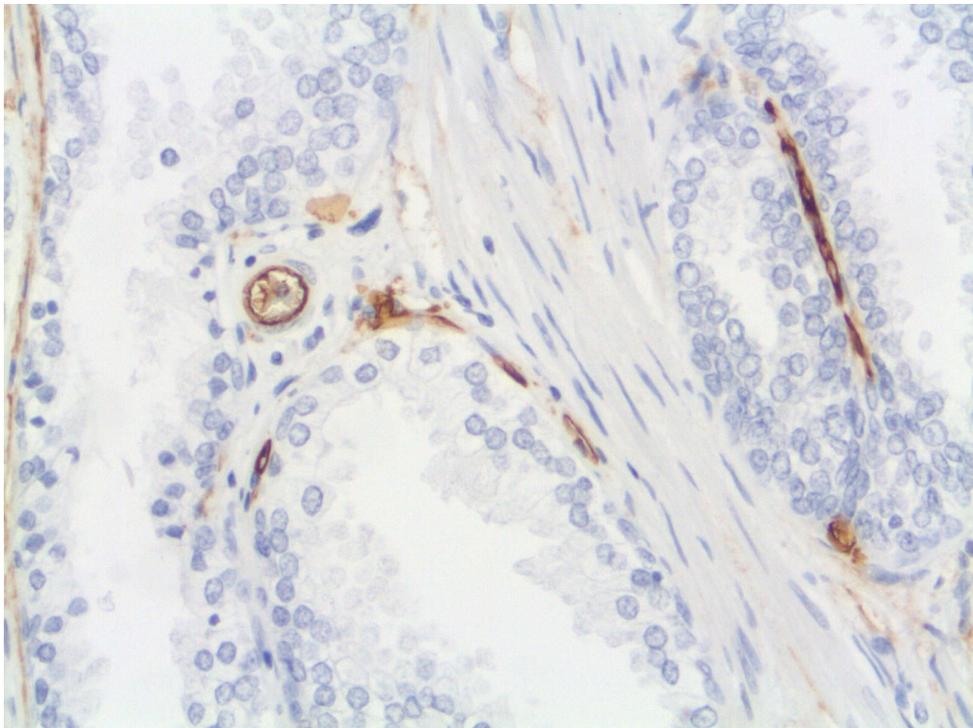
## **4.2. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten in Prostata, Samenblase und Ductus deferens**

### **4.2.1 Normale Prostata**

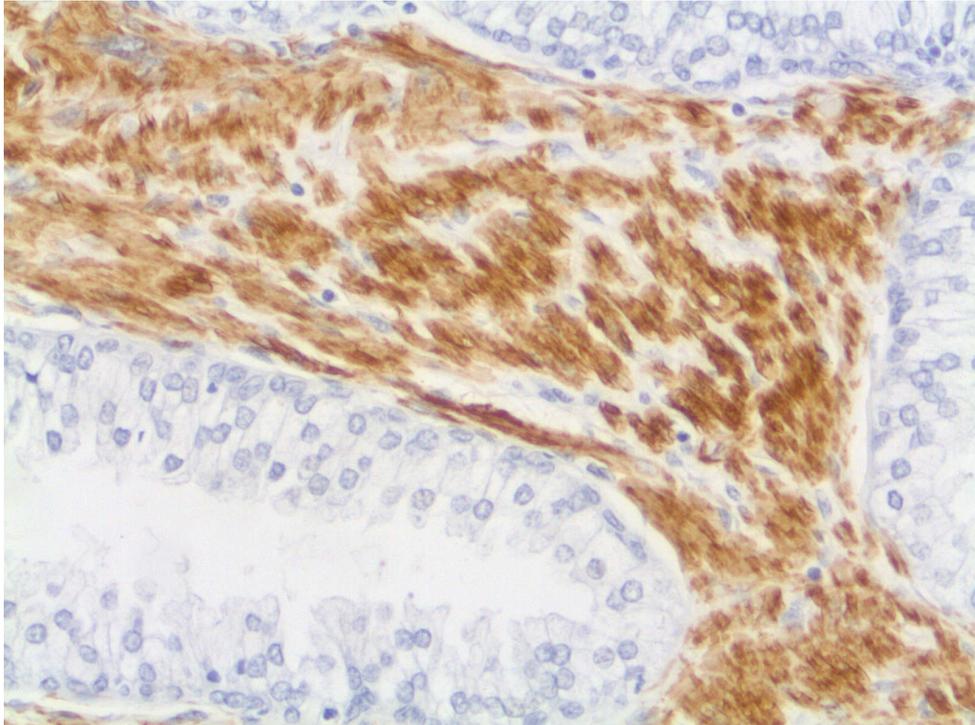
*CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten:* CD34<sup>+</sup> Fibrozyten konnten im Stroma der normalen Prostata nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. Die Prostata bestand in erster Linie aus  $\alpha$ -SMA-positiver glatter Muskulatur, die mit der fibromuskulären Organkapsel zusammenhing. Im Stroma zwischen der Muskulatur waren keine CD34<sup>+</sup> Fibrozyten zu beobachten. Zwischen der glatten Muskulatur zeigten sich Prostatadrüsen, in deren Nähe nur in 3 von 30 Fällen fokale Ansammlungen von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten nachweisbar waren (Tab. 13). Diese fand man parallel zur Basalmembran angeordnet in direkter Nähe zum Prostataepithel. Unterschiede bezüglich des Aktivitätszustandes des Prostataepithels konnten hier nicht beobachtet werden. Eine höhere Dichte an Fibrozyten ließ sich regelmäßig in der Nähe arterieller Gefäße, unregelmäßiger und in geringerer Ausprägung auch in Nähe venöser Gefäße ausmachen. Mit zunehmenden Abstand von diesen Strukturen nahm die Dichte dieser Zellen ab. Das periprostatische Stroma bestand aus einem lockeren Netzwerk von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten parallel zu elastischen Fasern, vielen  $\alpha$ -SMA-positiven glatten Muskelzellen sowie zahlreichen Gefäßen und Nerven. Hier ließ sich in der normalen Prostata die höchste Dichte an CD34<sup>+</sup> Fibrozyten ausmachen. In allen untersuchten Fällen zeigten die Endothelien für Lymph- und Blutgefäße eine charakteristische und starke Reaktion mit dem CD34-Antikörper. Die wenigen Fibrozyten im Stroma der normalen Prostata zeigten schlanke Zelleiber mit kompakten, länglichen Zellkernen. Die Zellen zeigten überwiegend bipolare schlanke Zellausläufer.  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten kamen in der normalen Prostata nicht zur Darstellung (Tab. 13), wohingegen die glatte Muskulatur der Gefäße und des Stromas eine starke spezifische Reaktion mit dem Antikörper zeigte.

		CD34				α-SMA			
		-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Stroma</b>	<i>n</i> (%)	<b>27</b> <b>(90)</b>	3 (10)	0 (0)	0 (0)	<b>30</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Epithel</b>	<i>n</i> (%)	<b>30</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>30</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)

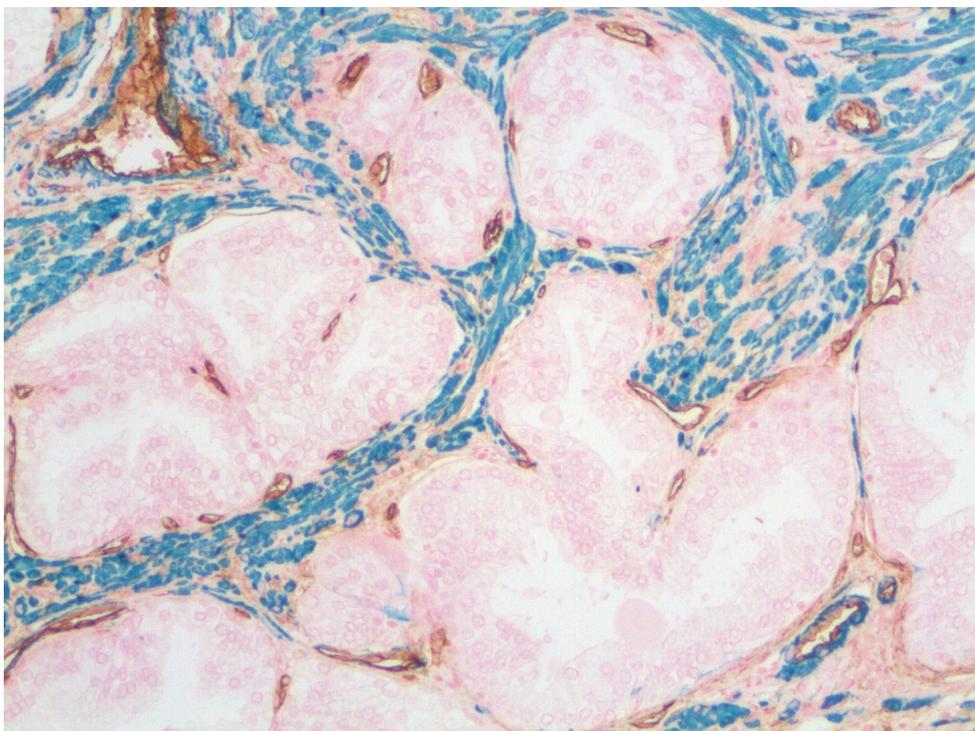
**Tab. 13** *Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Epithelzellen der normalen Prostata mit CD34 und α-SMA (n (%))*



**Abb. 12** *Immunhistochemie CD34: CD34<sup>+</sup> Fibrozyten lassen sich im Stroma der normalen Prostata kaum nachweisen. Zwischen der glatten Muskulatur zeigt sich das Prostataepithel. Endothelien von Gefäßen zeigen eine starke charakteristische Reaktion mit CD34.*



**Abb. 13** Immunhistochemie  $\alpha$ -SMA: Das Stroma der normalen Prostata besteht vornehmlich aus Fasern  $\alpha$ -SMA-positiver glatter Muskulatur, die hier quer angeschnitten sind. Die Kollagenfasern des Stromas zeigen keine Positivität

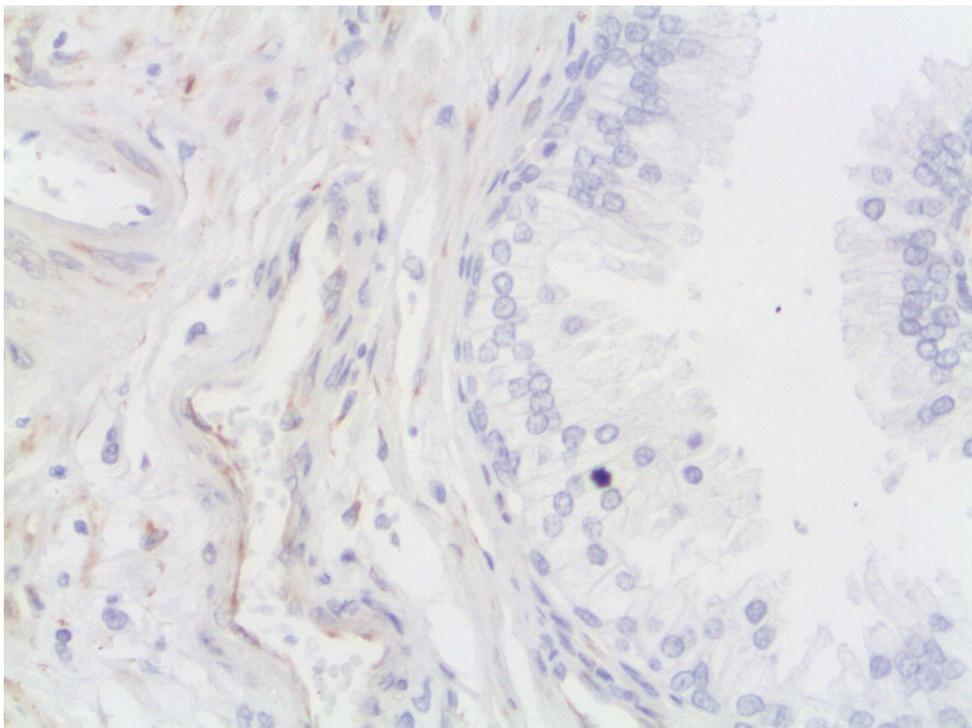


**Abb. 14** Immunhistochemische Doppelfärbung von CD34 und  $\alpha$ -SMA : Das Stroma der Prostata besteht in erster Linie aus  $\alpha$ -SMA-positiver glatter Muskulatur. Im Stroma zwischen der Muskulatur sind kaum CD34<sup>+</sup> Fibrozyten zu beobachten. Lediglich Gefäßendothelien zeigen ihre charakteristische Reaktion für CD34.

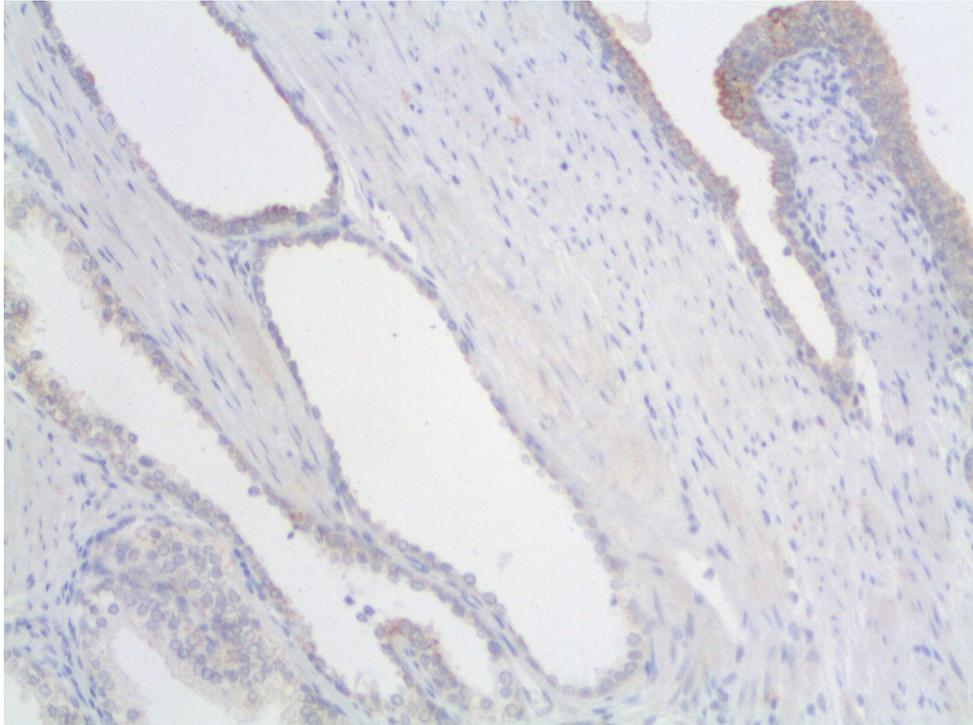
*TGF-β und SPARC*: TGF-β ließ sich in deutlich schwankender Ausprägung im normalen Prostataepithel, nicht jedoch im Stroma der Prostata nachweisen. SPARC ließ sich nicht im Stroma, aber dafür in den Endothelien der Arteriolen und Kapillaren nachweisen (Tab. 14).

		SPARC				TGF-β			
		-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Stroma</b>	<i>n</i> (%)	<b>30</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>30</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Epithel</b>	<i>n</i> (%)	<b>30</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	10 (33)	<b>14</b> <b>(47)</b>	5 (17)

**Tab. 14** *Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Epithelzellen der normalen Prostata mit SPARC und TGF-β (n (%))*



**Abb. 15** *Immunhistochemie SPARC: Im Stroma der normalen Prostata und im Prostataepithel (rechts) zeigt sich keine positive Reaktion für SPARC. Jedoch sind die Endothelien der Arteriolen und Kapillaren, wie im mittig im Bild zu sehen, positiv für diesen Antikörper.*



**Abb. 16** Immunhistochemie TGF- $\beta$ : Hier ist deutlich zu erkennen, dass TGF- $\beta$  in deutlich schwankender Ausprägung im Epithel der normalen Prostata nachzuweisen ist. Eine Korrelation hinsichtlich des Aktivitätszustandes des Prostataepithels konnte nicht beobachtet werden. Das Stroma zeigt sich negativ für TGF- $\beta$ .

#### 4.2.2. Adenokarzinom der Prostata

*CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten:* In 22 der 32 Fälle konnte ein neues Auftreten von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im Stroma des Prostatakarzinoms beobachtet werden (Tab. 15). In 11 dieser 22 Fälle zeigte 50-90% des Tumorstromas eine positive Reaktion, die anderen 11 Fälle lediglich fokal. Das Verteilungsmuster stellte sich in allen 22 Fällen inhomogen dar. So fanden sich einerseits fokale Ansammlungen, andererseits diffus zwischen den Karzinomzellen verteilte CD34<sup>+</sup> Fibrozyten. In Arealen mit rundlichen, adenomatösen Tumorformationen schienen zarte CD34<sup>+</sup> Fibrozyten die Tumore ringförmig zu umgeben, so dass sich ein honigwabenartiges Netz aus diesen Zellen darstellte. Eine homogene Reaktion des gesamten Tumorstromas mit dem CD34-Antikörper war in keinem Fall nachweisbar. Eine Assoziation zwischen dem Auftreten der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und der Lokalisation des Karzinoms innerhalb der Prostata konnte nicht beobachtet werden. In 10 von insgesamt 32 Fällen traten im Stroma des Prostatakarzinoms keine CD34<sup>+</sup> Fibrozyten auf (Tab. 15). Alleinige Endothelien von Blut- und Lymphgefäßen zeigten in allen untersuchten Fällen eine charakteristische Reaktion mit dem CD34-Antikörper. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten stellten sich im Stroma des Prostatakarzinoms als schlanke Zellen mit schmalen Zelleibern und kompakten, länglichen Zellkernen dar, die überwiegend bipolar angeordnet waren. Sie schienen zu benachbarten Zellen über ihre dendritischen Zellausläufer in Verbindung zu stehen.

In 7 der 32 Fälle ließen sich fokal  $\alpha$ -SMA-positive Zellen im Stroma der Adenokarzinome nachweisen (Tab. 15). Diese entsprachen morphologisch Myofibroblasten und besaßen einen plumpen, spindelförmigen Aufbau. Sie erwiesen sich sowohl in An- als auch in Abwesenheit von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten als nachweisbar. In Arealen, in denen sowohl CD34<sup>+</sup> Fibrozyten als auch  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten vorkamen, zeigte die Doppelfärbung, dass es sich hier um 2 verschiedene Zellidentitäten handelte. Eine Unterscheidung  $\alpha$ -SMA-reaktiver Myofibroblasten von  $\alpha$ -SMA-positiver glatter Muskulatur erwies sich teilweise als schwierig, jedoch ließen sich in 25 der 32 Fälle vornehmlich kräftige Bündel von glatter Muskulatur zwischen den Tumorfronten darstellen, sodass hier ein Auftreten von  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten eher unwahrscheinlich erscheint. Ausschließen kann man dies jedoch nicht.

	CD34				α-SMA			
	-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Tumorstroma</b> <i>n</i> (%)	10 (31)	<b>11</b> <b>(34)</b>	<b>11</b> <b>(34)</b>	0 (0)	<b>25</b> <b>(78)</b>	7 (22)	0 (0)	0 (0)
<b>Tumorzellen</b> <i>n</i> (%)	<b>32</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>32</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)

**Tab. 15** *Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 32 Adenokarzinomen der Prostata mit CD34 und α-SMA (n (%))*

Im Fall des Prostatakarzinoms soll zusätzlich diskutiert werden, ob der Nachweis von stromalen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten mit der Prognose dieser Tumorart korrelieren könnte. Hierfür wurden die Fälle hinsichtlich des Lymphknotenstatus (Tab. 16), der Ausdehnung des Primärtumors (Tab. 17) und des Gleason-Scores (Tab. 18) genauer untersucht.

Eine positive Reaktion für CD34 trat im Tumorstroma bei Patienten mit regionalen Lymphknotenmetastasen pN1 (in 75% der Fälle), mit höherem Gleason Score zwischen 7-10 (in 85% der Fälle) und der Ausdehnung pT3/pT4 (in 84% der Fälle) jeweils häufiger in Erscheinung als bei Patienten ohne Lymphknotenmetastasen pN0 (in 58% der Fälle), eines niedrigeren Gleason-Scores zwischen 5-6 (in 58% der Fälle) und im Stadium pT2 (in 46% der Fälle). Am deutlichsten war der Unterschied in Abhängigkeit von der Ausdehnung des Primärtumors (pT2 zu pT3/pT4) zu vermerken. Ein positiver Befund hinsichtlich α-SMA-reaktiver Myofibroblasten konnte ausschließlich im Stadium pN1 und pT3/4 gefunden werden, während hingegen bei pN0 und pT2 keine Zellen dieser Art nachweisbar waren. Bezüglich des Entdifferenzierungsgrades waren Myofibroblasten ebenso häufiger in schlecht differenzierten Karzinomen (Gleason 7-10) zu finden als in mittelgradig differenzierten Karzinomen (Gleason 5-6).

CD34					α-SMA			
	-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Tumorstroma</b> <i>n</i>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
(%)	(31)	(34)	(34)	(0)	(78)	(22)	(0)	(0)
pN0 <i>n</i>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
(%)	(42)	(33)	(25)	(0)	(100)	(0)	(0)	(0)
pN1 <i>n</i>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>13</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
(%)	(25)	(35)	(40)	(0)	(65)	(35)	(0)	(0)
<b>Tumorzellen</b> <i>n</i>	<b>32</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>32</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
(%)	(100)	(0)	(0)	(0)	(100)	(0)	(0)	(0)
pN0 <i>n</i>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
(%)	(100)	(0)	(0)	(0)	(100)	(0)	(0)	(0)
pN1 <i>n</i>	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
(%)	(100)	(0)	(0)	(0)	(100)	(0)	(0)	(0)

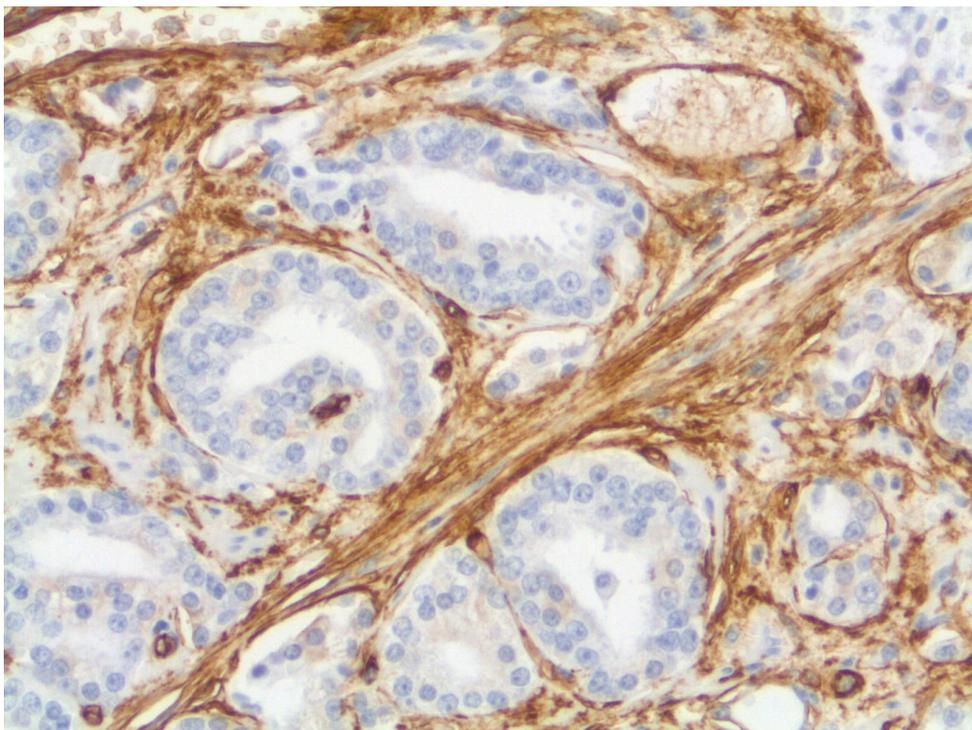
**Tab. 16** Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 32 Adenokarzinomen der Prostata mit CD34 und α-SMA in Abhängigkeit von Fehlen (pN0) bzw. Vorhandensein (pN1) von regionalen Lymphknotenmetastasen nach TNM (*n* (%))

CD34					α-SMA			
	-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Tumorstroma</b> <i>n</i>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
(%)	(31)	(34)	(34)	(0)	(78)	(22)	(0)	(0)
pT2 <i>n</i>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
(%)	(54)	(31)	(15)	(0)	(100)	(0)	(0)	(0)
pT3 <i>n</i>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
(%)	(18)	(29)	(53)	(0)	(59)	(41)	(0)	(0)
pT4 <i>n</i>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
(%)	(0)	(100)	(0)	(0)	(100)	(0)	(0)	(0)
pT3/4 <i>n</i>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
(%)	(16)	(37)	(47)	(0)	(63)	(37)	(0)	(0)
<b>Tumorzellen</b> <i>n</i>	<b>32</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>32</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
(%)	(100)	(0)	(0)	(0)	(100)	(0)	(0)	(0)
pT2 <i>n</i>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
(%)	(100)	(0)	(0)	(0)	(100)	(0)	(0)	(0)
pT3 <i>n</i>	<b>17</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>17</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
(%)	(100)	(0)	(0)	(0)	(100)	(0)	(0)	(0)
pT4 <i>n</i>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
(%)	(100)	(0)	(0)	(0)	(100)	(0)	(0)	(0)
pT3/4 <i>n</i>	<b>19</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>19</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
(%)	(100)	(0)	(0)	(0)	(100)	(0)	(0)	(0)

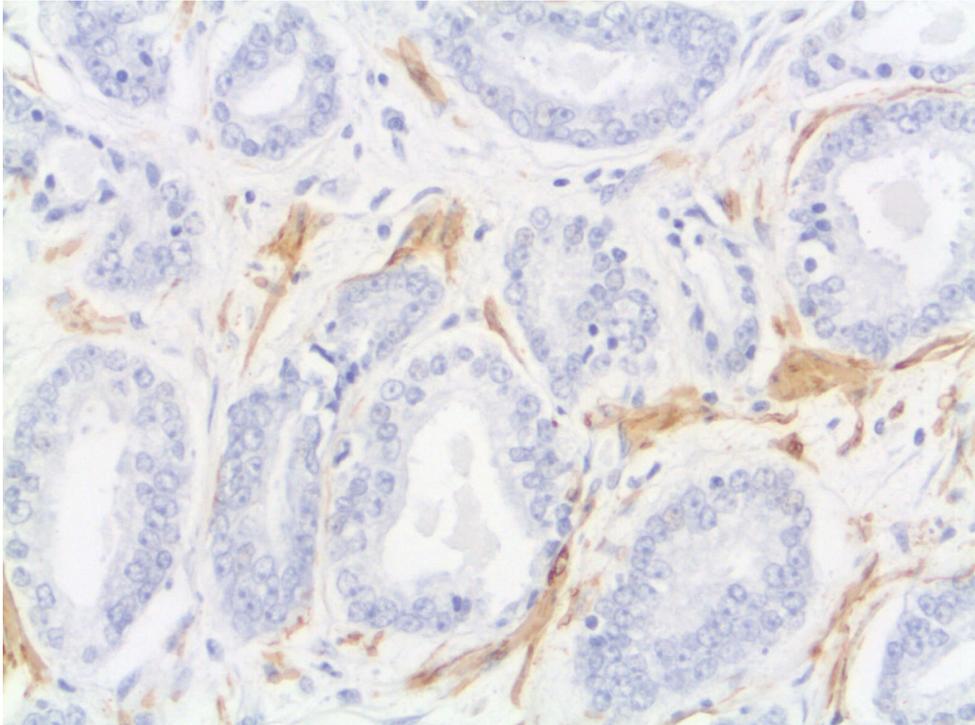
**Tab. 17** Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 32 Adenokarzinomen der Prostata mit CD34 und α-SMA in Abhängigkeit von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors nach TNM (*n* (%))

		CD34				$\alpha$ -SMA			
		-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Tumorstroma</b>	<i>n</i> (%)	10 (31)	<b>11</b> (34)	<b>11</b> (34)	0 (0)	<b>25</b> (78)	7 (22)	0 (0)	0 (0)
GS 5-6	<i>n</i> (%)	<b>8</b> (42)	3 (16)	<b>8</b> (42)	0 (0)	<b>17</b> (89)	2 (11)	0 (0)	0 (0)
GS 7-10	<i>n</i> (%)	2 (15)	<b>8</b> (62)	3 (23)	0 (0)	<b>8</b> (62)	5 (38)	0 (0)	0 (0)
<b>Tumorzellen</b>	<i>n</i> (%)	<b>32</b> (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>32</b> (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
GS 5-6	<i>n</i> (%)	<b>19</b> (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>19</b> (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
GS 7-10	<i>n</i> (%)	<b>13</b> (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>13</b> (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

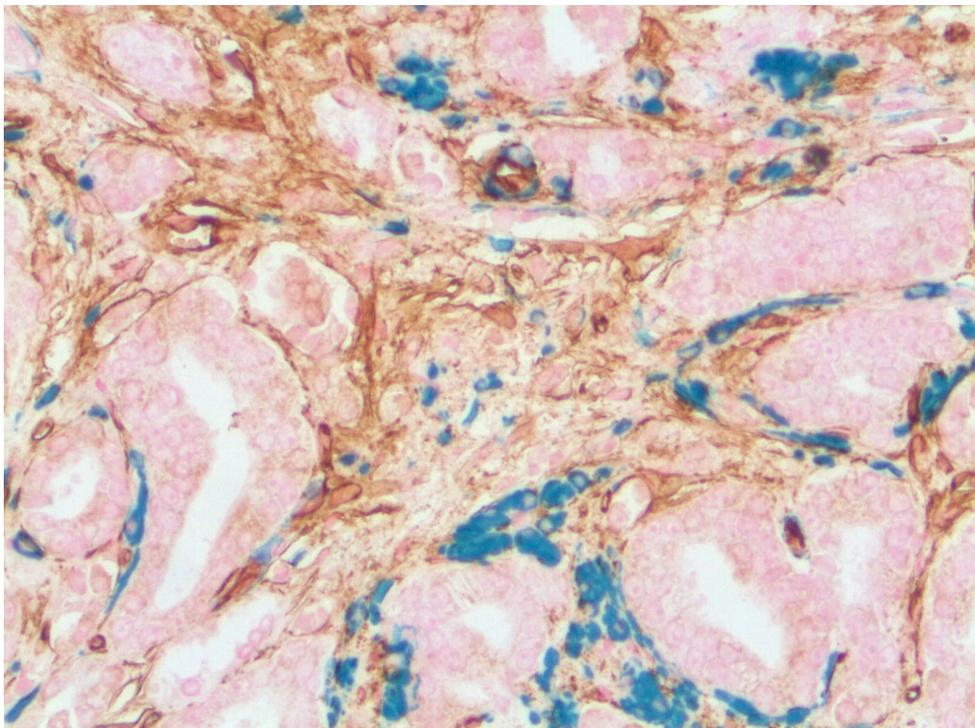
**Tab. 18** Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 32 Adenokarzinomen der Prostata mit CD34 und  $\alpha$ -SMA in Abhängigkeit vom Entdifferenzierungsgrad nach Gleason (*n* (%))



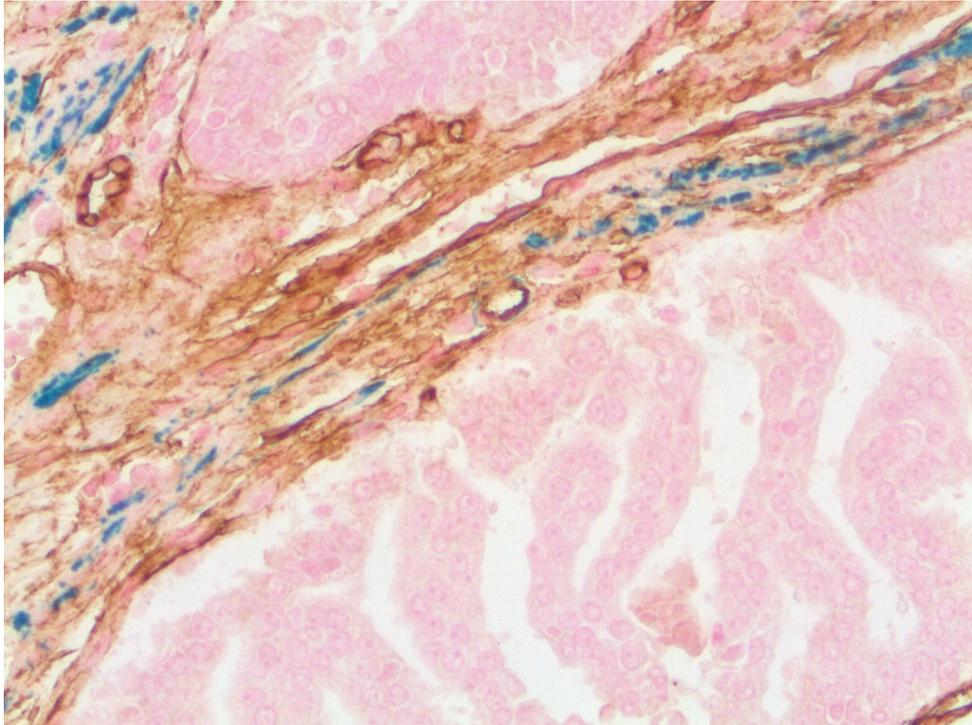
**Abb. 17** Immunhistochemie CD34: Im Stroma des Prostatakarzinoms kann ein neues Auftreten von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten beobachtet werden. In Arealen mit glandulären Tumorformationen scheinen dicht gelagerte zarte CD34<sup>+</sup> Fibrozyten die Tumore ringförmig zu umgeben, so dass sich ein honigwabenartiges Netz darstellt.



**Abb. 18** Immunhistochemie  $\alpha$ -SMA: Im Stroma der Adenokarzinome lassen sich nur noch vereinzelt  $\alpha$ -SMA-positive Zellen darstellen, die nach morphologischen Kriterien am ehesten glatter Muskulatur entsprechen.



**Abb. 19** Immunhistochemische Doppelfärbung von CD34 und  $\alpha$ -SMA: Im Stroma des Prostatakarzinom erscheinen reichlich inhomogen verteilte CD34<sup>+</sup> Fibrozyten, die sich im normalen Stroma nicht darstellen. Daneben lässt sich  $\alpha$ -SMA-reaktive glatte Muskulatur (hier im Querschnitt) zwischen den Tumorfronten darstellen.



**Abb. 20** Immunhistochemische Doppelfärbung von CD34 und  $\alpha$ -SMA: Im Stroma von Karzinomen eines höheren Gleason-Scores (unten) zeigen sich reichlich CD34<sup>+</sup> Fibrozyten. Daneben zeigt die Doppelfärbung einzelne teilweise zart anmutende  $\alpha$ -SMA-reaktive Zellen (links unten), die nach morphologische Kriterien auch  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten entsprechen könnten.

*TGF- $\beta$  und SPARC*: Eine fokale Reaktivität des Tumorstromas für SPARC konnte in einem Viertel der 32 Fälle nachgewiesen werden. Die übrigen Fälle zeigten keine stromale Reaktion für den SPARC-Antikörper. Lediglich in den Endothelien von Arteriolen und Kapillaren war dieser Antikörper nachzuweisen. Ein räumlich vereintes Auftreten von  $\alpha$ -SMA- und SPARC-positiven Stromazellen kam nicht zur Darstellung. TGF- $\beta$  fand man in deutlich variablem Ausmaß in den Tumorzellen der Adenokarzinome. In der Mehrzahl der Fälle stellten sich hier mehr als 50% der Tumorzellen als TGF- $\beta$ -positiv dar. SPARC war in dem jeweils höheren Tumorstadium oder Entdifferenzierungsgrad im Stroma häufiger vertreten. Bei TGF- $\beta$  hingegen ließen sich keine Assoziationen bezüglich der Ausdehnung oder der Differenzierung nachvollziehen.

SPARC					TGF- $\beta$				
	-	-/+	+/-	+		-	-/+	+/-	+
<b>Tumorstroma</b> <i>n</i> (%)	<b>24</b> <b>(75)</b>	8 (25)	0 (0)	0 (0)		<b>32</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
pN0 <i>n</i> (%)	<b>10</b> <b>(83)</b>	2 (17)	0 (0)	0 (0)		<b>12</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
pN1 <i>n</i> (%)	<b>14</b> <b>(70)</b>	6 (30)	0 (0)	0 (0)		<b>20</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Tumorzellen</b> <i>n</i> (%)	<b>32</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)		1 (3)	5 (16)	<b>14</b> <b>(44)</b>	12 (38)
pN0 <i>n</i> (%)	<b>12</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)		1 (8)	3 (25)	<b>5</b> <b>(42)</b>	3 (25)
pN1 <i>n</i> (%)	<b>20</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)		0 (0)	2 (10)	<b>9</b> <b>(45)</b>	<b>9</b> <b>(45)</b>

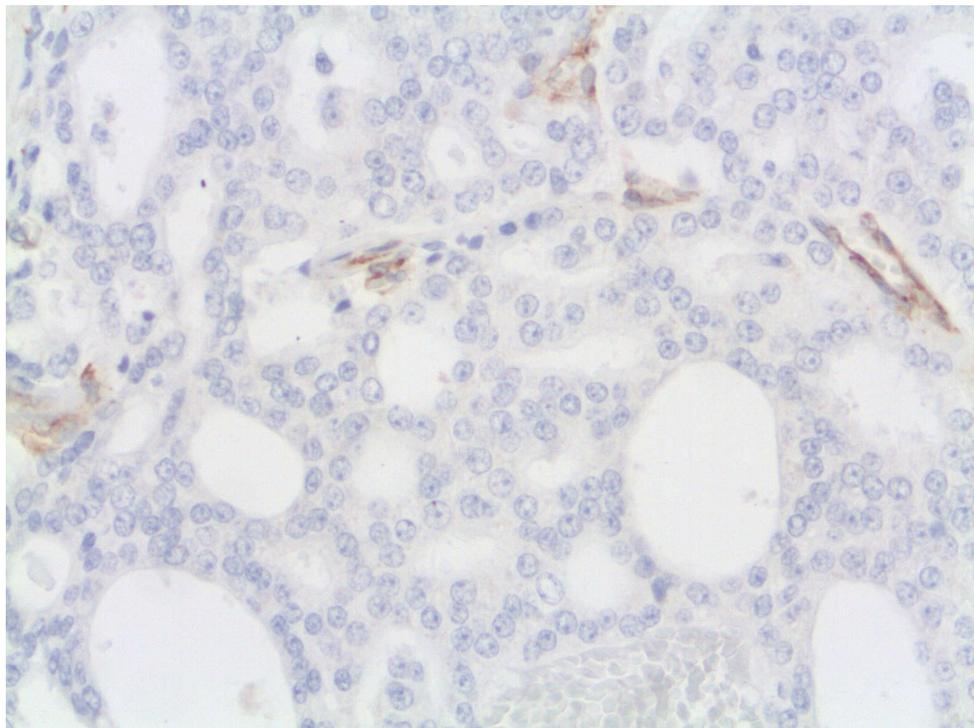
**Tab. 19** Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 32 Adenokarzinomen der Prostata mit SPARC und TGF- $\beta$  in Abhängigkeit von Fehlen (pN0) bzw. Vorhandensein (pN1) von regionalen Lymphknotenmetastasen nach TNM (*n* (%))

SPARC					TGF- $\beta$				
	-	-/+	+/-	+		-	-/+	+/-	+
<b>Tumorstroma</b> <i>n</i> (%)	<b>24</b> <b>(75)</b>	8 (25)	0 (0)	0 (0)		<b>32</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
pT2 <i>n</i> (%)	<b>11</b> <b>(85)</b>	2 (15)	0 (0)	0 (0)		<b>13</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
pT3 <i>n</i> (%)	<b>13</b> <b>(76)</b>	4 (24)	0 (0)	0 (0)		<b>17</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
pT4 <i>n</i> (%)	0 (0)	<b>2</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)		<b>2</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
pT3/4 <i>n</i> (%)	<b>13</b> <b>(68)</b>	6 (32)	0 (0)	0 (0)		<b>19</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Tumorzellen</b> <i>n</i> (%)	<b>32</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)		1 (3)	5 (16)	<b>14</b> <b>(44)</b>	12 (38)
pT2 <i>n</i> (%)	<b>13</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)		0 (0)	2 (15)	4 (31)	<b>7</b> <b>(54)</b>
pT3 <i>n</i> (%)	<b>17</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)		1 (6)	3 (18)	<b>9</b> <b>(53)</b>	4 (24)
pT4 <i>n</i> (%)	<b>2</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	<b>1</b> <b>(50)</b>	<b>1</b> <b>(50)</b>
pT3/4 <i>n</i> (%)	<b>19</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)		1 (5)	3 (16)	<b>10</b> <b>(53)</b>	5 (27)

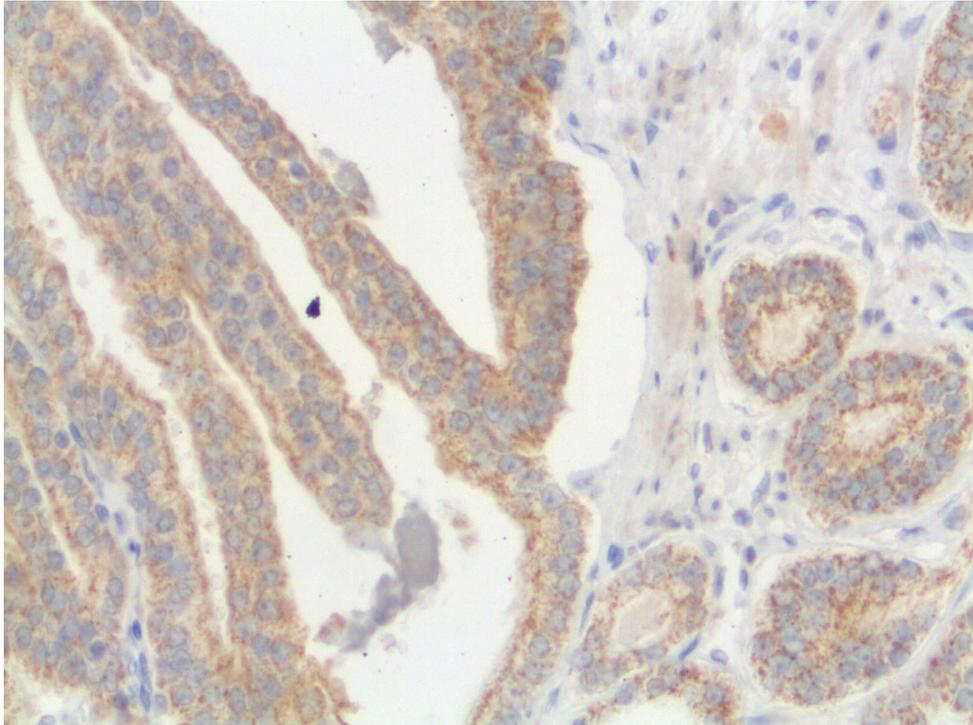
**Tab. 20** Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 32 Adenokarzinomen der Prostata mit SPARC und TGF- $\beta$  in Abhängigkeit von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors nach TNM (*n* (%))

		SPARC				TGF- $\beta$			
		-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Tumorstroma</b>	<i>n</i> (%)	<b>24</b> <b>(75)</b>	8 (25)	0 (0)	0 (0)	<b>32</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
GS 5-6	<i>n</i> (%)	<b>16</b> <b>(84)</b>	3 (16)	0 (0)	0 (0)	<b>19</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
GS 7-10	<i>n</i> (%)	<b>8</b> <b>(62)</b>	5 (38)	0 (0)	0 (0)	<b>13</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Tumorzellen</b>	<i>n</i> (%)	<b>32</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	5 (16)	<b>14</b> <b>(44)</b>	12 (38)
GS 5-6	<i>n</i> (%)	<b>19</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5)	4 (21)	<b>9</b> <b>(47)</b>	5 (26)
GS 7-10	<i>n</i> (%)	<b>13</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (8)	5 (38)	<b>7</b> <b>(54)</b>

**Tab. 21** Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 32 Adenokarzinomen der Prostata mit SPARC und TGF- $\beta$  in Abhängigkeit vom Entdifferenzierungsgrad nach Gleason (*n* (%))



**Abb. 21** Immunhistochemie SPARC: Im Großteil der Fälle zeigt sich beim Prostatakarzinom keine stromale Reaktion für SPARC. Lediglich in den Endothelien von Arteriolen und Kapillaren ist die charakteristische Reaktion für diesen Antikörper nachzuweisen (oben).



**Abb. 22** Immunhistochemie TGF-β: In den Zellen des Prostatakarzinoms findet man eine deutlich positive Reaktion für TGF-β, wobei sich im Großteil der Fälle mehr als 50% der Tumorzellen für TGF-β positiv darstellen. Das Stroma hingegen zeigt sich vollständig negativ für diesen Antikörper.

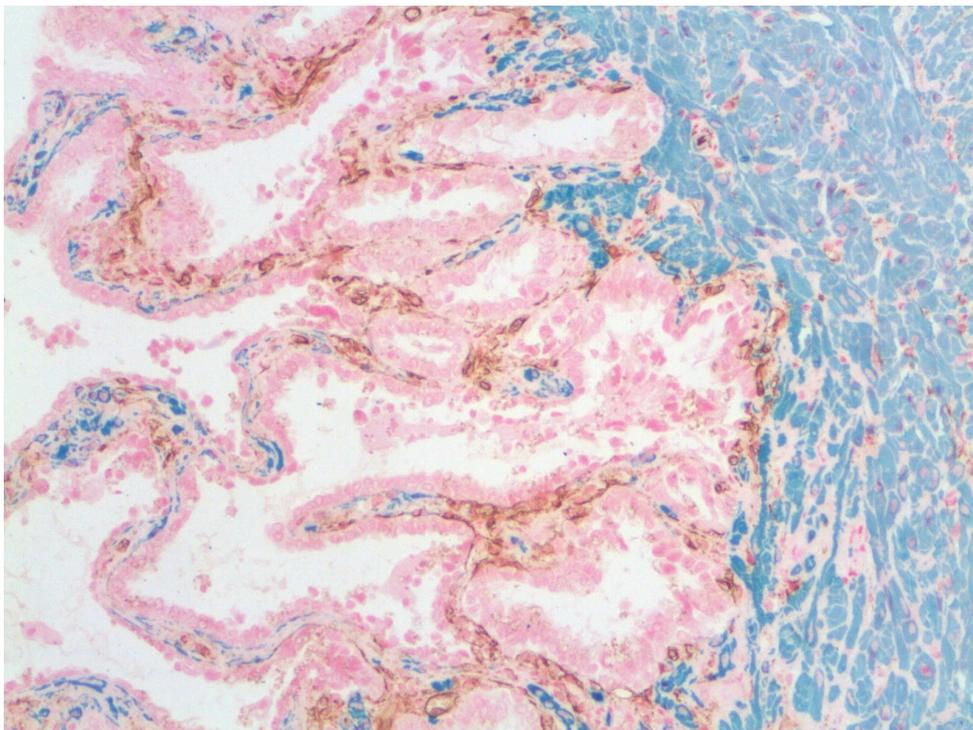
#### 4.2.3. Normale Samenblase

*CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und α-SMA-reaktive Myofibroblasten:* CD34<sup>+</sup> Fibrozyten ließen sich im Stroma der normalen Samenblase nur fokal in 2 von 13 Fällen darstellen. Dafür zeigte die Samenblase reichlich α-SMA-positive glatte Muskulatur neben anderen Bindegewebsfasern, die keine Reaktivität für CD34 aufwiesen. Die sekretorisch aktive Samenblasenschleimhaut war in viele Nischen unterkammert und beherbergte eine hohe Dichte an Kapillaren, deren Endothelien eine starke Reaktion mit CD34 aufwiesen. In ihrer Lamina propria waren neben CD34-positiven Kapillaren bloß vereinzelt CD34<sup>+</sup> Fibrozyten nachweisbar. Dafür stellten sich vor allem in den Schleimhautbrücken regelmäßig locker verteilte α-SMA-reaktive Myofibroblasten dar. Sie besaßen einen plumpen, spindelförmigen Zelleib und ordneten sich zumeist parallel zum Epithelverlauf an. Im übrigen Stroma waren keine α-SMA-reaktiven Myofibroblasten nachweisbar, nur die glatte Muskulatur des Stromas und der Gefäße zeigte eine starke spezifische Reaktion mit dem Glattmuskelaktin-Antikörper. In der Adventitia der

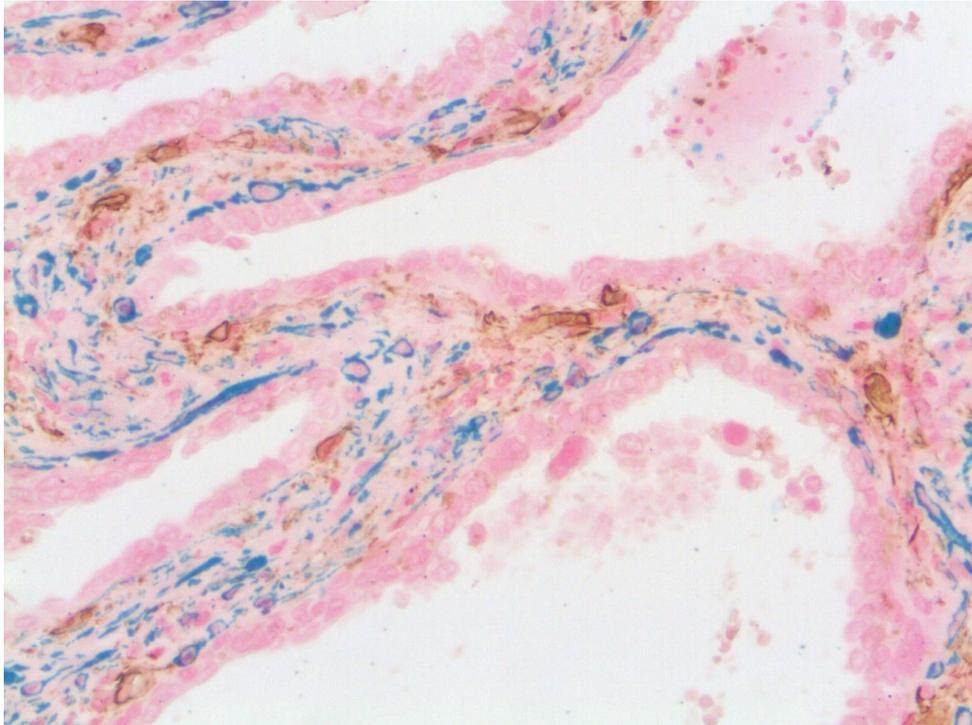
Samenblase war stets ein lockeres Flechtwerk aus zahlreichen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten nachweisbar. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten zeigten in der Samenblase den gleichen Aufbau wie jene im Stroma der normalen Prostata.

		CD34				α-SMA			
		-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Stroma</b>	<i>n</i> (%)	<b>11</b> <b>(85)</b>	2 (15)	0 (0)	0 (0)	3 (23)	<b>10</b> <b>(77)</b>	0 (0)	0 (0)
<b>Epithel</b>	<i>n</i> (%)	<b>30</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>30</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)

**Tab. 22** Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Epithelzellen der normalen Samenblase mit CD34 und α-SMA (n (%))



**Abb. 23** Immunhistochemische Doppelfärbung von CD34 und α-SMA: Im Stroma der Samenblase finden sich kräftige Fasern α-SMA-positiver Muskulatur (rechts), CD34<sup>+</sup> Fibrozyten lassen sich in diesen Arealen nicht darstellen. Lediglich Gefäßendothelien reagieren positiv für CD34.



**Abb. 24** Immunhistochemische Doppelfärbung von CD34 und  $\alpha$ -SMA: In der Lamina propria der Samenblase sieht man zahlreiche  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten sieht man nur sehr vereinzelt und in direkter Nähe zu Gefäßen, deren Kapillaren deutlich positiv für CD34 sind.

*TGF- $\beta$  und SPARC*: SPARC konnte man im Stroma der Samenblase gelegentlich in den Endothelien von Arteriolen und Kapillaren erkennen. TGF- $\beta$  konnte in Samenblasen nicht identifiziert werden.

		SPARC				TGF- $\beta$			
		-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Stroma</b>	<i>n</i> (%)	<b>13</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>13</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Epithel</b>	<i>n</i> (%)	<b>30</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>13</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)

**Tab. 23** Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Epithelzellen der normalen Samenblase mit SPARC und TGF- $\beta$  (*n* (%))

#### 4.2.4. Normaler Ductus deferens

*CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten*: Im Ductus deferens ließ sich in 7 von 10 Fällen in der Lamina Propria der Mukosa fokale Ansammlungen von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten darstellen. Daneben ließen sich hier kollagene Fasern, vereinzelt glatte  $\alpha$ -

SMA-reaktive Muskelfasern sowie ein hohe Dichte an Kapillaren festmachen, die sich positiv für CD34 zeigten. Die 3-schichtige Muskularis bestand aus reichlich  $\alpha$ -SMA-positiver glatter Muskulatur. Parallel zu den Muskelfasern verliefen hier gelegentlich einzelne CD34<sup>+</sup> Fibrozyten, die im Vergleich zu den übrigen Fibrozyten einen auffällig länglichen und schlanken Zellaufbau zeigten. Teilweise schienen sie die glatten Muskelfasern mit ihren bipolaren Zellausläufern zu berühren. Die höchste Dichte an CD34<sup>+</sup> Fibrozyten konnte in der Adventitia sowie in direkter Nähe zu arteriellen Gefäßen ausgemacht werden. In der Adventitia fanden sich zahlreich Nervengeflechte, die ebenso von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten umgeben waren. Mit zunehmendem Abstand zu Gefäßen und Nerven nahm die Dichte der Fibrozyten ab. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten besaßen einen schlanken Zelleib mit einem länglich verlaufenden Zellkern. Die Zellen zeigten sich hier überwiegend bipolar. Im Stroma des Ductus deferens waren keine  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten auszumachen.

		CD34				$\alpha$ -SMA			
		-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Stroma</b>	<i>n</i> (%)	3 (30)	7 (70)	0 (0)	0 (0)	10 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Epithel</b>	<i>n</i> (%)	10 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

**Tab. 24** Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Epithelzellen des normalen Ductus deferens mit CD34 und  $\alpha$ -SMA (*n* (%))

*TGF- $\beta$*  und *SPARC*: In einem Fall konnte eine fokale Reaktivität des Stromas der Lamina Propria für SPARC vermerkt werden. In den übrigen Fällen zeigten nur die Endothelien eine Reaktion mit diesem Antikörper. TGF- $\beta$  wurde hier nicht angefärbt.

		SPARC				TGF- $\beta$			
		-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Stroma</b>	<i>n</i> (%)	9 (90)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Epithel</b>	<i>n</i> (%)	10 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

**Tab. 25** Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Epithelzellen des normalen Ductus deferens mit SPARC und TGF- $\beta$  (*n* (%)); TGF- $\beta$  wurde hier nicht gefärbt.

### 4.3. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten im Penis

#### 4.3.1. Normaler Penis

*CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten:* CD34<sup>+</sup> Fibrozyten machen im Penis nur einen geringen Anteil des Stromas aus. Die paarig angelegten Corpora cavernosa bestanden aus Kavernen, die mit CD34-positivem Endothel ausgekleidet waren. Dazwischen lagen Trabekel aus  $\alpha$ -SMA-reaktiven glatten Muskelfasern, zwischen denen kaum - mit Ausnahme des Stromas in unmittelbarer Nähe der Arteriolen – CD34<sup>+</sup> Fibrozyten nachweisbar waren. Das Corpus spongiosum bestand aus Venen mit variabler Wanddicke, deren Endothel eine positive Reaktivität für den CD34-Antikörper zeigte. Zwischen den Venen stellten sich vornehmlich längsverlaufende  $\alpha$ -SMA-reaktive glatte Muskelfasern dar. Im Vergleich zum Corpus cavernosum zeigte sich hier eine geringere Menge an glatter Muskulatur, dafür ein kollagenreicheres Stroma, welches kaum CD34<sup>+</sup> Fibrozyten aufwies. Lediglich periarteriolär und in Nähe der Urethra fand man in 4 von 10 Fällen fokal eine Ansammlung von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten. In der Lamina propria der Urethra ließen sich 2 Arten von Fibrozyten erkennen. In den oberen Schleimhautschichten stellten sich sehr vereinzelt zarte  $\alpha$ -SMA-positive Zellen dar, die morphologisch Fibrozyten ähnelten. Diese fand man parallel zur Basalmembran angeordnet unterhalb des urethralen Epithels. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten konnten vornehmlich in den tieferen Schichten des urethralen Stromas nachgewiesen werden, wo sie ein lockeres Netzwerk bildeten. Hier zeigten sie teilweise multipolare Zellausläufer. Anhand der Doppelfärbung konnte eine Koexpression von CD34 und  $\alpha$ -SMA in einer Zelle ausgeschlossen werden, so dass hier von 2 verschiedenen Zellidentitäten ausgegangen werden kann. In 4 von 6 Fällen wurde eine fokale Reaktivität für SPARC beobachtet. In der Penishaut konnten CD34<sup>+</sup> Fibrozyten nur unregelmäßig nachgewiesen werden. In 4 von 7 Fällen fehlten CD34<sup>+</sup> Fibrozyten gänzlich. In zwei weiteren Fällen konnten lediglich fokale Ansammlungen von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im Stroma der Haut gefunden werden. In einem Fall reagierte das subepidermale Stroma vollständig positiv. Die Fibrozyten waren überwiegend bipolar aufgebaut und parallel zur Epidermis angeordnet. Im Praeputium fanden sich locker verteilte, relativ kurze CD34<sup>+</sup> Fibrozyten neben vielen Gefäßen und Nerven. In der Fascia penis zeigten sich regelmäßig locker verteilte CD34<sup>+</sup> Fibrozyten parallel zu den Kollagenfasern und  $\alpha$ -SMA-reaktiven Muskelbündeln. In der kollagenfaserreichen

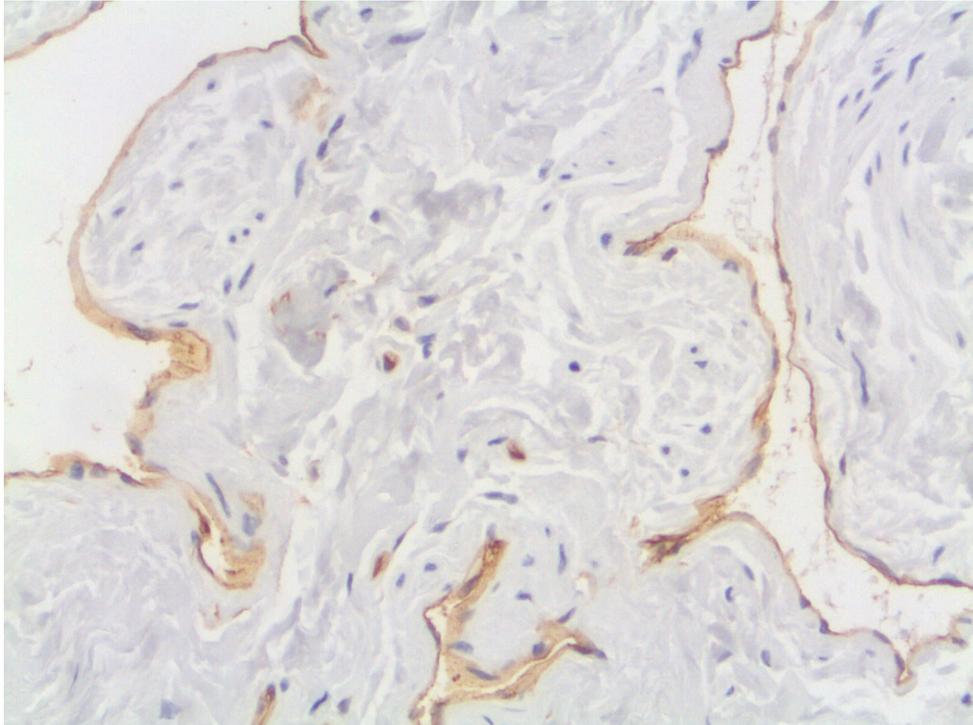
Tunica albuginea stellten sich nur vereinzelt CD34<sup>+</sup> Fibrozyten dar, die auch hier parallel zu den Kollagenfasern angeordnet waren. In allen untersuchten Fällen zeigten Endothelien für Lymph- und Blutgefäße eine charakteristische und starke Reaktion für CD34. Unabhängig von der anatomischen Lokalisation kam in der Nähe von Gefäßen regelmäßig eine erhöhte Dichte konzentrisch angeordneter CD34<sup>+</sup> Fibrozyten zur Darstellung. Mit zunehmendem Abstand nahm die Dichte dieser Zellen ab.

CD34<sup>+</sup> Fibrozyten des normalen Penis besaßen schlanke Zelleiber mit kompakten, länglichen Zellkernen. Die Zellen zeigten sich vornehmlich bipolar, in der Urethra gelegentlich auch multipolar. In kollagenfaserreichen Arealen ordneten sie sich parallel zum Faserverlauf an. Häufig schien es, dass ihre Zellausläufer mit benachbarten CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in Kontakt standen.

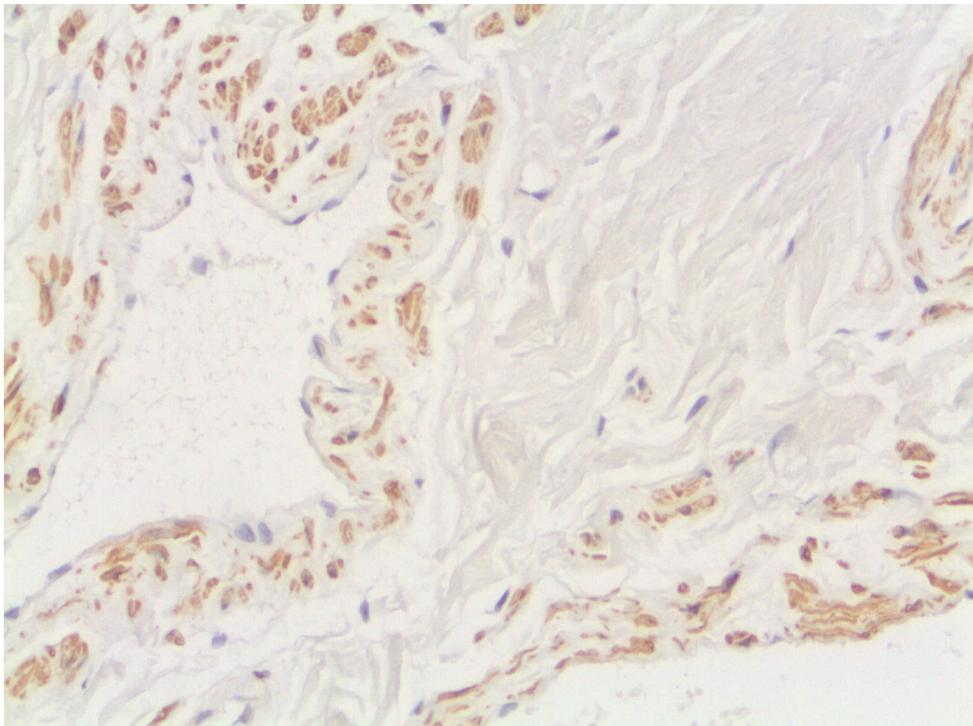
Im Stroma des normalen Penis ließen sich keine  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten nachweisen. Allein die glatte Muskulatur der Gefäße und Schwellkörper zeigte eine spezifische Reaktion mit dem Antikörper.

		CD34				$\alpha$ -SMA			
		-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Haut- stroma</b>	<i>n</i> (%)	<b>4</b> <b>(57)</b>	2 (29)	0 (0)	1 (14)	<b>7</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Haut- epithel</b>	<i>n</i> (%)	<b>7</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>7</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Stroma Tunica albuginea</b>	<i>n</i> (%)	<b>10</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>10</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Stroma Fascia penis</b>	<i>n</i> (%)	0 (0)	<b>3</b> <b>(50)</b>	<b>3</b> <b>(50)</b>	0 (0)	<b>6</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Stroma Spongiosum</b>	<i>n</i> (%)	<b>6</b> <b>(60)</b>	4 (40)	0 (0)	0 (0)	<b>10</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Stroma Cavernosum</b>	<i>n</i> (%)	<b>6</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>6</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Stroma Urethra</b>	<i>n</i> (%)	0 (0)	1 (17)	<b>4</b> <b>(66)</b>	1 (17)	<b>6</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Epithel Urethra</b>	<i>n</i> (%)	<b>6</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>6</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)

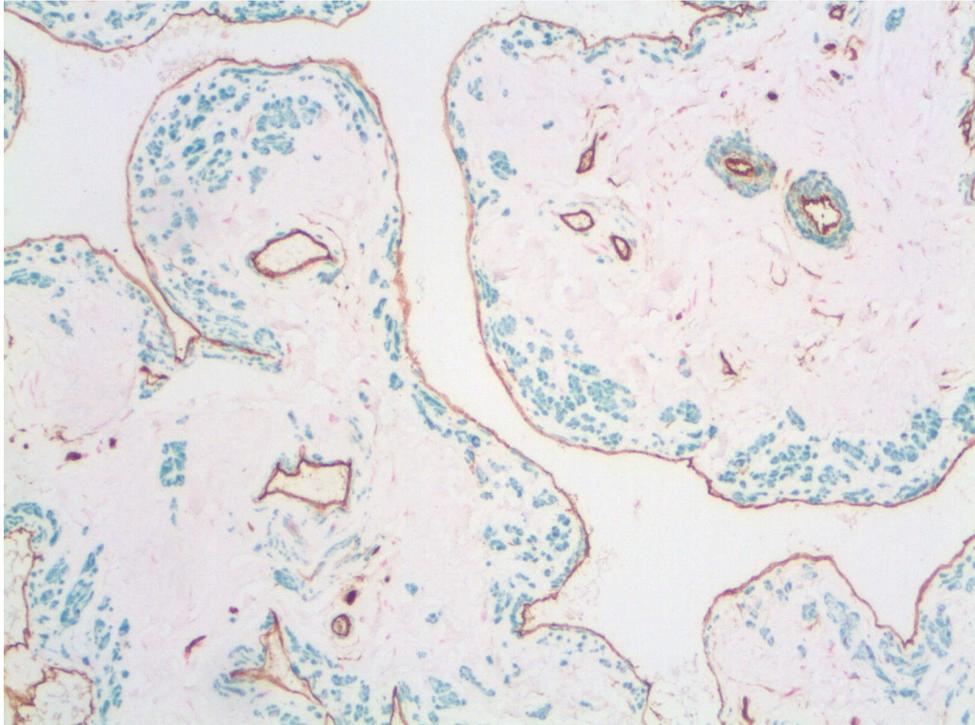
**Tab. 26** Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas von Penishaut, Tunica albuginea, Fascia penis, Corpus spongiosum, Corpus cavernosum und Urethra sowie des Urethraepithels des normalen Penis mit CD34 und  $\alpha$ -SMA ((*n* (%))



**Abb. 25** Immunhistochemie CD34: Das Corpus spongiosum des Penis besteht aus Venen mit variabler Wanddicke, deren Endothel eine positive Reaktivität für CD34 zeigt. Zwischen den Venen stellt sich vornehmlich ein kollagenreiches Stroma ohne CD34<sup>+</sup> Fibrozyten dar.



**Abb. 26** Immunhistochemie  $\alpha$ -SMA: Die venösen Gefäße des Corpus spongiosum des Penis werden von längsverlaufenden  $\alpha$ -SMA-reaktiven glatten Muskelfasern umgeben. Das übrige kollagenfaserreiche Stroma färbt sich nicht an.

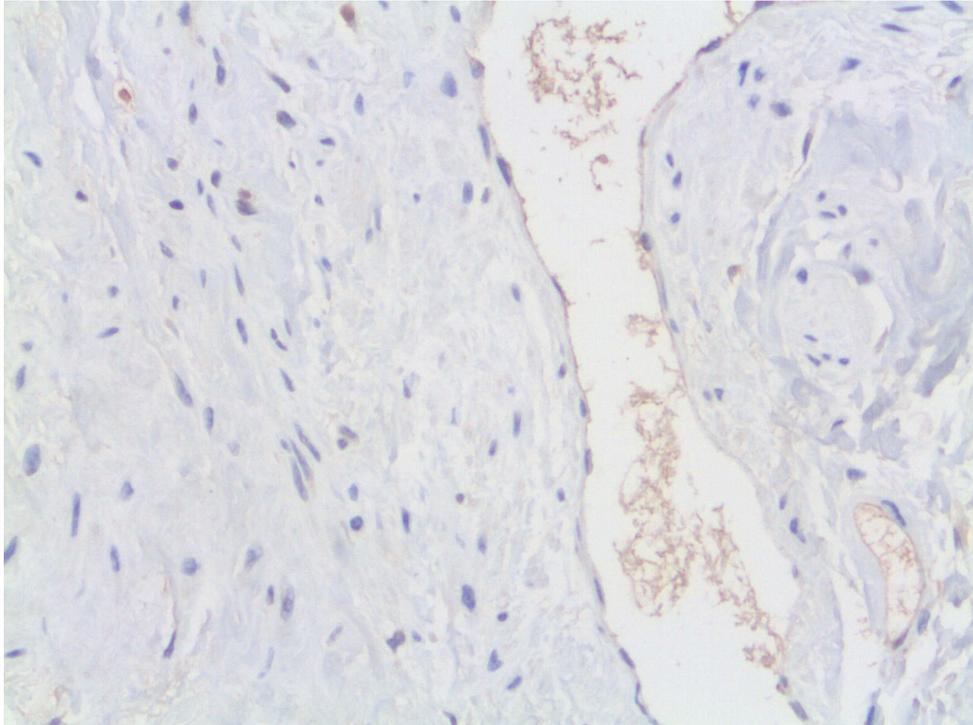


**Abb. 27** Immunhistochemische Doppelfärbung von CD34 und  $\alpha$ -SMA: CD34<sup>+</sup> Fibrozyten lassen sich im kollagenfaserreichen Stroma des Schwelkkörpers nur in unmittelbarer Nähe zu den arteriellen Gefäßen (oben rechts) nachweisen. Neben den Kavernen, die mit CD34<sup>+</sup> Fibrozyten ausgekleidet sind, zeigen sich die grün angefärbten Trabekel aus  $\alpha$ -SMA-reaktiven glatten Muskelfasern.

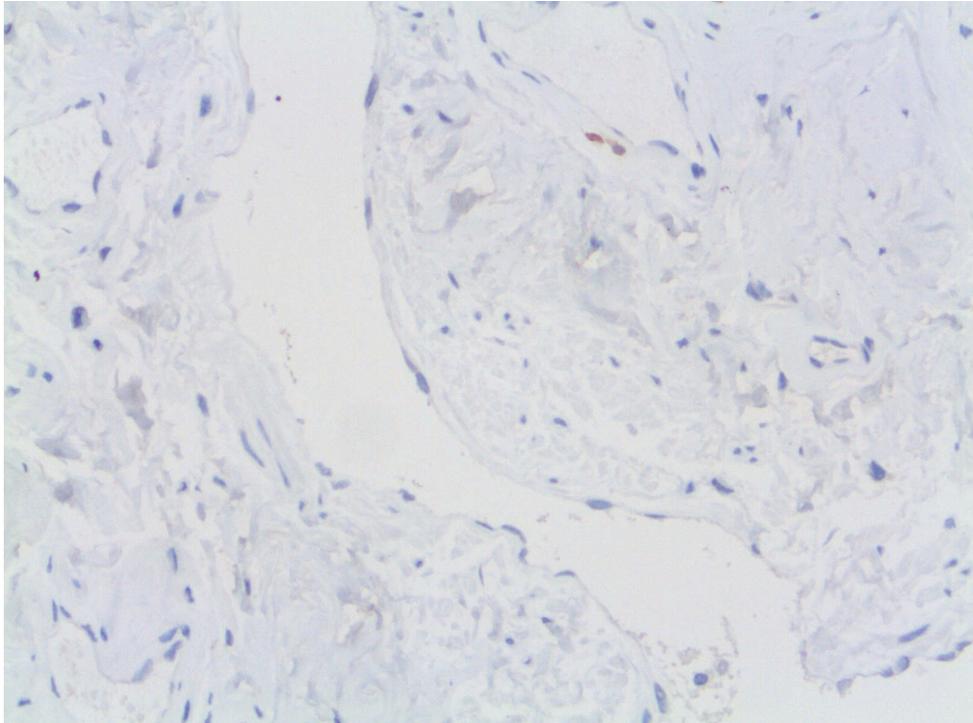
*TGF-β und SPARC:* In der Mehrzahl der Fälle wiesen die urethralen Epithelzellen sowie die paraurethralen Drüsen eine positive Reaktivität für TGF-β auf. Das Stroma des Penis zeigte keine Reaktivität für TGF-β. SPARC ließ sich in den Endothelien der Schwellkörper, Arteriolen und Kapillaren nachweisen.

		SPARC				TGF-β			
		-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Haut-stroma</b>	<i>n</i> (%)	<b>6</b> <b>(86)</b>	1 (14)	0 (0)	0 (0)	<b>7</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Haut-epithel</b>	<i>n</i> (%)	<b>7</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>7</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Stroma Tunica albuginea</b>	<i>n</i> (%)	<b>10</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>10</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Stroma Fascia penis</b>	<i>n</i> (%)	<b>5</b> <b>(83)</b>	0 (0)	1 (17)	0 (0)	<b>6</b> <b>(0)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Stroma Spongiosum</b>	<i>n</i> (%)	<b>10</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>10</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Stroma Cavernosum</b>	<i>n</i> (%)	<b>6</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>6</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Stroma Urethra</b>	<i>n</i> (%)	2 (33)	<b>4</b> <b>(67)</b>	0 (0)	0 (0)	<b>6</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Epithel Urethra</b>	<i>n</i> (%)	<b>6</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (17)	0 (0)	0 (0)	<b>5</b> <b>(83)</b>

**Tab. 27** *Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas von Penishaut, Tunica albuginea, Fascia penis, Corpus spongiosum, Corpus cavernosum und Urethra sowie des Urethraepithels des normalen Penis mit SPARC und TGF-β ((n (%))*



**Abb. 28** Immunhistochemie SPARC: In den Endothelien der Schwellkörper, Arteriolen und Kapillaren zeigt sich eine positive Reaktion für SPARC, eine stromale Reaktion lässt sich nicht darstellen.



**Abb. 29** Immunhistochemie TGF- $\beta$ : Das Stroma des normalen Penis ist frei von TGF- $\beta$ . Lediglich eine einzelne Mastzelle (oben) zeigt eine charakteristische intrazelluläre Reaktivität für TGF- $\beta$ .

### 4.3.2. Karzinome und Carcinoma in situ des Penis

#### a) Carcinoma in situ

*CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten:* Im Stroma des Carcinoma in situ des Penis waren keine CD34<sup>+</sup> Fibrozyten nachweisbar. Lediglich Gefäßendothelien stellten sich CD34-positiv dar. Da in diesem Präparat im gesunden Stroma des Plattenepithels keine CD34<sup>+</sup> Fibrozyten nachzuweisen waren, kann dies formal nicht als Verlust von Fibrozyten gewerten werden. In den Carcinoma in situ-nahen Stromaarealen zeigten sich zahlreiche parallel angeordnete, plumpe, spindelförmige  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten. Zwischen dem Carcinoma in situ und den  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten fanden sich große Lymphozytenansammlungen. Diese waren frei von Myofibroblasten.

		CD34				$\alpha$ -SMA			
		-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Tumorstroma</b>	<i>n</i>	<b>1</b>	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>
	(%)	<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	<b>(100)</b>
<b>Tumorzellen</b>	<i>n</i>	<b>1</b>	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>
	(%)	<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	<b>(100)</b>

**Tab. 28** Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Zellen des Carcinoma in situ mit CD34 und  $\alpha$ -SMA (*n* (%))

*TGF- $\beta$  und SPARC:* Im Stroma des Carcinoma in situ war keine Reaktion für SPARC oder TGF- $\beta$  nachweisbar. Lediglich Gefäß- und Lymphendothelien reagierten stark mit dem SPARC-Antikörper.

		SPARC				TGF- $\beta$			
		-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Tumorstroma</b>	<i>n</i>	<b>1</b>	0	0	0	<b>1</b>	0	0	0
	(%)	<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)	<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)
<b>Tumorzellen</b>	<i>n</i>	<b>1</b>	0	0	0	<b>1</b>	0	0	0
	(%)	<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)	<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)

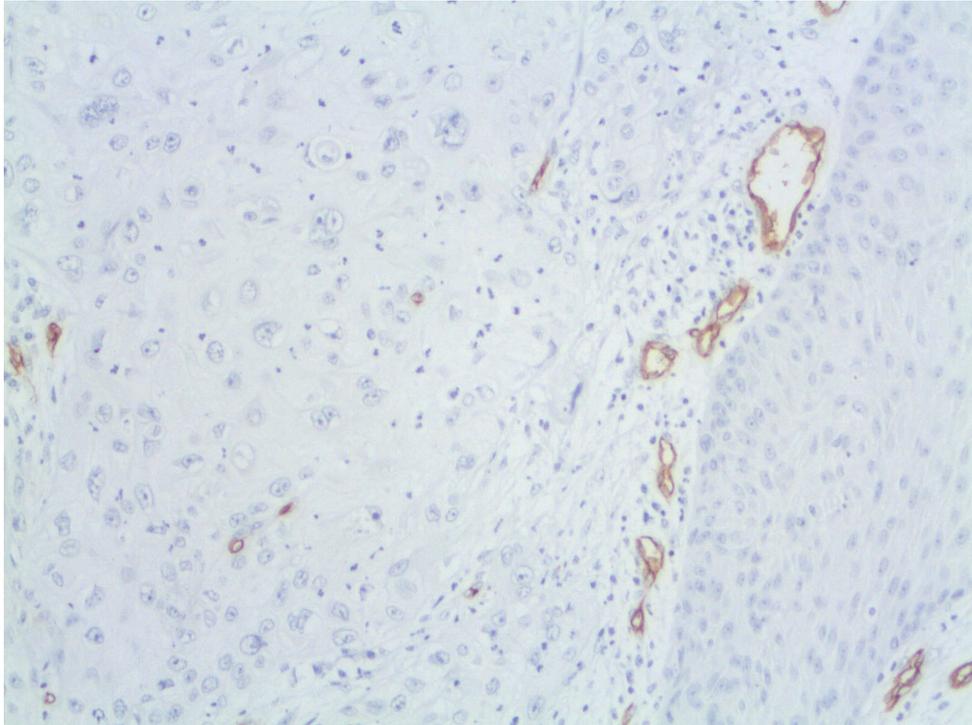
**Tab. 29** Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Zellen des Carcinoma in situ mit SPARC und TGF- $\beta$  (*n* (%))

## b) Plattenepithelkarzinom

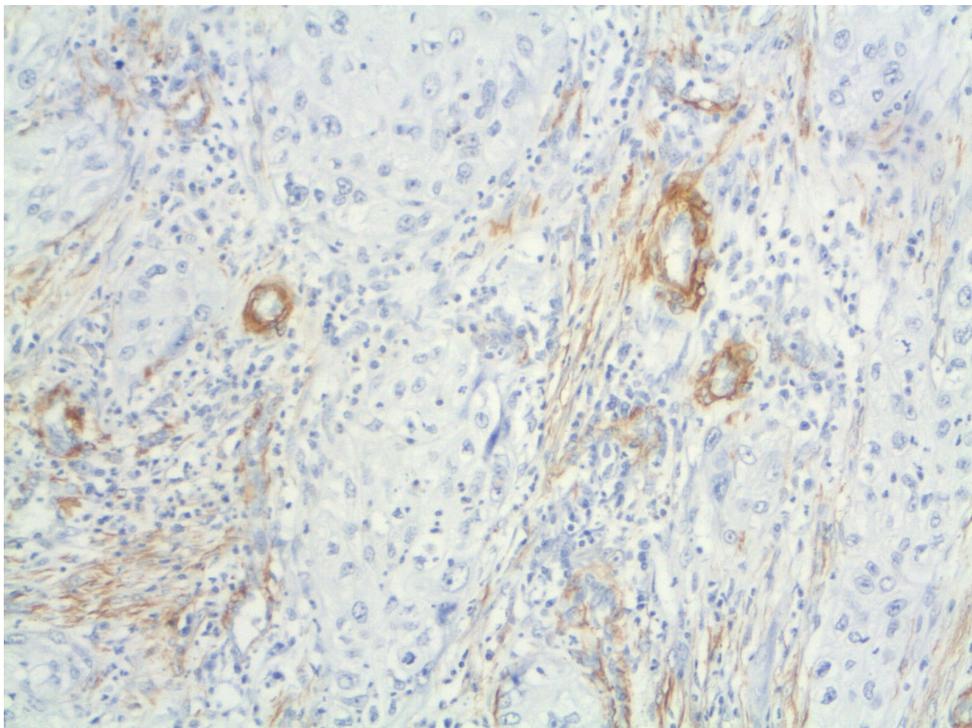
*CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten:* In keinem dieser Fälle konnten CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im Stroma des Plattenepithelkarzinoms dargestellt werden. In einem Fall kamen im gesunden Stroma der Penishaut konstant dicht gelegene CD34<sup>+</sup> Fibrozyten zur Darstellung. Am Übergang zum Karzinom zeigte sich hier ein abrupter Verlust der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten. Komplementär dazu ließen sich diffuse Anhäufungen von  $\alpha$ -SMA- und SPARC-reaktiven Myofibroblasten im Stroma des Karzinoms nachweisen. In den übrigen 8 Fällen konnte formal nicht von einem Verlust der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten gesprochen werden, da diese im gesunden Stroma der Penishaut kaum oder nur inkonstant in einem geringen Anteil des Stromas nachzuweisen waren. Lediglich Gefäßendothelien zeigten sich konstant CD34-positiv. In 6 der insgesamt 9 Fälle ließen sich homogen dicht gelagerte  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten im gesamten Tumorstroma darstellen. Auffällig zeigte sich hier, dass in 4 von 5 Fällen der Tumoren im Stadium pT2/pT3 im Stroma eine homogen positive Reaktion von  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten auftrat, im niedrigeren Stadium pT1 nur in 2 von 4 Fällen. Lymphozytenreiche Areale waren frei von Myofibroblasten.  $\alpha$ -SMA konnte hier nur in glatter Muskulatur der Schwellkörper und der Gefäße nachgewiesen werden.

	CD34				$\alpha$ -SMA			
	-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Tumorstroma</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>6</b>
<i>n</i>	<b>(100)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(33)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(66)</b>
<i>(%)</i>								
pT1	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
<i>n</i>	<b>(100)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(50)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(50)</b>
<i>(%)</i>								
pT2/ pT3	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>
<i>n</i>	<b>(100)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(20)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(80)</b>
<i>(%)</i>								
<b>Tumorzellen</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>n</i>	<b>(100)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(100)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>
<i>(%)</i>								
pT1	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>n</i>	<b>(100)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(100)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>
<i>(%)</i>								
pT2/ pT3	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>n</i>	<b>(100)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(100)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>	<b>(0)</b>
<i>(%)</i>								

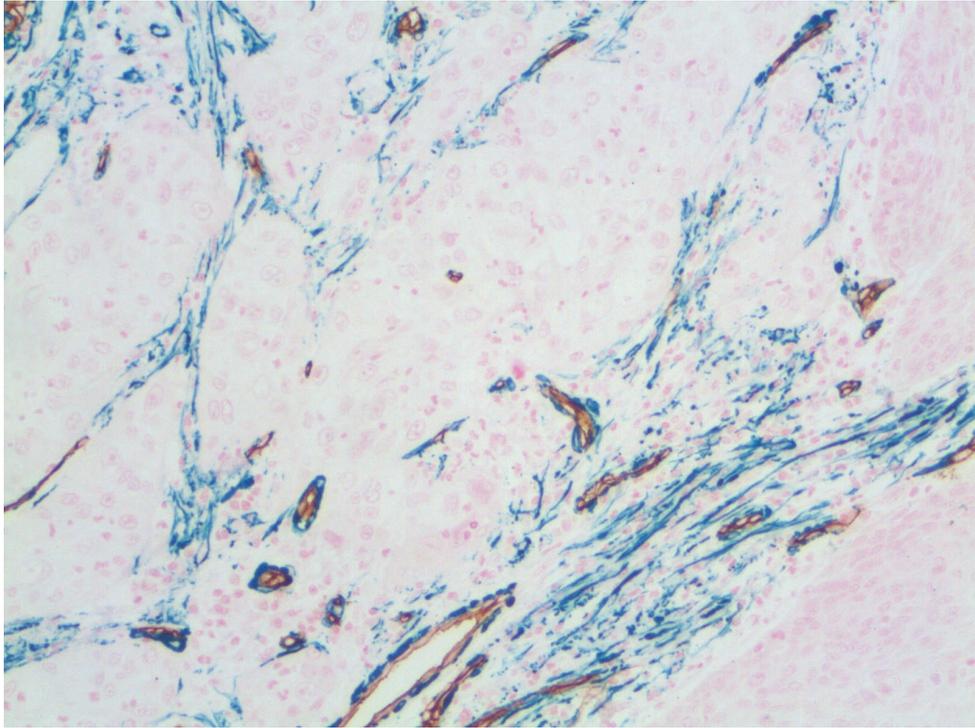
**Tab. 30** *Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 9 Plattenepithelkarzinomen des Penis mit CD34 und  $\alpha$ -SMA in Abhängigkeit von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors (pT1 und pT2/3) nach TNM (n (%))*



**Abb. 30** Immunhistochemie CD34: Im Stroma des Plattenepithelkarzinoms des Penis lassen sich keine CD34<sup>+</sup> Fibrozyten darstellen. Lediglich die Endothelien der im Tumorstroma gelegenen Gefäße zeigen eine deutlich positive Reaktion.



**Abb. 31** Immunhistochemie  $\alpha$ -SMA: Im Tumorstroma des Plattenepithelkarzinoms erscheinen parallel angeordnete  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten, die sich im normalen Penis nicht darstellen ließen. Zusätzlich zeigen sich die Myoepithelien der Gefäße positiv.

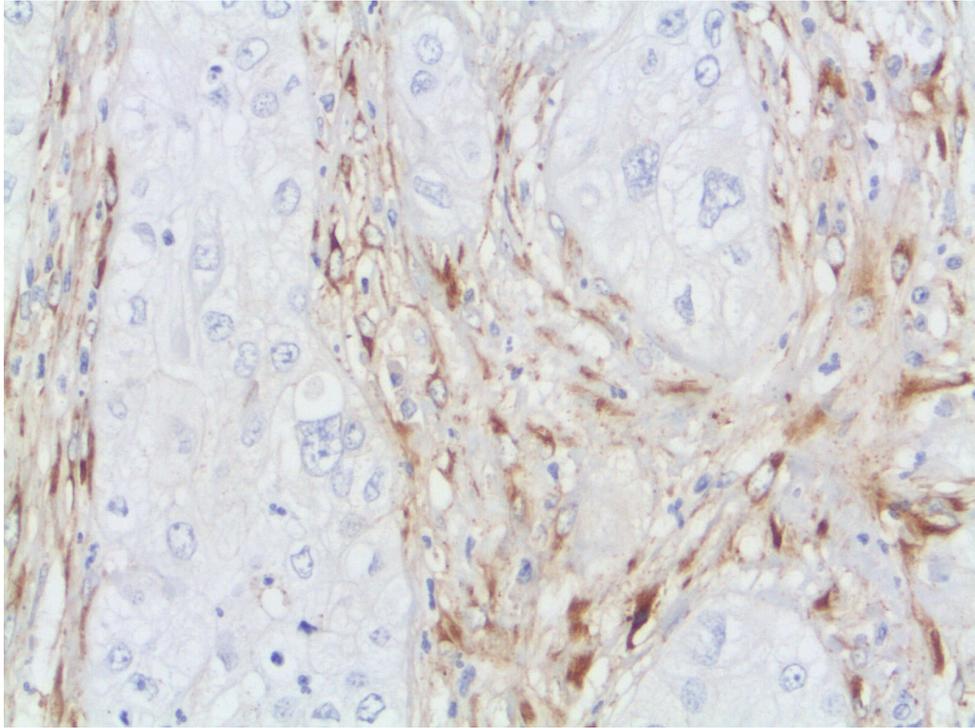


**Abb. 32** Immunohistochemische Doppelfärbung von CD34 und  $\alpha$ -SMA: Das Tumorstroma des Plattenepithelkarzinoms des Penis ist frei von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten, dafür erscheinen reichlich  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten, die sich parallel zum Tumorstroma anordnen. Beachte die höhere Sensitivität der Doppelfärbung im Vergleich zur Einzelfärbung.

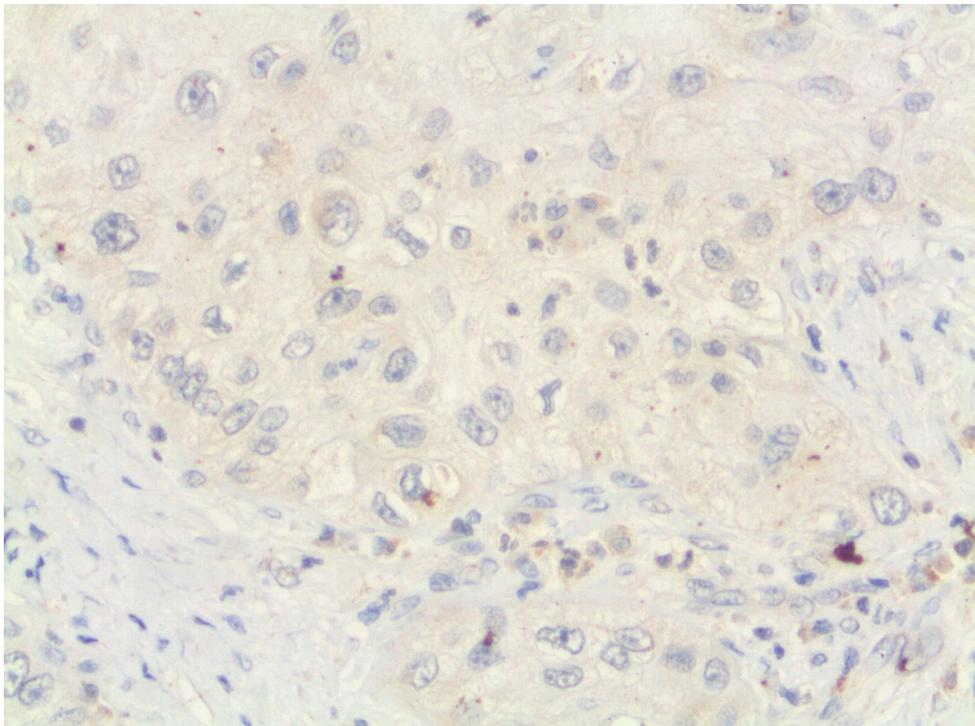
*TGF-β und SPARC:* In 5 der 6 Fälle, in denen  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten im Tumorstroma auftraten, zeigte sich in diesen Fällen zudem eine Reaktivität für SPARC. Der Anteil dieser SPARC-positiven Zellen am Stroma variierte stark, wobei die positive Reaktivität in allen Stadien (pT1 bis pT3) zu finden war. In 3 der insgesamt 9 Fälle ließen sich kaum  $\alpha$ -SMA- und SPARC-positive Myofibroblasten nachweisen. Eine Reaktion mit TGF- $\beta$  konnte in Mastzellen beobachtet werden, nicht jedoch im Tumorstroma oder in Tumorzellen.

	SPARC					TGF- $\beta$			
	-	-/+	+/-	+		-	-/+	+/-	+
<b>Tumorstroma</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>		<b>9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>n</i>	<b>(44)</b>	(11)	(11)	(33)		<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)
<i>(%)</i>									
pT1	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>		<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>n</i>	<b>(50)</b>	(25)	(0)	(25)		<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)
<i>(%)</i>									
pT2/ pT3	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>		<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>n</i>	<b>(40)</b>	(0)	(20)	<b>(40)</b>		<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)
<i>(%)</i>									
<b>Tumorzellen</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>		<b>9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>n</i>	<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)		<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)
<i>(%)</i>									
pT1	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>		<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>n</i>	<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)		<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)
<i>(%)</i>									
pT2/ pT3	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>		<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>n</i>	<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)		<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)
<i>(%)</i>									

**Tab. 31** *Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von 9 Plattenepithelkarzinomen des Penis mit SPARC und TGF- $\beta$  in Abhängigkeit von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors (pT1 und pT2/3) nach TNM (n (%))*



**Abb. 33** Immunhistochemie SPARC: Im Großteil der Fälle lässt sich im Stroma des Plattenepithelkarzinoms eine positive Reaktivität für SPARC nachweisen. Zudem zeigten auch die Endothelien der Gefäße eine charakteristische Reaktion mit dem verwendeten Antikörper.



**Abb. 34** Immunhistochemie TGF- $\beta$ : Eine Reaktion kann weder im Stroma noch in den Tumorzellen des Plattenepithelkarzinoms nachgewiesen werden. Nur Mastzellen zeigen eine charakteristische Reaktion für TGF- $\beta$  (rechts unten).

### c) Urothelkarzinom der penilen Urethra

*CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten:* In der vorliegenden Studie wurden 3 Urothelkarzinome der penilen Urethra untersucht. Diese zeigten zum Teil heterogene Reaktionen, die auf das Wachstumsmuster der Karzinome zurückzuführen waren. In zwei Fällen handelte es sich um infiltrierend wachsende Urothelkarzinome, in deren Stroma- also meist im Gebiet der an CD34<sup>+</sup> Fibrozyten-reichen Urethra- keine CD34<sup>+</sup> Fibrozyten nachgewiesen werden konnten. In direkter Nähe zu den Tumorzellen stellten sich plumpe, spindelförmige  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten dar. Beim dritten Fall handelte es sich um ein Urothelkarzinom, das sich innerhalb des Lumens der Schwellkörperkavernen ausbreitete, jedoch nicht das umgebende Stroma infiltrierte. Hier konnte keine Veränderung der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten- Population im Vergleich zum normalen Penisgewebe festgestellt werden: Im Stroma der Urethra fanden sich reichlich CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in direkter Nähe zu den intraluminal wachsenden Tumormassen. Mit zunehmendem Abstand zur Urethra nahm die Dichte dieser Zellen ab. In der Peripherie des intraluminal durchsetzten Corpus spongiosum waren keine CD34<sup>+</sup> Fibrozyten mehr nachweisbar.  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten lagerten sich parallel zu den Schwellkörperendothelien an und konnten nur in CD34<sup>+</sup> Fibrozyten-reichen Gebieten in Nähe zum intraluminalen Tumor dargestellt werden. In der Doppelfärbung stellten sich in diesem Areal zwei komplett verschiedene Zelltypen dar.

	CD34				$\alpha$ -SMA			
	-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Tumorstroma</b> <i>n</i> (%)	<b>2</b> <b>(67)</b>	0 (0)	1 (33)	0 (0)	0 (0)	<b>1</b> <b>(33)</b>	<b>1</b> <b>(33)</b>	<b>1</b> <b>(33)</b>
<b>Tumorzellen</b> <i>n</i> (%)	<b>3</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>3</b> <b>(100)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)

**Tab. 32** *Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen des Urothelkarzinoms der penilen Urethra mit CD34 und  $\alpha$ -SMA (n (%))*

*TGF- $\beta$  und SPARC:* In den Stromaarealen in Nähe des intraluminal wachsenden Urothelkarzinoms zeigte das Stroma zudem eine positive Reaktivität für SPARC, während das Stroma der beiden invasiven Urothelkarzinome keine SPARC-Reaktivität zeigte. Die Karzinomzellen wiesen in 2 Fällen unabhängig vom Wachstumsmuster eine positive Reaktivität für TGF- $\beta$  auf.

		SPARC				TGF- $\beta$			
		-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Tumorstroma</b>	<i>n</i>	<b>2</b>	0	1	0	<b>3</b>	0	0	0
	(%)	<b>(67)</b>	(0)	(33)	(0)	<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)
<b>Tumorzellen</b>	<i>n</i>	<b>3</b>	0	0	0	1	0	0	<b>2</b>
	(%)	<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)	(33)	(0)	(0)	<b>(67)</b>

**Tab. 33** Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen des Urothelkarzinoms der penilen Urethra mit SPARC und TGF- $\beta$  (*n* (%))

#### d) Malignes Melanom

*CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten:* In dem malignen Melanom des Penis zeigte sich ein kompletter Verlust der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten. Lediglich Gefäßendothelien waren CD34-positiv. Hier konnten keine  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten im Stroma des Melanoms dargestellt werden.

		CD34				$\alpha$ -SMA			
		-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Tumorstroma</b>	<i>n</i>	<b>1</b>	0	0	0	<b>1</b>	0	0	0
	(%)	<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)	<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)
<b>Tumorzellen</b>	<i>n</i>	<b>1</b>	0	0	0	<b>1</b>	0	0	0
	(%)	<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)	<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)

**Tab. 34** Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen von einem Malignen Melanom des Penis mit CD34 und  $\alpha$ -SMA (*n* (%))

*TGF- $\beta$  und SPARC:* Der Großteil der Melanomzellen wies intrazellulär eine starke positive Reaktivität für SPARC auf, während das Tumorstroma keine Reaktion zeigte. Für TGF- $\beta$  war sowohl im Stroma als auch in den Tumorzellen keinerlei Reaktivität zu vermerken.

		SPARC				TGF- $\beta$			
		-	-/+	+/-	+	-	-/+	+/-	+
<b>Tumorstroma</b>	<i>n</i>	<b>1</b>	0	0	0	<b>1</b>	0	0	0
	(%)	<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)	<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)
<b>Tumorzellen</b>	<i>n</i>	0	0	0	<b>1</b>	<b>1</b>	0	0	0
	(%)	(0)	(0)	(0)	<b>(100)</b>	<b>(100)</b>	(0)	(0)	(0)

**Tab. 35** Semiquantitative Auswertung der Reaktionen des Stromas und der Tumorzellen des Malignen Melanoms des Penis mit SPARC und TGF- $\beta$  (*n* (%))

## 5. Diskussion

CD34<sup>+</sup> Fibrozyten bilden beim Menschen einen grundlegenden Bestandteil des Stromas vieler Organe. Sie lassen sich im Stroma des Gastrointestinaltrakts, des Urogenitaltrakts und des Respirationstrakts sowie im Stroma von Haut, Mamma, Schilddrüse, Herz, Peritoneum und Cornea nachweisen (Tab. 1). Über das Vorkommen und die Verteilung der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in den Organen des männlichen Genitaltrakts war zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Studie nur wenig bekannt. Lediglich Kuroda und Kollegen beschrieben CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im normalen Hoden (Kuroda et al., 2004).

Ziel dieser an Archivmaterial durchgeführten Studie war es, erstmals eine Übersicht über das Vorkommen von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im männlichen Genitaltrakt zu geben und die Unterschiede der Stromazellpopulationen, speziell hinsichtlich CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und  $\alpha$ -SMA-reaktiver Myofibroblasten, in normalem und malignem Gewebe zu veranschaulichen. Dazu wurde normales und malignes Gewebe von Hoden, Prostata, Samenblase, Samenleiter und Penis untersucht und bezüglich des Verteilungsmusters der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten mit dem der  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten semiquantitativ und anhand der Doppelfärbung qualitativ verglichen.

CD34<sup>+</sup> Fibrozyten ließen sich im normalen Hoden, Prostata, Samenblase, Samenleiter und Penis in unterschiedlicher Häufigkeit nachweisen. In allen von uns untersuchten Organen ließ sich konstant eine hohe Dichte an Fibrozyten in Umgebung arterieller Gefäße, in weniger starker Ausprägung auch in Umgebung venöser Gefäße ausmachen. Diese Beobachtung veranlasste Nakayama und Kollegen dazu, Fibrozyten als “adventitial fibroblastic cells“ zu bezeichnen (Nakayama et al., 2003). Insgesamt wiesen Organe mit einem hohen Gehalt an glatter Muskulatur (Prostata, Samenblase, Ductus deferens und Penis) in ihrem Stroma geringere Mengen an ortsständigen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten auf als der Hoden, in dem massenhaft ortsständige CD34<sup>+</sup> Fibrozyten zu finden waren. Dies muss bezüglich der vergleichenden Beurteilung der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im Stroma von normalem und malignem Gewebe beachtet werden. Daher darf ein Fehlen dieser Zellen in diesen Organen nie als Kriterium für Malignität gewertet werden.

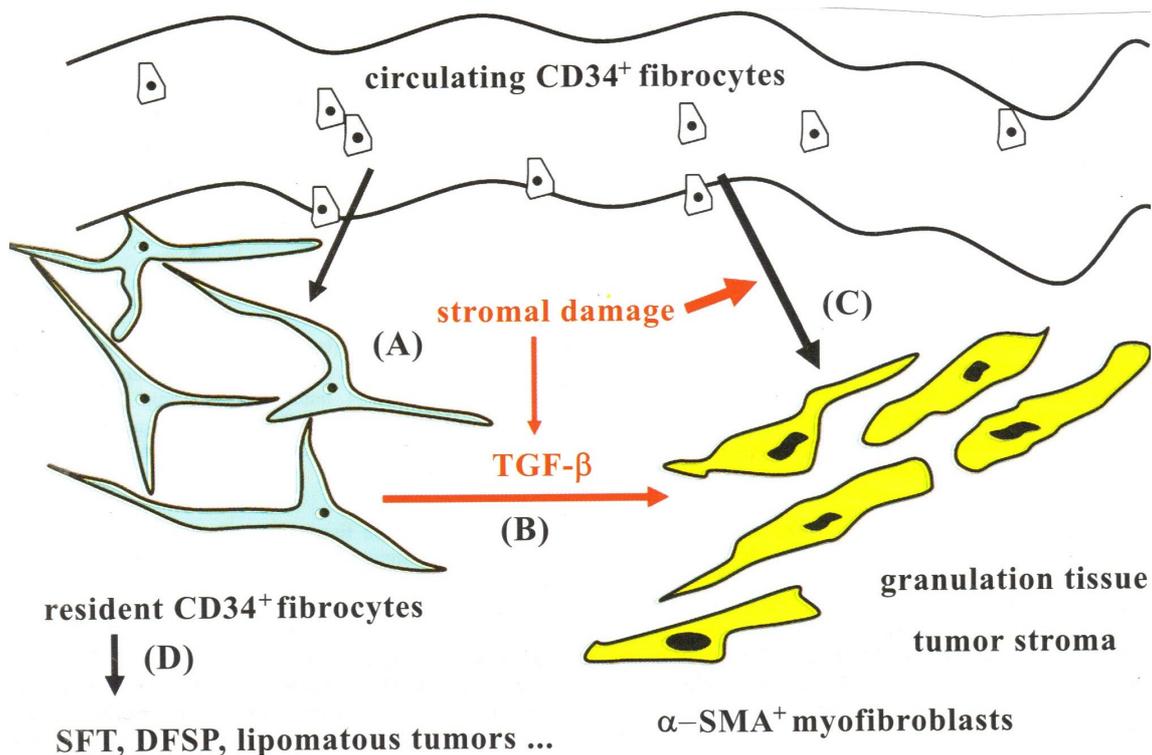
Ein stromaler Verlust der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten ließ sich in den durchgeführten Untersuchungen im Seminom des Hoden sowie im Plattenepithelkarzinom, Urothelkarzinom und Malignem Melanom des Penis beobachten, nicht jedoch beim Prostatakarzinom. Dies zeigte erstaunlicherweise in seinem karzinomnahen Stroma ein gehäuftes Auftreten von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten. Gleichzeitig konnte in allen untersuchten Karzinomen- mit Ausnahme des Malignen Melanoms des Penis - auch ein Auftreten von  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten beobachtet werden. Angesichts ihrer Beteiligung am Stromaumbau dieser Karzinome stellen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten eine potentielle Zielstruktur für die Behandlung maligner Tumore des männlichen Genitaltrakts dar. Aufgrund des veränderten Verteilungsmusters in Karzinomen des männlichen Genitaltrakts erleichtert die An- oder Abwesenheit dieser Zellen die differentialdiagnostische Begutachtung in der histopathologischen Diagnostik. Auf die einzelnen Organe und die zugehörigen Karzinome soll später genauer eingegangen werden.

### **5.1. Pathogenese des Stromaumbaus**

Der karzinomassoziierte Verlust der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten ist aber nicht allein auf die Karzinome des männlichen Genitaltrakts beschränkt, vielmehr wurden ähnliche Ergebnisse beim Basalzellkarzinom und Malignem Melanom der Haut sowie in Karzinomen der Mamma, der Lunge, der Mundhöhle, des Pharynx und des Larynx, des Magen und Dickdarms, des Pankreas, der Harnblase und der Cervix uteri überliefert (Tab. 2). Man misst diesen stromalen Veränderungen mit einem Verlust der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und einem Gewinn an  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten eine substantielle Bedeutung im Rahmen der Pathophysiologie eines malignen Wachstums zu. Es lässt mutmaßen, dass das Fehlen der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten eine Voraussetzung für die lokale Tumorausbreitung sein könnte. Normalerweise führt ein Gewebeschaden zu einer sofortigen Zuwanderung von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in das betroffene Gewebe (Bucala et al., 1994). Dieser Mechanismus scheint in vielen Karzinomen aufgehoben zu sein. Aufgrund der fehlenden Antigenpräsentation und T-Zellprägung entgehen entartete Zellen der durch CD34<sup>+</sup> Fibrozyten vermittelten Immunantwort (Chesney et al., 1997). Durch Bildung diverser Adhäsionsmoleküle bewirken CD34<sup>+</sup> Fibrozyten die Ausbildung und Erhaltung des retikulären Netzwerks (Chesney et al., 1997; Majdic et

al., 1994). Folglich führt ein Verlust dieser Zellen zu einer Deadhäsion des Bindegewebes und damit möglicherweise zu einer erleichterten Ausbreitung des Karzinoms innerhalb des Stromas.

Woher resultieren diese phänotypischen Veränderungen im karzinomassoziierten Stroma? Die Mechanismen, die diesen Prozess beeinflussen, sind bis heute nicht eindeutig geklärt. Es ist wahrscheinlich, dass sich der phänotypische Wandel des Stromas in erster Linie in einer präexistenten Zellpopulation von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten abspielt (Abb. 35): Im karzinomatösen Stroma differenzieren sie zu  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten, ohne dabei in erhöhtem Ausmaß in Apoptose zu gehen. Man vermutet, dass die zwei Matrixproteine TGF- $\beta$  und SPARC eine entscheidende Rolle bei diesen Veränderungen im Tumorstroma spielen: TGF- $\beta$  ist ein Wachstum-regulierendes Zytokin, das wie die CD34<sup>+</sup> Fibrozyten an den Prozessen der Wundheilung beteiligt ist (Abe et al., 2001). TGF- $\beta$  stimuliert in geschädigtem Gewebe, also auch im Tumorstroma, die Transformierung von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten zu  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten (Abe et al., 2001; Espana et al., 2004).



**Abb. 35** Übersicht über die Pathogenese des Stromaumbaus bei Tumoren und anderen Gewebeschäden (Abb. aus: Barth u. Westhoff, 2007): Nach Schädigung des Gewebes dringen zirkulierende CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in das betroffene Gewebe ein (A). Nach Stimulation durch TGF-β differenzieren sowohl ortsständige (B) als auch zirkulierende (C) Fibrozyten im Gewebe zu α-SMA-reaktiven Myofibroblasten, ohne dabei in erhöhtem Ausmaß in Apoptose zu gehen. Den ortsständigen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten wird zudem eine bedeutsame Rolle bei der Entstehung mesenchymaler Tumoren zugeschrieben (D).

TGF-β vermittelt neben der Entstehung der α-SMA-reaktiven Myofibroblasten auch eine gesteigerte Expression von SPARC im Stroma (Abe et al., 2004; Reed et al., 1994; Schiemann et al., 2003). SPARC, auch Osteonectin oder BM-40 genannt, ist ein Matrixprotein, das eine Deadhäsion der Stromazellen und damit eine Auflockerung des Stromas bewirkt (Bradshaw u. Sage, 2001; Murphy-Ullrich, 2001; Framson u. Sage, 2004). So ist es möglich, dass in einem durch SPARC aufgelockerten Stroma die Invasion eines Karzinoms zusätzlich erleichtert wird.

In der Vergangenheit konnte bei diversen Tumoren eine stromale Expression von SPARC beobachtet werden (Barth et al., 2005; Porter et al., 1995; Iacobuzio-Donahue et al., 2002; Wessel et al., 2008). In unseren Untersuchungen ließ sich SPARC im Stroma aller untersuchten Karzinomarten darstellen, wobei das Ausmaß und die

Erscheinungsform in den verschiedenen Geweben deutlich variierte. Beispielsweise zeigten beim Malignen Melanom des Penis ausschließlich die Tumorzellen eine Reaktivität für SPARC. Im Plattenepithelkarzinom des Penis, im Prostata- und Urothelkarzinom fand man SPARC in deutlich unterschiedlicher Ausprägung im Tumorstroma. Eine Sonderstellung nahmen hierbei die Seminome ein, die sowohl eine zelluläre als auch eine stromale SPARC-Reaktivität aufwiesen. Die unterschiedliche Ausprägung bei verschiedenen Karzinomen verdeutlicht die Notwendigkeit, die Mechanismen und die Regulation des Auftretens von SPARC in Karzinomen weiter zu ergründen und das Wissen zu komplettieren. Vielleicht gelingt es dadurch, einen neuen Therapieansatz für die Behandlung maligner Tumore zu schaffen.

TGF- $\beta$  ließ sich in den von uns untersuchten Karzinomen alleinig in Zellen des Prostatakarzinoms nachweisen. Die übrigen untersuchten Karzinome wiesen keine Reaktion für diesen Antikörper auf.

## **5.2. Hoden**

### **5.2.1. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten in normalem und malignem Stroma des Hoden**

Das Stroma des normalen Hoden bestand vornehmlich aus CD34<sup>+</sup> Fibrozyten, die im peritubulären Gewebe sowie um die Leydigzellen herum ein dichtes retikuläres Netzwerk bildeten. Auch in der äußeren Lamina propria zeigten sich CD34<sup>+</sup> Fibrozyten, die die Hodenepithelien konzentrisch umgaben. In diesem Falle wäre eine ultrastrukturelle Untersuchung des Hodengewebes von großem Interesse, die vermutlich die Gap Junctions zwischen den kommunizierenden Zellausläufern des retikulären Netzwerkes erkennen ließe. Besonders bemerkenswert war, dass sich sowohl in der inneren Schicht der Lamina propria als auch in der Tunica albuginea zahlreiche  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten darstellten. Das Auftreten dieser beiden Zellarten im Stroma des Hoden wurde bereits von Kuroda und Kollegen ausführlich beschrieben. Durch zusätzliche Verwendung des glattemuskelspezifischen Antikörpers h-Caldesmon konnten sie die  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten in Lamina Propria und Tunica albuginea von glatten Muskelzellen abgrenzen (Kuroda et al., 2004). Wir stimmen mit der Hypothese von Kuroda und Kollegen überein, dass den Myofibroblasten auf Grund ihrer kontraktiven Eigenschaften eine wichtige Rolle beim Transport der Spermien obliegen

muss.

In den durchgeführten Untersuchung an Seminomen des Hoden ließ sich wie in vielen anderen Karzinomen (Tab. 3) in allen Fällen ein Verlust der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und komplementär ein Erscheinen von  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten im karzinomassoziierten Stroma beschreiben. Hier scheint es plausibel, dass die präexistente Zellpopulation von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im karzinomatösen Stroma zu  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten differenziert. Da das Tumorstroma dennoch in 5 der 14 Fälle in einem geringen Anteil CD34<sup>+</sup> Fibrozyten aufwies, stellt der Verlust dieser Zellen ein durchaus hilfreiches, jedoch nicht reliables Merkmal zur Unterscheidung von normalem und seminotösem Gewebe des Hoden dar. In allen untersuchten Seminomen waren Myofibroblasten im Tumorstroma nachweisbar. Es stellt sich die Frage, ob diese phänotypischen Veränderungen für Seminome des Hoden spezifisch sein könnten. Um hierfür eine sichere Aussage machen zu können, sind zukünftig Untersuchungen anderer bösartiger aber auch gutartiger Läsionen des Hodens hinsichtlich des Verlusts der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und des Auftretens von  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten durchzuführen.

### **5.2.2. SPARC und TGF- $\beta$ in normalem und malignem Stroma des Hoden**

Im normalen Hoden zeigten Sertoli-, Keim- und Leydigzellen eine charakteristische intrazelluläre Reaktion für SPARC. Nach Meinung von Wilson und Kollegen soll SPARC sogar schon während der fetalen Entwicklung des Hoden eine wichtige Rolle bei der Wachstumsregulation und Differenzierung von Hodenzellen übernehmen (Wilson et al., 2006). Wir konnten somit zeigen, dass SPARC auch nach Abschluss der Entwicklung bis ins höheren Lebensalter weiterhin in Hodenzellen exprimiert wird.

Das Tumorstroma zeigte im Vergleich zum normalen Stroma eine positive Reaktion für SPARC. Auch in Seminomzellen fand man in variablem Ausmaß eine positive Reaktion für SPARC. Hierbei ließ sich keine Assoziation zwischen stromalem und intrazellulärem Auftreten von SPARC zeigen. Da für die Seminome zum Zeitraum der Diagnose nur die lokale Tumorausdehnung nach TNM bekannt war (pNX pMX in allen Fällen), wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der lokalen Ausdehnung und einer

positiven Reaktion für SPARC bestand: Es konnten in allen Stadien positive stromale sowie positive intrazelluläre Reaktionen für SPARC beobachtet werden, wobei die höheren Stadien (pT2/pT3) tendenziell häufiger eine positive Reaktion zeigten. Dies ist jedoch vorsichtig zu bewerten, da lediglich 4 Fälle eines höheren Stadiums (pT2/ pT3) in den untersuchten Fällen vertreten waren. Für Melanome wurde berichtet, dass intrazelluläres SPARC in Tumorzellen entscheidend die Regulation des Tumorstwachstums beeinflusst (Prada et al., 2007), wohingegen extrazellulär exprimiertes SPARC in Nähe von Karzinomen vor allem die Deadhäsion des Stromas, also die lokale Tumorausbreitung ermöglicht (Bradshaw u. Sage, 2001; Murphy-Ullrich, 2001; Framson u. Sage, 2004). Das stromale und intrazelluläre Auftreten von SPARC in Seminomen deutet darauf hin, dass dieses Matrixprotein eine wichtige Rolle bei der Wachstumsregulation sowie bei der Ausbreitung der Seminomzellen innerhalb des Stromas von Seminomen spielen könnte. Da normale Hodenepithelien regelmäßig SPARC exprimierten, kann man das Vorkommen von SPARC in Seminomen des Hoden auch von einem anderen Gesichtspunkt betrachten. So könnte man bei SPARC-negativen Seminomen von einem Verlust der intrazellulären SPARC-Expression ausgehen. Es wird sogar angenommen, dass SPARC in bestimmten Geweben auch als Tumorsuppressor fungieren kann (Tai u. Tang, 2008). Bei Kolonkarzinomen wird die stromale Expression von SPARC sogar als günstiger prognostischer Faktor diskutiert, Karzinome mit einer geringen stromalen SPARC Expression sollen demnach mit einer schlechten Prognose assoziiert sein (Liang et. al., 2010). Hier wird klar, welche komplexe Rolle SPARC spielen könnte, so dass weitere genauere molekularbiologische Untersuchungen nötig scheinen, um Klarheit hinsichtlich der pathophysiologischen Veränderungen in Seminomen zu schaffen.

Für TGF- $\beta$  konnte gezeigt werden, dass ausschließlich Leydigzellen des Interstitiums eine positive Reaktion für diesen Antikörper aufwiesen. Bereits 1987 konnten Lin et al. einen inhibitorischen Effekt von TGF- $\beta$  auf die Steroidsynthese normaler Leydigzellen nachweisen (Lin et al., 1987). Hier wäre es interessant zu untersuchen, wie sich TGF- $\beta$  in Tumoren der Leydigzell-Linie verhält. In Tumorzellen und im Stroma von Seminomen war keine Reaktivität für TGF- $\beta$  nachweisbar, obwohl hier reichlich  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten im Stroma des Seminoms vorhanden waren.

### 5.3. Prostata

#### 5.3.1. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten in normalem und malignem Stroma der Prostata

Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Stroma der Prostata nur wenig ortsständige CD34<sup>+</sup> Fibrozyten aufweist. Auch  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten ließen sich in der normalen Prostata nicht identifizieren. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten waren lediglich in wenigen Fällen fokal in direkter Nähe des Prostataepithels nachweisbar, wobei hier keine Assoziation zwischen dem Aktivitätszustand des Prostataepithels und dem Auftreten der Zellen zu beobachten war.

Bei der Untersuchung von 30 Adenokarzinome der Prostata war ein äußerst erstaunliches Ergebnis zu vermerken. Im Gegensatz zu der an CD34<sup>+</sup> Fibrozyten-armen normalen Prostata wies das Stroma der Karzinome in 22 der 30 Fälle eine positive Reaktion für CD34 auf, wobei dies in der Mehrzahl der Fälle mehr als die Hälfte des Tumorstromas betraf. Daher nimmt das Prostatakarzinom eine Sonderstellung unter den Karzinomen des männlichen Genitaltrakts ein. Hier konnte gezeigt werden, dass nach Entstehung eines Karzinoms CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im Tumorstroma erscheinen, die im normalen Stroma vorher nicht nachweisbar waren. Das Verteilungsmuster der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im Tumorstroma stellte sich zumeist inhomogen dar. Die meisten dieser Zellen ließen einen schlanken Aufbau mit zarten bipolaren Zellausläufern erkennen. Auch in Samenblasen war dieses Phänomen nach Infiltration durch ein Prostatakarzinom zu beobachten. Auch das Auftreten von  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten war im Vergleich zu anderen epithelialen Tumoren nur sehr vereinzelt nachweisbar. Auf Grund des hohen Anteils  $\alpha$ -SMA-positiver glatter Muskulatur in der Prostata war die Identifizierung  $\alpha$ -SMA-reaktiver Myofibroblasten punktuell erschwert. Um hier eine Verfälschung des Ergebnisses zu vermeiden, hätte man die Untersuchung durch andere Glattmuskel-spezifische Marker wie h-Caldesmon und Desmin ergänzen können. Überwiegend waren jedoch kräftige Muskelfasern im Stroma der Karzinome zu erkennen, die nicht den morphologischen Kriterien für Myofibroblasten entsprachen.

Es stellt sich vor diesem Hintergrund die Frage, wieso CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im Stroma der Prostatakarzinome neu in Erscheinung treten, während sie im Stroma anderer

Karzinome verschwinden. Ähnliches wurde von Artico et al. für die Gallenblase berichtet. Die normale Gallenblase ist frei von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten, im Stroma des Adenokarzinoms der Gallenblase sind aber CD34<sup>+</sup> Fibrozyten nachweisbar (Artico et al., 2010). Auffallend ist, dass ein karzinomassoziierter Verlust dieser Zellen in solchen Organen beschrieben wurde, die initial eine hohe Zahl an ortsständigen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten aufwiesen (Barth et al., 2002a, 2002b, 2002c, 2004, 2005; Humphreys et al., 2000; Illueca et al., 1998; Kirchmann et al., 1994, 1995; Nakayama et al., 2000, 2001, 2003; Ramaswamy et al., 2003; Swanson et al., 1998). Möglicherweise unterliegen Organe wie Prostata, Samenblase und Gallenblase, die reich an glatter Muskulatur und arm an ortsständigen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten sind, anderen biologischen Regulationsmechanismen als Organe, in deren Stroma eine Vielzahl von ortständigen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten vorhanden sind.

Da in der normalen Prostata wenige oder keine ortsständigen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten nachweisbar waren, muss der Umbau des Stromas einem anderen Mechanismus unterliegen. Zirkulierende Fibrozyten besitzen spezielle Chemokinrezeptoren, die ihre Migration in geschädigtes Gewebe vermitteln (Abe et al., 2001). So dringen sie sehr schnell in geschädigtes Gewebe ein und leiten neben immunologischen Funktionen und Matrixproduktion die Reparatur des Gewebes ein (Bucala et al., 1994; Chesney et al., 1997). Auch ein Karzinom stellt einen solchen Gewebeschaden dar. Deswegen kann man vermuten, dass zirkulierende CD34<sup>+</sup> Fibrozyten über Endothelien die Blutbahn verlassen und in das durch ein Prostatakarzinom geschädigte Gewebe einwandern. Hier könnten sie durch ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation und T-Zell-Prägung (Bucala et al., 1994; Chesney et al., 1997) eine wichtige immunologische Rolle bei der Bekämpfung maligner Zellen in der Prostata spielen. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten sind ferner in der Lage, verschiedenste Angiogenese-stimulierende Faktoren zu sezernieren (Hartlapp et al., 2001), so dass ihre Anwesenheit im Tumorstroma die Angiogenese und Ausbreitung der Adenokarzinome stimulieren könnte. Welche Funktionen diese Zellen im Stroma des Prostatakarzinoms genau übernehmen und warum sie im Gegensatz zu anderen Karzinomen plötzlich im Tumorstroma erscheinen, bleibt weiterhin rätselhaft und bedarf weiterer Abklärung. Ebenso unklar bleibt die Frage, warum das Auftreten  $\alpha$ -SMA-reaktiver Myofibroblasten im Stroma des Prostatakarzinoms in der Mehrzahl der Fälle ausblieb. Es wäre möglich, dass der Stimulus für den phänotypischen Wandel

ausbleibt und somit die durch die Endothelien invadierten CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im Gewebe persistieren und nicht zu Myofibroblasten differenzieren. Die genauen Mechanismen und Abläufe im Stroma der Prostatakarzinome sollten daher zukünftig durch weitere zell- und molekularbiologische Untersuchungen genauer beleuchtet werden.

### **5.3.2. Das Auftreten von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in Abhängigkeit von Tumorstadium und Gleason-Score**

Zum Zeitpunkt der Diagnose der untersuchten Prostatakarzinome war der Differenzierungsgrad (Gleason-Score) sowie die lokale Tumorausbreitung (pT) und der Lymphknotenstatus (pN) nach TNM bekannt (nicht aber die Information über Vorhandensein von Fernmetastasen (pMX)). Besonders auffällig war, dass Karzinome eines höheren Gleasonscores (GS>7) und eines fortgeschrittenen Stadiums (pN1, pT3/4) häufiger einen höheren Gehalt an Fibrozyten aufwiesen als die entsprechenden niedrigeren Stadien. Dieses Ergebnis kann möglicherweise durch den direkten Einfluß des Gleason-Scores auf das Tumorstadium bei Prostatakarzinomen erklärt werden (Humphrey, 2004). Es ist erstaunlich, dass insbesondere Prostatakarzinome eines höheren Entdifferenzierungsgrades größere Mengen an CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in ihrem Stroma beinhalten. Gerade solche Tumoren sind durch ein diffuses und unscharf infiltrierendes Wachstumsverhalten gekennzeichnet. Interessanterweise konnten ähnliche Ergebnisse auch in anderen diffus wachsenden Karzinomen gefunden werden: So berichteten Nakayama und Kollegen im Jahre 2001, dass bei Magenkarzinomen des diffusen Typs nach Lauren in der Mehrzahl der Fälle CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im Stroma vorhanden waren. Wie auch bei unseren Ergebnissen konnte dieses Phänomen ebenfalls bei fortgeschrittenen Adenokarzinomen des Magens beobachtet werden (Nakayama et al., 2001). Auch invasive lobuläre Mammakarzinome zeigten in zwei Dritteln der Fälle den Erhalt von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in ihrem Stroma. Die Ausbreitung dieses speziellen Typs von Mammakarzinom ist meist diffus und ohne Begrenzung (Ebrahimsade et al., 2007). Daher vermuten wir, dass vor allem Karzinome eines diffus verstreut-zelligen Wachstumsmusters durch einen Zugewinn an CD34<sup>+</sup> Fibrozyten begleitet werden. Becker und Kollegen berichteten schon 1994 darüber, dass in Magenkarzinomen des diffusen Typs ein diffuses Wachstumsmuster mit einem Funktionsverlust von E-

Cadherin und folglich mit einem Verlust der Zell-Zell-Adhäsion einhergeht (Becker et al., 1994). Auch in Prostatakarzinomen konnte dieser Funktionsverlust von E-Cadherin als Marker für Differenzierung und Invasivität des Prostatakarzinoms identifiziert werden (Otto et al., 1993). Diese Beobachtungen und das simultane Auftreten von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in diesen ausgewählten Karzinomen deuten auf eine spezielle biologische Bedeutung der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in diesen Tumoren hin. Daher wäre es von großem Interesse, die Beziehung zwischen dem Auftreten von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und dem Verlust von E-Cadherin genauer zu beleuchten.

Die Kombination aus den Ergebnissen, die ein häufigeres Vorhandensein von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in fortgeschrittenen Tumorstadien und höheren Differenzierungsgraden zeigten, und dem Wissen, dass Tumorausbreitung und Gleason-Score heutzutage als verlässliche prognostische Marker gehandelt werden (Humphrey, 2004), lässt zusätzlich eine prognostische Relevanz der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in Adenokarzinomen der Prostata vermuten. Auch bei Adenokarzinomen der Gallenblase wird die stromale Expression von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten als entscheidender prognostischer Faktor gewertet (Artico et al., 2010). Daran lässt sich erkennen, dass diese Zellen in der Zukunft eine wichtige Zielstruktur innovativer Therapien darstellen können.

Ähnliche Befunde ließen sich bereits in anderen Studien für Adenokarzinome der Lunge zeigen, bei denen im Großteil der Fälle der Erhalt von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im Tumorstroma beschrieben wurde, wohingegen in anderen histologischen Typen des Bronchialkarzinoms der typische Verlust dieser Zellen stattfand (Nakayama et al., 2003). So könnte das Auftreten oder der Erhalt der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in Adenokarzinomen von Magen, Lunge, Gallenblase und Prostata eventuell auch im Zusammenhang mit dem speziellen histologischen Typ des Adenokarzinoms stehen.

Im Gegensatz zu Karzinomen des Hoden und des Penis spricht das Auftreten von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in Adenokarzinomen der Prostata für ein Karzinom. Da gleichwohl in 31% der Prostatkarzinome keine CD34<sup>+</sup> Fibrozyten nachweisbar waren - also ein Fehlen von dieser Zellen ein Karzinom nicht ausschließen kann - und gelegentlich in normalen Prostatagewebe fokale Ansammlungen von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten nachweisbar waren, sind CD34<sup>+</sup> Fibrozyten lediglich als Hilfsmittel, nicht aber als verlässliches

Merkmal zur Unterscheidung von gut- und bösartigem Gewebe in der Prostata zu betrachten. Ob ein Auftreten von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in einem Karzinom für ein Adenokarzinom spezifisch ist, muss durch weitere Untersuchungen an Karzinomen eines anderen histologischen Typs überprüft werden, auch wenn solche nur 5% der Prostatakarzinome ausmachen (Karow u. Lang-Roth, 2009).

### **5.3.3. SPARC und TGF- $\beta$ in normalem und malignem Stroma der Prostata**

In unseren Untersuchungen stellte sich das normale Stroma der Prostata mit Ausnahme der Endothelien komplett negativ für SPARC dar. Dahingegen zeigten wir, dass das Stroma der Adenokarzinome in einem Viertel der Fälle eine positive stromale Reaktion für SPARC aufwies, wobei der Anteil SPARC positiver Zellen am gesamten Tumorstroma deutlich schwankte. Auffallend war, dass sowohl SPARC als auch CD34<sup>+</sup> Fibrozyten vermehrt in höheren Tumorstadien und Entdifferenzierungsgraden zu finden waren. Dieses Ergebnis scheint plausibel, da auf diese Weise gerade diffus wachsende, entdifferenzierte Karzinome in das durch SPARC aufgelockerte Stroma eindringen können. Anhand unserer Ergebnisse vermuten wir, dass SPARC auch beim Stromaumbau der Prostatakarzinome beteiligt ist und somit die lokale Tumorausbreitung ermöglichen kann. Da die Expression von TGF- $\beta$  auch in normalen Prostataepithelien exprimiert wird, ist beim Prostatakarzinom eine Beteiligung von TGF- $\beta$  an der Tumorgenese fraglich.

## **5.4. Samenblase und Ductus deferens**

### **5.4.1. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten in normalem Stroma von Samenblase und Ductus deferens**

Wie bei der Prostata fanden sich im Stroma der Samenblase reichlich glatte Muskelzellen, in deren Stroma kaum CD34<sup>+</sup> Fibrozyten zu finden waren. In der Lamina propria der Samenblase zeigten sich fokal nur wenige CD34<sup>+</sup> Fibrozyten, dafür ließen sich hier interessanterweise umso mehr locker verteilte  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten darstellen. Diesen Befund beschrieb bereits eine Studie in Japan zur Verteilung und Rolle der Myofibroblasten in Samenblasen. Demnach sollen diese kontraktile Zellen die Freisetzung der alkalischen Samenblasenflüssigkeit im Rahmen der Ejakulation ermöglichen (Shimasaki et al., 2007).

Ein weiterer außergewöhnlicher Befund konnte in der Muscularis des Ductus deferens beobachtet werden. Hier zeigten sich in 70% der Fälle parallel zu den Muskelfasern verlaufende CD34<sup>+</sup> Fibrozyten. Diese Fibrozyten zeigten einen elongierten, zarten Aufbau und schienen mit der glatten Muskulatur über ihre langen bipolaren Zellfortsätze in Kontakt zu stehen. Da die glatte Muskulatur des Ductus deferens im Rahmen der Ejakulation für die rasche Beförderung der Spermatozoen in die Urethra verantwortlich ist, könnte man vermuten, dass es sich bei diesen speziellen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten um bisher unbekannte Schrittmacherzellen des Samenleiters handeln könnte - ähnlich den von R.Y. Cajal entdeckten Schrittmacherzellen in der Muscularis des Gastrointestinaltrakts. Da sich Cajal-Zellen (Schrittmacherzellen) immunhistochemisch durch einen Nachweis eines spezifischen Rezeptors (c-KIT, CD117) auszeichnen (Benninghoff u. Drenckhahn, 2008), nahmen wir eine immunhistochemische Untersuchung der ausgewählten Ductus deferentes mit dem CD117-Antikörper vor. Leider konnte diese These auf Grund einer fehlenden Reaktivität für den CD117-Antikörper nicht bestätigt werden. Vor diesem Hintergrund bleibt die Frage ungeklärt, warum CD34<sup>+</sup> Fibrozyten inmitten der glatter Muskulatur des Ductus deferens, nicht aber in der von Samenblase und Prostata vorhanden sind.

## **5.5. Penis**

### **5.5.1. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten in normalem und malignem Stroma des Penis**

Das Stroma des normalen Penis ist reich an glatter Muskulatur und Kollagenfasern. Neben diesen Gewebsbestandteilen konnten CD34<sup>+</sup> Fibrozyten mit Ausnahme der Urethra nur wenig und inkonstant nachgewiesen werden. Daraus kann man folgern, dass CD34<sup>+</sup> Fibrozyten keinen guten Indikator zur Abgrenzung von normalem und bösartigem Gewebe im Penis darstellen. Erstaunlicherweise ließen sich in der Penishaut im Vergleich zur übrigen Körperhaut (Wessel et al. 2008, Humphreys et al., 2000; Kirchmann et al., 1994) geringere Mengen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten nachweisen. In 4 von 7 Präparaten waren keine CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in der Penishaut darstellbar. Dies könnte im Sinne eines lockeren deadhäsiven Stromas verstanden werden, das der Penishaut die nötige Verschieblichkeit ermöglicht. Jedoch muss bedacht werden, dass nur in 7 Fällen normale Hautabschnitte des Penis abgebildet waren.

Das Stroma der Urethra zeigte im Gegensatz zum übrigen Penisgewebe in allen Fällen eine positive Reaktion für CD34. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten ließen sich insbesondere in den tieferen Schichten der Lamina propria darstellen. Auch in anderen Hohlorganen wurde die höchste Dichte von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in den tiefer gelegenen kollagenfasernahen Schichten gefunden (Barth et al., 2002a, 2002b, 2002 c, 2004; Nimphius et al., 2006; Yamazaki et al., 1996). Überraschenderweise konnte darüber hinaus eine neue Zellpopulation in der Urethra beschrieben werden: In den oberen Schichten der Lamina Propria fanden sich zarte  $\alpha$ -SMA-positive Zellen, die nach morphologischen Kriterien den Fibrozyten entsprachen. Diese  $\alpha$ -SMA-positiven Fibrozyten ordneten sich parallel zur Basalmembran des urethralen Epithels an. Anhand der Doppelfärbung konnten wir zeigen, dass es sich bei diesen Zellen um zwei unterschiedliche Populationen von Fibrozyten handelte, in denen keine Koexpression von CD34 und  $\alpha$ -SMA stattfand. Dieses Phänomen wurde erstmals von Nimphius und Kollegen für das Stroma der Harnblase beschrieben und gilt somit auch für die Urethra des Penis. Die oberflächlichen  $\alpha$ -SMA-positiven Fibrozyten beinhalten kontraktile Filamente und könnten folglich für die mechanische Belastbarkeit der Urethra verantwortlich sein, während CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in tieferen Schichten möglicherweise den Aufbau der extrazellulärer Matrix gewährleisten (Nimphius et al., 2006).

**a) Plattenepithelkarzinom:** Die Auswertungen der Plattenepithelkarzinome des Penis sind vereinbar mit Untersuchungen an Plattenepithelkarzinomen der Cervix uteri (Barth et al., 2002c) und des Oropharyngealtrakts (Barth et al., 2004). In allen Fällen konnte im Karzinomstroma die Abwesenheit von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und in der Mehrzahl der Fälle eine Expression von  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten belegt werden. Ein Unterschied besteht jedoch in der Tatsache, dass im normalen Stroma der Cervix uteri und des oropharyngealen Trakts konstant ortsständige CD34<sup>+</sup> Fibrozyten nachweisbar waren (Barth et al., 2002c, Barth et al., 2004), während im Stroma der Penishaut nur inkonstant (in 3 von 7 Präparaten) und in den Schwellkörpern kaum CD34<sup>+</sup> Fibrozyten zu vermerken waren. Daher ist die diagnostische Bedeutung der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten bei Plattenepithelkarzinomen des Penis im Vergleich zu denen in der Cervix uteri und des Oropharyngealtrakts eher gering. Da sich in keinem Plattenepithelkarzinom CD34<sup>+</sup> Fibrozyten darstellten, spricht ein Vorhandensein dieser Zellen gegen ein Karzinom und

für normales Gewebe. Jedoch darf die Abwesenheit CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im Penis unter keinen Umständen als Kriterium für Malignität verstanden werden.

Bemerkenswert war, dass sich am Carcinoma in situ der Penishaut eine Schicht aus zahlreichen  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten unterhalb der Basalmembran darstellte, obwohl aufgrund der Trennung durch die Basalmembran keine direkte Interaktion zwischen Stroma und Carcinoma in situ stattfinden konnte. Ähnlich wie beim intraluminal wachsenden Urothelkarzinom stellt sich daher die Frage, warum trotz fehlender direkter Interaktion zwischen Stroma und Tumor Anhäufungen von  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten zu finden waren. Dieser interessante Befund sollte genauer abgeklärt werden.

**b) Urothelkarzinom:** In invasiv wachsenden Urothelkarzinomen der penilen Urethra konnte ein kompletter Verlust von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und ein gleichzeitiges Auftreten von  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten in unterschiedlich starker Ausprägung gezeigt werden. Diese Befunde sind mit denen von Nimphius und Kollegen vereinbar, die die Stromalen Reaktionen in invasiven Urothelkarzinomen der Harnblase untersuchten (Nimphius et al., 2006). Eine Ausnahme stellte ein intraluminal des Corpus spongiosum wachsendes Urothelkarzinom dar. Hier ließen sich auch in Nähe der tumorgefüllten Kavernen die Stromalen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten der Urethra nachweisen. Gleichzeitig traten um die tumorgefüllten Kavernen herum konzentrisch angeordnete  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten auf. Dieser Befund ist erstaunlich, da die Karzinomzellen wegen der Trennung durch das Endothel keinen direkten Kontakt zum angrenzenden Stroma hatten. Dies würde zwar erklären, warum sich die Population der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten nicht veränderte, aber rätselhaft bleibt, warum sich trotz fehlender direkter Interaktion zwischen Stroma und Tumor vermehrt  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten in Nähe des Endothels finden ließen. Eine Aussage hinsichtlich der diagnostischen Bedeutung der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in Urothelkarzinomen des Penis sollte aufgrund der geringen Fallzahl erst nach Überprüfung mit einer größeren Fallzahl gemacht werden. Diesbezüglich scheint eine Unterteilung bezüglich des Wachstumsmusters sinnvoll.

**c) Malignes Melanom:** Das Maligne Melanom nimmt unter bösartigen Läsionen des Penis eine Sonderstellung ein. Im Malignen Melanom des Penis konnten die durch

Wessel und Kollegen publizierten Ergebnisse bestätigt werden, dass weder CD34<sup>+</sup> Fibrozyten noch  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten im Stroma des Melanoms zur Darstellung kamen. Damit unterscheiden sich Melanome von anderen epithelialen Hauttumoren wie z.B. dem Basalzellkarzinom (Humphreys et al., 2000; Kirchmann et al., 1994), in dem der Verlust der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten mit einem Erscheinen von  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten assoziiert ist. Aus welchem Grund sich die Malignen Melanome in ihrem Stromaaufbau von anderen invasiven Karzinomen grundlegend unterscheiden, bedarf weiterer Untersuchungen. Nach Wessel stellen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten potentielle Indikatoren dar, normales Stroma von malignem Stroma abzugrenzen. Beim Penis muss jedoch erneut auf die Unregelmäßigkeit des Vorkommens der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten hingewiesen werden, weswegen ein Fehlen von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten nicht als sicheres Kriterium für Malignität gewertet werden darf.

#### **5.5.2. SPARC und TGF- $\beta$ in normalem und malignem Stroma des Penis**

Im normalen Penis konnte SPARC ausschließlich im Stroma der Urethra nachgewiesen werden. Ähnliche Befunde zeigte eine Studie aus dem Jahr 2006, in der ebenfalls eine positive Reaktivität für SPARC im Stroma von Harnblasen berichtet wurde (Nimphius et al., 2006). Das übrige Stroma und insbesondere die Penishaut waren bis auf die Endothelien frei von SPARC, was den Ergebnissen von Wessel und Kollegen aus dem Jahr 2008 entspricht (Wessel et al., 2008). TGF- $\beta$  war weder im Stroma noch intrazellulär im normalen Penis nachweisbar. Interessanterweise wird eine erhöhte Aktivität von TGF- $\beta$  im Stroma des Penis als möglicher ätiopathogenetischer Faktor bei fibrosierenden Prozessen der Induratio penis plastica diskutiert (Haag et al., 2006).

**a) Plattenepithelkarzinom:** In mehr als der Hälfte der Fälle war im Stroma der Plattenepithelkarzinome eine positive Reaktion für SPARC zu vermerken, wobei das Ausmaß deutlich variierte. Zusätzlich werteten wir die Ergebnisse hinsichtlich der lokalen Ausbreitung des Tumors (pT nach TNM) aus. Dabei zeigte SPARC vermehrt in den Tumoren höherer Stadien (pT3/ pT4) eine positive Reaktion, was aber in Anbetracht der Fallzahl (9 Fälle) zurückhaltend bewertet werden sollte. In vielen internationalen Studien wurde über ein Auftreten von SPARC in Plattenepithelkarzinomen berichtet (Che et al., 2006; Chin et al., 2005; Kato et al., 2005). Bei Plattenepithelkarzinomen

des Kopf-Hals-Bereiches wurde SPARC sogar als ein Marker für eine schlechte Prognose identifiziert (Chin et al., 2005; Kato et al., 2005). Dies verdeutlicht, dass weitere Untersuchungen von SPARC in Plattenepithelkarzinomen notwendig sind, um die Funktion dieses Matrixproteins in der Tumorgenese weiter zu klären und so neue Ansätze für innovative Therapien zu schaffen. TGF- $\beta$  konnte in keinem Plattenepithelkarzinom des Penis identifiziert werden, sodass man in diesen Karzinomen von einer eher untergeordneten Rolle von TGF- $\beta$  ausgehen kann.

**b) Urothelkarzinom:** Die untersuchten Urothelkarzinome zeigten in nur einem der drei Fälle eine stromale Reaktion für SPARC, wobei gerade bei invasiv wachsenden Urothelkarzinomen keinerlei Reaktivität für SPARC vorhanden war. Dieses Ergebnis widerspricht den Ergebnissen von Nimphius und Kollegen, die im Großteil der invasiven Urothelkarzinome eine starke Reaktion mit dem SPARC-Antikörper beschrieben (Nimphius et al., 2006). Eine ausführlichere Untersuchung von SPARC in Urothelkarzinomen des Penis mit einer größeren Fallzahl scheint sinnvoll, damit die von Nimphius und Kollegen publizierten Ergebnisse bestätigt werden könnten, dass SPARC eine entscheidende Rolle bei der Stromainvasion der Urothelkarzinome spielt (Nimphius et al., 2006). TGF- $\beta$  ließ sich wie auch in den anderen Karzinomen des Penis nicht identifizieren.

**c) Malignes Melanom:** Ähnlich den Untersuchungen von Wessel et al. zeigten die untersuchten Melanomzellen eine starke intrazelluläre Reaktivität für SPARC. Eine stromale Reaktion konnte entsprechend der Ergebnisse dieser Studie ausgeschlossen werden (Wessel et al., 2008). Dem intrazellulär exprimierten SPARC misst man heutzutage eine entscheidende Bedeutung bei der Wachstumsregulation von Tumorzellen zu (Prada et al., 2007). Somit verdichtet sich die Hypothese, dass SPARC eine bedeutsame Rolle in der Pathogenese der Melanome speziell hinsichtlich der Regulation des Tumorzellwachstums spielen könnte. Dies lässt Raum zur Spekulation, dass SPARC in der Zukunft eine potentielle Zielstruktur für die Therapie von Malignen Melanomen darstellen könnte.

## 6. Zusammenfassung

CD34<sup>+</sup> Fibrozyten bilden einen essentiellen Bestandteil des Stromas vieler Organe des menschlichen Körpers. Sie sind für die Zelladhäsion und als Produzenten von Kollagenen für die Entstehung, Reparatur und Aufrechterhaltung des Stromagerüsts vieler Organe mitverantwortlich. CD34<sup>+</sup> Fibrozyten sezernieren unter den heutzutage bekannten Zellen eine einzigartige Kombination von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Chemokinen. Sie besitzen die Fähigkeit, Antigene über MHC-II und andere kostimulierende Moleküle zu präsentieren und naive T-Zellen zu prägen. Ihre mögliche pathophysiologische Beteiligung an gut- und bösartigen Neubildungen sowie an entzündlichen Erkrankungen lässt vermuten, dass sie eines Tages eine potentielle Zielstruktur innovativer Therapien darstellen könnten. Für Karzinome wurde in vielen Studien ein charakteristischer Umbau des Stromas in Nähe von Karzinomen nachgewiesen: Das Stroma zeigte einen Verlust der ortsständigen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und gleichzeitig ein Auftreten von  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten, die im gesunden tumorfreien Stroma vorher nicht dargestellt werden konnten.

Ziel dieser an Archivmaterial durchgeführten Studie war es, erstmals eine Übersicht über das Vorkommen und die topographische Verteilung von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in Hoden, Prostata, Samenblase, Samenleiter und Penis im männlichen Genitaltrakt zu geben. Desweiteren soll die Frage beantwortet werden, ob sich die Verteilung der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten in normalem Gewebe von der in malignem Gewebe des männlichen Genitaltrakts unterscheidet. Dies ermöglicht die Beurteilung, ob Unterschiede in den Stromazellpopulationen in der histopathologischen Diagnostik von Nutzen sein könnten und welche biologische Bedeutung diesen zukommt.

CD34<sup>+</sup> Fibrozyten ließen sich in den Organen des männlichen Genitaltrakts in unterschiedlicher Häufigkeit nachweisen. In allen von uns untersuchten Organen ließ sich konstant eine hohe Dichte an Fibrozyten in direkter Umgebung arterieller Gefäße, in weniger starker Ausprägung auch in Umgebung venöser Gefäße ausmachen. Im Stroma des Hoden fand sich ein dichtes retikuläres Netzwerk aus CD34<sup>+</sup> Fibrozyten. In der normalen Prostata und Samenblase ließen sich neben Muskel- und Kollagenfasern kaum CD34<sup>+</sup> Fibrozyten nachweisen. Im Penis ließen sich CD34<sup>+</sup> Fibrozyten Stroma

der penilen Urethra und unregelmäßig im Stroma der Penishaut darstellen. Im kollagenfaserreichen Stroma der Schwellkörper waren diese Zellen nicht nachweisbar. Ein stromaler Verlust von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten ließ sich in den durchgeführten Untersuchungen im Seminom des Hodens sowie in Karzinomen des Penis beobachten, gleichzeitig konnte - mit Ausnahme des Malignen Melanoms des Penis - in allen untersuchten Karzinomen auch ein Auftreten von  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten beobachtet werden. Diesem stromalen Umbau in Seminom und Peniskarzinomen mit Verlust der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und Gewinn an  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten wird eine substantielle Bedeutung im Rahmen der Pathophysiologie eines malignen Wachstums zugeschrieben: Ortsständige CD34<sup>+</sup> Fibrozyten differenzieren im karzinomatösen Stroma zu  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten. Aufgrund der fehlenden Antigenpräsentation und T-Zellprägung entgehen entartete Zellen so der durch CD34<sup>+</sup> Fibrozyten vermittelten Immunantwort. Zudem führt der Verlust der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten zu einem lockeren deadhäsiven Stroma, wodurch möglicherweise die Ausbreitung eines Karzinoms erleichtert wird. Es scheint sehr wahrscheinlich, dass die zwei Matrixproteine TGF- $\beta$  und SPARC eine entscheidende Rolle bei diesen Veränderungen im Tumorstroma spielen: TGF- $\beta$  ist ein Wachstum-regulierendes Zytokin, das die Transformierung von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten zu  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten stimuliert. SPARC vermittelt eine Deadhäsion des Stromas und könnte auf diese Weise die Ausbreitung eines Karzinoms ermöglichen. Hinsichtlich eines Nutzens für die histopathologische Diagnostik ließ sich für das Seminom und die Peniskarzinome zeigen, dass ein Verlust der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten und ein Auftreten von  $\alpha$ -SMA-reaktiven Myofibroblasten für die histopathologische Diagnostik ein durchaus nützliches Hilfsmittel zur Differenzierung zwischen gut- und bösartigen Geweben darstellt, jedoch sollte die An- bzw. Abwesenheit dieser Zellen keinesfalls als verlässlicher Marker zur Unterscheidung von normalem und malignem Gewebe gewertet werden.

In der Gruppe der malignen Tumoren des männlichen Genitaltrakts nimmt das Prostatakarzinom eine Sonderstellung ein. Es konnte erstmals beschrieben werden, dass nach Entstehung eines Karzinoms zahlreiche CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im Stroma erscheinen, die im normalen Stroma nicht nachweisbar waren.  $\alpha$ -SMA-reaktive Myofibroblasten waren im Prostatakarzinom kaum vorhanden. Möglicherweise unterliegen Prostata und Samenblase anderen biologischen Regulationsmechanismen als Organe, in deren

Stroma eine Vielzahl von ortständigen CD34<sup>+</sup> Fibrozyten zu finden sind. Es scheint plausibel, dass zirkulierende CD34<sup>+</sup> Fibrozyten aus der Blutbahn über das Endothel hinweg in das geschädigte Stroma invadieren und durch ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation und T-Zell-Prägung eine wichtige immunologische Rolle bei der Bekämpfung maligner Zellen in der Prostata spielen. Ein gehäuftes Auftreten von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten bei niedrig differenzierten Prostatakarzinomen lässt zudem eine prognostische Relevanz der CD34<sup>+</sup> Fibrozyten in Adenokarzinomen der Prostata vermuten. Möglicherweise spielen hierbei auch die durch CD34<sup>+</sup> Fibrozyten sezernierten Angiogenese-stimulierende Faktoren in der Tumorausbreitung eine entscheidende Rolle.

Hinsichtlich eines Nutzens in der histopathologischen Diagnostik spricht im Gegensatz zu allen hier bisher untersuchten Karzinomen ein Auftreten von CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im Stroma der Prostata für ein Karzinom. Jedoch eignen sich CD34<sup>+</sup> Fibrozyten lediglich als Hilfsmittel, nicht aber als verlässliches Merkmal zur Unterscheidung von normalem- und malignem Gewebe in der Prostata.

## 7. Tabellarischer Anhang

### 7.1. Normaler Hoden

Auftragsnummer	Geburtsjahr	Block	Stroma von	CD34	ASMA	SPARC	TGF- $\beta$
12837/05	1984	1a	Hoden	+	-/+	+*	-/+*
			Tunica albuginea	-/+	+	-/+	-
12197/05	1976	1a	Hoden	+	-/+	+*	-/+*
			Tunica albuginea	-/+	+	-	-
11103/05	1950	1a	Seminom	-	+	-/+	-
9664/05	1971	1	Tunica albuginea	-/+	+	-/+	-
			Hoden	+	-/+	+*	-/+*
8895/05	1965	1	Hoden	+	-/+	+*	-
			Tunica albuginea	-/+	+	-/+	-
8650/05	1955	1	Ductuli efferentes	-	+	-	-
			Tunica albuginea	-/+	+	+/-	-
6770/05	1975	1a	Hoden	+	-/+	+*	-/+*
3774/05	1976	1a	Hoden	+	-/+	+*	-/+*
			Tunica albuginea	-/+	+	-	-
18004/04	1942	1a	Hoden	+	-/+	+*	-/+*
			Tunica albuginea	-	+	-	-
12757/04	1969	1a	Hoden	+	-/+	+*	-/+*
			Tunica albuginea	-/+	+	-	-
11553/04	1970	1a	Hoden	+	-/+	+*	-/+*
			Tunica albuginea	-/+	+	-	-
9708/04	1969	1Aa	Hoden	+	-/+	+*	-/+*
13553/04	1974	1a	Hoden	+	-/+	+*	-/+*
2678/04	1965	1a	Hoden	+	-/+	+*	-/+*
			Tunica albuginea	+	-	-	-

## 7.2. Seminom des Hoden

Auftragsnummer	Geburtsjahr	Block	TNM-Klassifikation	CD34	ASMA	SPARC	TGF-β
12837/05	1984	1a	pT1 pNX pMX	-/+	+/-	+/-	-
12197/05	1976	1a	pT1 pNX pMX	-	+	+* -/+	-
11103/05	1950	1a	pT3 pNX pMX	-	+	-/+	-
9664/05	1971	1	pT1 pNX pMX	-/+	-/+	+*	-
8895/05	1965	1	pT1 pNX pMX	-	+	-/+	-
8650/05	1955	1	pT2 pNX pMX	-	+	+* +/-	-
6770/05	1975	1a	pT1 pNX pMX	-	+	-/+	-
3774/05	1976	1a	pT1 pNX pMX	-/+	+/-	-/+	-
18004/04	1942	1a	pT3 pNX pMX	-	+	+* -/+	-
12757/04	1969	1a	pT1 pNX pMX	-	+	+* -/+	-
11533/04	1970	1a	pT1 pNX pMX	-/+	+/-	-	-
9708/04	1969	1Aa	pT2 pNX pMX	-/+	+/-	+/-*	-
13553/04	1974	1a	pT1 pNX pMX	-	+	-	-
2678/04	1965	1a	pT1 pNX pMX	-	+	-/+	-

### 7.3. Normale Prostata

Auftragsnummer	Geburtsjahr	Block	Stroma von	CD34	ASMA	SPARC	TGF-β
1665/06	1945	B2b	Prostata	-	-	-	+
2904/06	1941	D2 G2b	Prostata	-	-	-	-/+*
182/05	1939	G2a x2	Prostata	-	-	-	+/-*
4454/05	1934	2	Prostata	-	-	-	+/-*
7546/06	1936	E2a	Prostata	-	-	-	-/+*
16206/05	1929	G1b	Prostata	-	-	-	-/+*
1711/04	1936	I1b	Prostata	-/+	-	-	+/-*
4660/04	1940	H1a	Prostatakapsel	+	-	-	-
7789/04	1934	F1	Prostata	-	-	-	+/-*
9126/04	1941	E1a	Prostata	-	-	-	+
16794/04	1957	K1a X2	Prostata	-	-	-	+/-*
17392/04	1956	D1	Prostata	-	-	-	+/-*
5359/03	1929	H1b	Prostata	-	-	-	+/- *
8173/03	1936	F1b	Prostata	-	-	-	-/+ *
10098/03	1937	F1	Prostata	-	-	-	-/+*
		X2	Prostata	-	-	-	-/+*
110022/99	1925	F1	Prostata	-	-	-	+/- *
13600/99	1926	Gh1	Prostata	-	-	-	+/- *
			Prostatakapsel	+	-	-	-
14277/99	1924	I1	Prostatakapsel	+	-	-	-

#### 7.4. Normale Prostata mit normaler Samenblase

Auftragsnummer	Geburtsjahr	Block	Stroma von	CD34	ASMA	SPARC	TGF- $\beta$
14976/99	1940	B2	Samenblase	-	-/+	-	
		10	Samenblase	-	-/+	-	+*
16158/99	1923	x1	Samenblase	-	-/+	-	+*
			Prostata	-/+	-	-	-/+*
11433/06	1938	F1a	Prostata	-	-	-	-/+*
4253/06	1933	B2	Samenblase	-	-	-	
		D1b	Prostata	-	-	-	+*
4267/06	1940	b2	Samenblase	-/+	-/+	-	
		X1	Prostata	-	-	-	-/+*
4475/06	1941	B2	Samenblase	-	-/+	-	
		G2a	Prostata	-/+	-	-	+/-*
5081/06	1941	B2	Samenblase	-	-	-	
		F2b	Prostata	-	-	-	+/-*
5079/06	1946	B2	Samenblase	-/+	-/+	-	
		D2	Prostata	-	-	-	-/+*
5169/06	1940	B1	Samenblase	-	-/+	-	
		E1a	Prostata	-	-	-	+/-*
5202/06	1940	B2	Samenblase	-	-/+	-	
		F2b	Prostata	-	-	-	-
6121/06	1946	B2	Samenblase	-	-/+	-	
		X1	Prostata	-	-	-	-/+ *
			Samenblase	-	-/+	-	+*
6613/06	1938	B2	Samenblase	-	-	-/+	
		F2a	Prostata	-	-	-	-/+ *
6828/06	1939	B2	Samenblase	-	-/+	-	
		F2	Prostata	-	-	-	+/-*
6467/06	1942	B2	Samenblase	-	-/+	-	
		E1	Prostata	-	-	-	+/-*

## 7.5. Adenokarzinom der Prostata

Auftragsnummer	Geburtsjahr	Block	TNM-Klassifikation	Gleason	CD34	ASMA	SPARC	TGF-β
1665/06	1945	B2b	pT2c pN1 pMX	4+5=9	-/+	-	-	++
2904/06	1941	D2,g2b	pT3a pN1 pMX	2+3=5	+/-	-	-/+	-/+*
182/05	1939	G2a,x2	pT3b pN1 pMX	4+5=9	-/+	-/+	-/+	++
4454/05	1934	2	pT3b pN1 pMX	2+3=5	+/-	-	-	+/-*
7546/06	1936	E2a	pT3b pN1 pMX	4+5=9	+/-	-/+	-	-/+*
16206/05	1929	G1b	pT3b pN1 pMX	4+3=7	+/-	-	-	+/-*
1711/04	1936	I1b	pT3b pN1 pMX	2+4=6	+/-	-/+	-	+/-*
4660/04	1940	1	pT4 pN1 pMX	5+3=8	-/+	-	-/+	++
7789/04	1934	F1	pT3b pN1 pMX	3+5=8	-/+	-	-	++
9126/04	1941	E1a	pT3b pN1 pMX	5+3=8	-/+	-	-	+/-*
16794/04	1957	K1a,X2	pT4 pN1 pMX	4+5=9	-/+	-	-/+	+/-*
17392/04	1956	D1	pT2c pN1 pMX	2+3=5	+/-	-	-	+/-*
5359/03	1929	H1b	pT2c pN1 pMX	3+2=5	-	-	-	++
8173/03	1936	F1b	pT2c pN1 pMX	2+4=6	-	-	-	++
10098/03	1937	F1,X2	pT3b pN1 pMX	4+5=9	-/+	-/+	-/+	++
110022/99	1925	F1	pT2a pN1 pMX	2+3=5	-	-	-	++
13600/99	1926	Gh1	pT3a pN1 pMX	2+3=5	+/-	-	-	+/-*
14277/99	1924	11	pT3b pN1 pMX	2+3=5	+/-	-/+	-	+/-*
14976/99	1940	B2,10	pT3b pN1 pMX	5+4=9	-	-/+	-/+	+/-*
16158/99	1923	x1	pT3b pN1 pMX	4+4=8	-	-/+	-	++
11433/06	1938	F1a	pT2c pN0 pMX	2+4=6	-/+	-	-	-/+*
4253/06	1933	D1b	pT3b pN0 pMX	5+3=8	-/+	-	-	+/-*
4267/06	1940	X1	pT3a pN0 pMX	3+3=6	+/-	-	-	-
4475/06	1941	G2a	pT2c pN0 pMX	2+3=5	-	-	-	++
5081/06	1941	F2b	pT3a pN0 pMX	2+3=5	+/-	-	-	-/+*
5079/06	1946	D2	pT2c pN0 pMX	3+4=7	+/-	-	-	++
5169/06	1940	E1a	pT2c pN0 pMX	2+3=5	-/+	-	-	+/-*
5202/06	1940	F2b	pT2c pN0 pMX	2+3=5	-/+	-	-	-/+*
6121/06	1946	X1	pT3a pN0 pMX	2+3=5	-	-	-	+/-*
6613/06	1938	F2a	pT2c pN0 pMX	2+3=5	-	-	-/+	+/-*
6828/06	1939	F2	pT2c pN0 pMX	2+3=5	-	-	-	++
6467/06	1942	E1	pT2c pN0 pMX	2+3=5	-	-	-/+	+/-*

## 7.6. Normaler Ductus deferens

Auftragsnummer	Geburtsjahr	Block	Stroma von	CD34	ASMA	SPARC	TGF- $\beta$
6467/06	1942	A6	Mukosa	-/+	-	-	
			Muskularis	-/+	-	-	
			Adventitia	+	-	-	
4253/06	1933	A6	Mukosa	-/+	-	-	
			Muskularis	-/+	-	-	
			Adventitia	+	-	-	
4267/06	1940	A6	Mukosa	-/+	-	-	
			Muskularis	-	-	-	
			Adventitia	+	-	-	
4475/06	1941	A6	Mukosa	-/+	-	-	
			Muskularis	-/+	-	-	
			Adventitia	+	-	-	
5081/06	1941	A6	Mukosa	-/+	-	-	
			Muskularis	-	-	-	
			Adventitia	+	-	-	
5169/06	1940	A5	Mukosa	-/+	-	-	
			Muskularis	-/+	-	-	
			Adventitia	+	-	-	
5202/05	1940	A6	Mukosa	-/+	-	-	
			Muskularis	-/+	-	-	
			Adventitia	+	-	-	
			Karzinom	-/+	-	-	
6121/06	1946	A6	Mukosa	-/+	-	-	
			Muskularis	-/+	-	-	
			Adventitia	+	-	-	
6613/06	1938	A6	Mukosa	-/+	-	-	
			Muskularis	-	-	-	
			Adventitia	+	-	-	
6828/06	1939	A6	Mukosa	-/+	-	-/+	
			Muskularis	-/+	-	-	
			Adventitia	+	-	-	

## 7.7. Normaler Penis

Auftragsnummer	Geburtsjahr	Block	Stroma von	CD34	ASMA	SPARC	TGF-β
6064/06	1938	2.SS	Corpus spongiosum	-	-	-	-
		1.SS	Haut	-	-	-	-
17554/05	1938	1	Corpus spongiosum	-/+	-	-	-
		2a	Corpus cavernosum	-	-	-	-
			Fascia penis	+/-	-	-	-
9811/04	1942	3cA	Corpus cavernosum	-	-	-	-
			Fascia penis	+/-	-	+/-	-
365/04	1937	1.SS	Corpus Spongiosum	-	-	-	-
		2b	Haut	+	-	-/+	-
9287/02	1942	1.SS	Corpus Cavernosum	-	-	-	-
		2.SS	Corpus Spongiosum	-/+	-	-	-
		2D	Fascia penis	+/-	-	-	-
3675/00	1926	2A	Corpus spongiosum	-	-	-	-
			Praeputium	+	-	-	-
			Haut	-	-	-	-
7537/01	1954	1	Haut	-	-	-	-
			Fascia penis	-/+	-	-	-
			Corpus spongiosum	-	-	-	-
12258/03	1937	1. SS	Haut	-	-	-	-
			Corpus spongiosum	-	-	-	-
			Fascia penis	-/+	-	-	-
12296/03	1937	2b	Praeputium	+	-	-	+
		1neu	Haut	-/+	-	-	-
11847/05	1937	2	Corpus spongiosum	-/+	-	-	-
			Tunica albuginea	-	-	-	-
17031/04	1926	2a	Corpus cavernosum	-	-	-	-
			Corpus spongiosum	-/+	-	-	-
4444/03	1941	5Aa	Corpus cavernosum	-	-	-	-
		5c	Fascia penis	+/-	-	-	-
7906/06	xx	1	Praeputium	+	-	-	-
8906/04	1934	2c.SS	Corpus cavernosum	-	-	-	-
		2.SS	Haut und Fascia penis	-/+	-	-	-
			Corpus spongiosum	-	-	-	-

### 7.7.1. Normale penile Urethra

Auftragsnummer	Geburtsjahr	Block	Stroma von	CD34	ASMA	SPARC	TGF-β
17554/05	1938	1 2a	Urethra	-/+	-	-/+	+*
365/04	1937	1.SS 2b	Urethra	+	-	-/+	-
9287/02	1942	1.SS 2.SS 2D	Urethra	+/-	-	-	+*
3675/00	1926	2A	Urethra	+/-	-	-/+	+*
11847/05	1937	2	Urethra	+/-	-	-/+	+*
17031/04	1926	2a	Urethra	+/-	-	-	+*

### 7.8. Plattenepithelkarzinom des Penis

Auftragsnummer	Geburtsjahr	Block	Stadium	Grading	CD34	ASMA	SPARC	TGF-β
6064/06	1938	1.SS	CIS	G1	-	+	-	-
17554/05	1938	2a	pT1 pNX pMX	G2	-	+	-/+	-
9811/04	1942	2	pT3 pN2 pMX	G2	-	+	+	-
365/04	1937	2b	pT2 pN0 pMX	G2	-	+	+	-
9287/02	1942	2A	pT2 pN0 pMX	G1	-	+	+/-	-
3675/00	1926	2A	pT2 pN0 pMX	G1	-	-	-	-
7537/01	1954	1	pT1 pN0 pMX	G1	-	-	-	-
12258/03	1937	1. SS	pT1 pN0 pMX	G2	-	-	-	-
3382/00	1922	SS	pT2 pN0 pMX	G1	-	+	-	-
12296/03	1937	1	pT1 pNX pMX	G2	-	+	+	-

### 7.9. Urothelkarzinom der penilen Urethra

Auftragsnummer	Geburtsjahr	Block	Stadium	Grading	CD34	ASMA	SPARC	TGF-β
11847/05	1937	2	pT3 pNX pMX	G2	+/-	+/-	+/-	+*
17031/04	1926	2a	pT3 pNX pMX	G2	-	+	-	+*
4444/03	1941	5Aa 5c	pT4 pNX pMX	G3/G4	-	-/+	-	-

## 7.10. Malignes Melanom der Penishaut

Auftragsnummer	Geburtsjahr	Block	Stadium	CD34	ASMA	SPARC	TGF-β
8906/04	1934	2.SS	pT3a pN1b pM1	-	-	+*	-

## 7.11. Modus zur Auswertung immunhistochemischer Präparate

Nomenklatur	Zeichen	Anteil der Stromazellen/ Epithelzellen/ Tumorzellen mit positiver Reaktion
Negativ	-	0% - 9%
Fokal positiv	- / +	10% - 49%
Überwiegend positiv	+ / -	50% - 89%
Einheitlich positiv	+	>90%

**Tab. 36** *Modus zur Auswertung immunhistochemischer Präparate; die im tabellarischen Anhang mit einem Stern (\*) versehenen Zeichen markieren eine intrazelluläre Reaktion mit dem jeweiligen Antikörper*

## 8. Literaturverzeichnis

- Artico M**, Bronzetti E, Alicino V, et al. (2010) Human gallbladder carcinoma: Role of neurotrophins, MIB-1, CD34 and CA15-3. *Eur J Histochem* 54: e10
- Abe K**, Hibino T, Mishima H, et al. (2004) The cytokine regulation of SPARC production by rabbit corneal epithelial cells and fibroblasts in vitro. *Cornea* 23:172-179
- Abe R**, Donnelly SC, Peng T, et al. (2001) Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J of Immunology* 166: 7556-7562
- Aiba S**, Tabata N, Ohtani H, et al. (1994) CD34<sup>+</sup> spindle-shaped cells selectively disappear from the skin lesion of scleroderma. *Arch Dermatol* 130: 593- 597
- Aiba S**, Tagami H (1997) Inverse correlation between CD34 expression and proline-4-hydroxylase immunoreactivity on spindle cells noted in hypertrophic scars and keloids. *J of Cutaneous Pathology* 24: 65–69
- Barth PJ**, Ebrahimsade S, Hellinger A, et al. (2002a) CD34<sup>+</sup> fibrocytes in neoplastic and inflammatory pancreatic lesions. *Virchows Arch* 440: 128-133
- Barth PJ**, Ebrahimsade S, Ramaswamy A, et al. (2002b) CD34<sup>+</sup> fibrocytes in invasive ductal carcinoma, ductal carcinoma in situ, and benign breast lesions. *Virchows Arch* 440:298-303
- Barth PJ**, Ramaswamy A, Moll R (2002c) CD34<sup>+</sup> fibrocytes in normal cervical stroma, cervical intraepithelial neoplasia III, and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Virchows Arch* 441: 564-568
- Barth PJ**, Schenck zu Schweinsberg T, Ramaswamy A, et al. (2004) CD34<sup>+</sup> fibrocytes,  $\alpha$ -smooth muscle antigen-positive myofibroblasts, and CD117 expression in the stroma of invasive squamous cell carcinomas of the oral cavity, pharynx and larynx. *Virchows Arch* 444: 231–234
- Barth PJ**, Moll R, Ramaswamy A (2005) Stromal remodeling and SPARC (secreted protein acid rich in cysteine) expression in invasive ductal carcinomas of the breast. *Virchows Arch* 446: 532-536
- Barth PJ**, Koster H, Moosdorf R. (2005) CD34<sup>+</sup> fibrocytes in normal mitral valves and myxomatous mitral valve degeneration. *Pathol Res Pract* 201: 301-304
- Barth PJ**, Westhoff C (2007) CD34<sup>+</sup> Fibrocytes: Morphology, Histogenesis and Function. *Current Stem Cell Research & Therapy* 2: 221-227
- Becker KF**, Atkinson MJ, Reich U, et al. (1994) E-cadherin gene mutations provide

clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* 54: 3845-3852

**Benninghoff A**, Drenckhahn D (2008) *Anatomie 1: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1: Zelle, Gewebe, Entwicklung, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem.* Urban und Fischer Verlag bei Elsevier, 17. Auflage, S. 591

**Böcker W**, Denk H, Heitz PU, et al. (2008) *Pathologie.* Urban & Fischer Verlag Stuttgart Jena München, 4. Auflage, S. 889-924

**Bradshaw AD**, Sage EH (2001) SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest* 107: 1049-1054

**Brown J**, Greaves MF, Molgaard HV (1991) The gene encoding the stem cell antigen, CD34 is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain and embryonic fibroblasts. *International Immunology* 3: 175–184

**Bucala R**, Spiegel LA, Chesney J, et al. (1994) Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Molecular Medicine* 1: 71-81

**Chauhan H**, Abraham A, Phillips JRA, et al. (2003) There is more than one kind of myofibroblast: analysis of CD34 expression in benign, in situ and invasive breast lesions. *J Clin Pathol* 56: 271-276

**Che Y**, Luo A, Wang H, et al. (2006) The differential expression of SPARC in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med* 17: 1027-1033

**Chesney J**, Bacher M, Bender A, et al. (1997) The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6307-6312

**Chesney J**, Metz C, Stavitsky AB, et al. (1998) Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J of Immunology* 160: 419-425

**Chin D**, Boyle GM, Williams RM, et al. (2005) Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. *Int J Cancer* 113: 789-797

**Cowper SE**, Su LD, Bhawan J, et al. (2001) Nephrogenic fibrosing dermatopathy. *Am J Dermatopathol* 23: 383-93

**Dotto JE**, Ahrens W, Lesnik DJ, et al. (2006) Solitary fibrous tumor of the larynx: a case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 30: 213-216

**Dunphy JE** (1963) The fibroblast- A unique ally for the surgeon. *The New England*

Journal of Medicine 268: 1367-1377

**Ebrahimsade S**, Westhoff C, Barth PJ (2007) CD34<sup>+</sup> fibrocytes are preserved in most invasive lobular carcinomas of the breast. *Pathol Res Pract* 203: 695-698

**Espana EM**, Kawakita T, Liu CY, et al. (2004) CD-34 expression by cultured human keratocytes is downregulated during myofibroblast differentiation induced by TGF-beta1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 2985-2991

**Fina L**, Molgaard HV, Robertson D, et al. (1990) Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75: 2417-2426

**Framson PE**, Sage EH (2004) SPARC and tumor growth: where the seed meets the soil? *J Cell Biochem* 92: 679-690

**Gomperts BN**, Belperio JA, Rao PN, et al. (2006) Circulating progenitor epithelial cells traffic via CXCR4/CXCL12 in response to airway injury. *J Immunol* 176: 1916-1927

**Haag SM**, Hauck EW, Szardening-Kirchner C, et al. (2006) Alterations in the transforming growth factor (TGF)-beta pathway as a potential factor in the pathogenesis of Peyronie's disease. *Eur Urol* 51: 255-261

**Hartlapp I**, Abe R, Saeed RW, et al. (2001) Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. *FASEB J* 15: 2215-2224

**Hautmann R**, Huland H (2006) *Urologie*. Springer Verlag Berlin, 3. Auflage, S. 217-228

**Haycox CL**, Odland PB, Olbricht SM, et al. (1997) Immunohistochemical characterization of dermatofibrosarcoma protuberans with practical applications for diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol* 37: 438-444

**Hoffmann RM**, Gilliland FD, Eley JW, et al. (2001) Racial and ethnic differences in advanced-stage prostate cancer: the Prostate Cancer Outcomes Study. *J Natl Cancer Inst* 93: 388-395

**Humphrey PA** (2004) Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Modern Pathology* 17: 292-306

**Humphreys TR**, Monteiro MR, Murphy GF (2000) Mast cells and dendritic cells in basal cell carcinoma stroma. *Dermatol Surg* 26: 200-203

**Iacobuzio-Donahue CA**, Argani P, Hempen PM, et al. (2002) The desmoplastic response to infiltrating breast carcinoma: gene expression at the site of primary invasion

and implications for comparisons between tumor types. *Cancer Res* 62: 5351-5357

**Illueca C**, Monteagudo C, Revert A, et al. (1998) Diagnostic value of CD34 immunostaining in desmoplastic trichilemmoma. *J of Cutaneous Pathology* 25: 435-439

**Jimenez-Heffernan JA**, Aguilera A, Aroeira LS, et al. (2004) Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch* 444: 247- 256

**Junqueira LC**, Carneiro J (2004) *Histologie*. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 6. Auflage, S. 57-74

**Kahn AI**, Landis RC, Malhotra R (2003) L-Selectin ligands in lymphoid tissues and models of inflammation. *Inflammation* 27: 265-280

**Karow T**, Lang-Roth R (2009) *Pharmakologie und Toxikologie, Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden*. Thomas Karow Pulheim, 17. Auflage, S. 1124-1126

**Kato Y**, Nagashima Y, Baba Y, et al. (2005) Expression of SPARC in tongue carcinoma of stage II is associated with poor prognosis: an immunohistochemical study of 86 cases. *Int J Mol Med* 16: 263-268

**Kirchmann TT**, Prieto VG, Smoller BR (1994) CD34 staining pattern distinguishes basal cell carcinoma from trichoepithelioma. *Arch Dermatol* 130: 589-592

**Kirchmann TT**, Prieto VG, Smoller BR (1995) Use of CD34 in assessing the relationship between stroma and tumor in desmoplastic keratinocytic neoplasms. *J Cutaneous Pathology* 22: 422-426

**Kuroda N**, Nakayama H, Miyazaki E, et al. (2004) Distribution and role of CD34-positive stromal cells and myofibroblasts in human normal testicular stroma. *Histol Histopathol* 19: 743-751

**Lang G** (2006) *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Springer Verlag Wien, 1. Auflage, S. 258

**Liang JF**, Wang HK, Xiao H, et al. (2010) Relationship and prognostic significance of SPARC and VEGF protein expression in colon cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 29: 71

**Lin T**, Blaisdell J, Haskell JF (1987) Transforming growth factor-beta inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 146: 387-394

**Lüttges J**, Mentzel T, Hübner G, et al. (1999) Solitary fibrous tumour of the pancreas: a new member of the small group of mesenchymal pancreatic tumours. *Virchows Arch*

435: 37-42

**Majdic O**, Stöckl J, Pickl WF, et al. (1994) Signaling and induction of enhanced cytoadhesiveness via the hematopoietic progenitor cell surface molecule CD34. *Blood* 83:1226-1234

**Min KW** (2010) Gastrointestinal stromal tumor: an ultrastructural investigation on regional differences with considerations on their histogenesis. *Ultrastruct Pathol* 34: 174-188

**Murphy-Ullrich JE** (2001) The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest* 107: 785-790

**Nakayama H**, Enzan H, Miyazaki E, et al. (2000) Differential expression of CD34 in normal colorectal tissue, peritumoral inflammatory tissue, and tumour stroma. *J Clin Pathol* 53: 626-629

**Nakayama H**, Enzan H, Miyazaki E, et al. (2001) CD34 positive stromal cells in gastric adenocarcinomas. *J clin Pathol* 54: 846-848

**Nakayama H**, Enzan H, Yamamoto M, et al. (2003) CD34 positive stromal cells in primary lung carcinomas. *Oncol Rep* 10: 1313-1316

**Nakayama H**, Enzan H, Miyazaki E, et al. (2004) Presence of vascular adventitial fibroblastic cells in diffuse-type gastric carcinomas. *J clin Pathol* 57: 970-972

**Nimphius W**, Moll R, Olbert P, et al. (2006) CD34+ fibrocytes in chronic cystitis and noninvasive and invasive urothelial carcinomas of the urinary bladder. *Virchows Arch* 450: 179-185

**Otto T**, Rembrink K, Goepel M, et al. (1993) E-cadherin: a marker for differentiation and invasiveness in prostatic carcinoma. *Urol Res* 21: 359-362

**Paget J** (1983) Lectures on surgical pathology. Royal College of Surgeons of England. London: Longmans

**Phillips RJ**, Burdick MD, Hong K, et al. (2004) Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* 114: 438-446

**Pilling D**, Buckley CD, Salmon M, et al. (2003) Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P. *J Immunol* 171: 5537-5546

**Porter PL**, Sage EH, Lane TF, et al. (1995) Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *J Histochem Cytochem* 43: 791-800

**Prada F**, Benedetti LG, Bravo AI (2007) SPARC endogenous level, rather than

fibroblast-produced SPARC or stroma reorganization induced by SPARC, is responsible for melanoma cell growth. *J Invest Dermatol* 127:2618-2628

**Quan TE**, Cowper S, Wu SP et al. (2004) Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol.* 36: 598-606

**Ramaswamy A**, Moll R, Barth PJ (2003) CD34<sup>+</sup> fibrocytes in tubular carcinomas and radial scars of the breast. *Virchows Arch* 443: 536-540

**Reed MJ**, Vernon RB, Abrass IB, et al. (1994) TGF-beta 1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors. *J Cell Physiol* 158: 169-179

**Schiebler TH**, Korf HW (2007) *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie.* Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 10. Auflage, S. 32-45

**Schiemann BJ**, Neil JR, Schieman WP (2003) SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the transforming growth factor- $\beta$ -signaling system. *Mol Biol Cell* 14: 3977-3988

**Schmidt M**, Sun G, Stacey MA, et al. (2003) Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *J of Immunology* 171: 380-389

**Schoeneich G**, Heimbach D, Müller SC (1999) Peniskarzinom. *J Urol Urogynäkol* 1: 16-27

**Seidal T**, Edvardsson H (1999) Expression of c-kit (CD117) and Ki67 provides information about the possible cell of origin and clinical course of gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 34: 416-424

**Shimasaki N**, Kuroda N, Miyazaki E, et al. (2007) Distribution and role of myofibroblasts in human normal seminal vesicle stroma. *Med Mol Morphol* 40: 208-211

**Silverman JS**, Tamsen A (1997) Fibrohistiocytic differentiation in subcutaneous fatty tumors. Study of spindle cell, pleomorphic, myxoid, and atypical lipoma and dedifferentiated liposarcoma cases composed in part of CD34<sup>+</sup> fibroblasts and FXIIIa<sup>+</sup> histiocytes. *J Cutan Pathol* 24: 484-493

**Sircar K**, Hewlett BR, Huizinga JD, et al. (1999) Interstitial cells of Cajal as precursors of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 23: 377-389

**Soma L**, LiVolsi VA, Baloch ZW (2001) Dendritic interstitial and myofibroblastic cells

at the border of salivary gland tumors. Arch Pathol Lab Med 125: 232-236

**Stirling GA**, Kakkar VV (1969) Cells in the circulating blood capable of producing connective tissue. British Journal of Experimental Pathology 50: 51-55

**Swanson PE**, Fitzpatrick MM, Ritter JH, et al. (1998) Immunohistologic differential diagnosis of basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and trichoepithelioma in small cutaneous biopsy specimens. J of Cutaneous Pathology 25: 153-159

**Tai IT**, Tang MJ (2008) SPARC in cancer biology: its role in cancer progression and potential for therapy. Drug Resist Updat 11: 231-246

**Yakirevich E**, Izhak OB, Rennert G, et al. (1999) Cytotoxic phenotype of tumor infiltrating lymphocytes in medullary carcinoma of the breast. Mod Pathol 12: 1050-1056

**Yamazaki K**, Eyden BP (1996a) Ultrastructural and immunohistochemical studies of intralobular fibroblasts in human submandibular gland: the recognition of a “CD34 positive reticular network“ connected by gap junctions. J Submicrosc Cytol Pathol 28: 471-483

**Yamazaki K**, Eyden BP (1996b) Ultrastructural and immunohistochemical studies of stromal cells in lamina propria of human fallopian tube ampullar mucosa: the recognition of “CD34 positive reticular network” and it’s putative function in immune surveillance. J Submicrosc Cytol Pathol 28: 325-337

**Yamazaki K**, Eyden BP (1997) Interfollicular fibroblasts in the human thyroid gland: recognition of a CD34 positive stromal cell network communicated by gap junctions and terminated by autonomic nerve endings. J Submicrosc Cytol Pathol 29: 461-467

**Wessel C**, Westhoff CC, Nowak K, et al. (2008) CD34<sup>+</sup> fibrocytes in melanocytic nevi and malignant melanomas of the skin. Virchows Arch 453: 485-489

**Wilson MJ**, Bowles J, Koopman P (2006) The matricellular protein SPARC is internalized in Sertoli, Leydig, and germ cells during testis differentiation. Mol reprod Dev 73: 531-539

## **9. Anhang**

### **9.1. Tabellarischer Lebenslauf**

#### **Persönliche Daten**

Name: Anne Katharina Münks

Geburtsdatum: 15.03.1982

Geburtsort: Krefeld

Eltern: Heinz Münks  
Margret Münks, geb. Krüßen

Geschwister: Christian Hendrik Münks

#### **Schullaufbahn**

1988- 1993 Grundschule Buscher Holzweg Krefeld

1993- 2001 Gymnasium am Moltkeplatz Krefeld  
Abitur im Juli 2001

#### **Ausbildung**

10/2001- 09/2002 Studium der Betriebswirtschaftslehre  
Philipps-Universität Marburg

10/2002- 11/2008 Studium der Humanmedizin  
Philipps-Universität Marburg

08/2004 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)

05/2006 Beginn der Dissertation bei Herrn Prof. Dr. Peter Barth an  
dem Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg

08/2007- 07/2008 Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Marburg

11/2008 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Staatsexamen)

12/2008 Approbation

04/2009- 04/2010    Wissenschaftliche Angestellte (Ärztin)  
                          Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie und  
                          Stoffwechsel der Universitätsklinik Marburg  
                          Prof. Dr. T. Gress

seit 04/2010         Assistenzärztin  
                          Florence- Nightingale- Krankenhaus Düsseldorf  
                          Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie und  
                          Onkologie  
                          Prof. Dr. J. Erckenbrecht

## 9.2. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Celik, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Domingez, Doss, Ellenrieder, Feuser, Griß, Gress, Gotzen, Grundmann, Hasilik, Happle, Hellinger, Hesse, Hofmann, Jungclas, Kalinowski, Kern, Klenk, Klose, Kretschmer, Krieg, Lennartz, Lippert, Lorenz, Maisch, Moll, Moosdorf, Müller, Neubauer, Niessing, Oertel, Ramaswamy, Renschmidt, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Seitz, Sesterhenn, Steiniger, Steinkamp, Sundermeyer, Tebbe, Vogelmeier, Voigt, Weihe, Werner, Wündisch, Wulf, Zielke

### **9.3. Danksagung**

Meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Professor Dr. med. P. J. Barth möchte ich für die lehrreiche Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die stets hilfsbereite Unterstützung bei der Konzeption, Durchführung und Auswertung der Experimente danken. Ich hätte mir für meine Promotion keine bessere Betreuung wünschen können.

Ich bin darüber hinaus allen Mitarbeitern des Forschungslabors des Instituts für Pathologie für ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und eine wunderbare Zeit zu tiefem Dank verpflichtet. Bei Frau Viktoria Morokina, Frau Sabine Koch und Frau Renate Baumann möchte ich mich ganz herzlich für die Betreuung und Anleitung bei der Herstellung der Schnitte und Färbungen bedanken. Herrn Dr. Ansgar Schmidt danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei verschiedensten Problemen.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinen lieben Eltern und meinem Bruder, die stets an mich geglaubt haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen. Es ist schön zu wissen, dass ich ihnen mit der Fertigstellung dieser Arbeit eine große Freude bereite.

#### **9.4. Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

“ CD34<sup>+</sup> Fibrozyten im männlichen Genitaltrakt“

im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Moll mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. P.J. Barth ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg 27. Juli 2010



