

4 Ergebnisse

Anhand humaner Forschungsarbeiten konnte gezeigt werden, dass das Expressionsprofil der Cyclin-abhängigen Cyclinkinase-Inhibitoren (CKIs) p21 und p27 im Rahmen der Karzinogenese von Mammatumoren von entscheidender Bedeutung ist (Slingerland and Pagano 2000; Winters, Leek et al. 2003; Wu, Hayashi et al. 2004). In der veterinärmedizinischen Forschung liegen bislang nur wenige Veröffentlichungen zu diesem Thema vor. Daher war es Ziel dieser Arbeit, zu prüfen, ob die CKIs p21 und p27 auch im Rahmen der caninen Karzinogenese von Mammatumoren eine vergleichbar wichtige Rolle spielen.

Mittels konventioneller PCR wurden zunächst der qualitative Nachweis der beiden CKIs erbracht und durch Sequenzanalyse bestätigt.

Vor den quantitativen Untersuchungen von p21 und p27 in caninen Mammatumoren sollte zunächst die bei humanen Mammatumoren beschriebene Regulation der beiden CKIs auch bei der Spezies Hund bestätigt werden. Aus diesem Grund wurde eine Affymetrixchip-Analyse an Proben von Mammakarzinomen der Spezies Hund (einfache, solide Karzinome) durchgeführt. Die Ergebnisse der Analyse zeigten eine Überexpression für p21 und eine verminderte Expression für p27 in den untersuchten Mammakarzinomen.

Hierauf folgten das Sammeln und die Untersuchung der Proben von 25 caninen Mammatumoren (siehe Tabelle 4). Diese wurden *intra operationem* gewonnen, histologisch entsprechend der WHO-Richtlinien klassifiziert und mittels real-time PCR quantitativ analysiert.

Abschließend wurden die caninen Mammakarzinome stichprobenartig immunhistochemisch untersucht.

Nr.	Tumor-ID	Hunderasse	Alter des Tieres	Diagnose
1	5	Kurzhaarteckel	9	Komplexes Karzinom
2	8	Spitz-Mischling	14	Karzinoma in situ
3	9	West-Highland-White Terrier	11	Einfaches, solides Karzinom
4	13	Deutscher Schäferhund	13	Komplexes Karzinom
5	15	Briard	13	Komplexes Karzinom
6	16	Cocker-Spaniel	10	Karzinoma in situ
7	17A	Deutscher Schäferhund	8	Einfaches, solides Karzinom
8	17B	Deutscher Schäferhund	8	Karzinoma in situ
9	19	Schäferhund-Mischling	11	Einfaches, solides Karzinom
10	23	Mischling	11	Einfaches, solides Karzinom
11	24	Teckel-Mischling	8	Einfaches, solides Karzinom
12	26	Terrier-Mischling	5	Komplexes Karzinom
13	29	Pudel	12	Einfaches, solides Karzinom
14	32	Cocker-Spaniel	8	Einfaches, solides Karzinom
15	45	Terrier-Mischling	8	Einfaches, tubulopapilläres Karzinom

Nr.	Tumor-ID	Hunderasse	Alter des Tieres	Diagnose
16	47	Mischling	-	Einfaches, solides Karzinom
17	53	Pudel	8	Einfaches, solides Karzinom
18	54	West-Highland-White Terrier	-	Einfaches, solides Karzinom
19	55	Yorkshire-Terrier	9	Komplexes Karzinom
20	57	Schäferhund-Mischling	7	Einfaches, solides Karzinom
21	59A	Mischling	10	Einfaches, solides Karzinom
22	59B	Mischling	10	Komplexes Karzinom
23	60	Mischling	11	Einfaches, solides Karzinom
24	61	Labrador	7	Komplexes Karzinom
25	62	Pudel	8	Komplexes Karzinom

Tabelle 4 Tabellarische Darstellung der untersuchten Mammatumoren. Es handelt sich um 14 einfache Karzinome (13 einfache Karzinome vom soliden Typ, 1 einfaches Karzinom vom tubulopapillären Typ) , 8 Komplexe Karzinome, 3 Karzinoma in situ.

4.1 Histologische Untersuchung

In die weiteren Untersuchungen wurden ausschließlich Mammatumoren einbezogen, die nach der histologischen Untersuchung als einfache und komplexe Karzinome oder als Karzinoma *in situ* bewertet wurden. Die histologische Klassifizierung wurde anhand der jüngsten Modifikation der histologischen WHO-Klassifizierung für Mammatumoren des Hundes und der Katze von MISDORP (Misdorp 1999) vorgenommen. Im Folgenden sollen die Kriterien zur Diagnosestellung dieser drei Tumorkategorien anhand der WHO-Richtlinien beschrieben werden:

4.1.1 Nicht infiltrierendes (in situ) Karzinom

Beim nicht infiltrierenden Karzinom handelt es sich um eine epitheliale Neoplasie, die alle Malignitätskriterien (Infiltration, Expansion, Metastasierung) trägt. Das charakteristische Merkmal dieses Tumortyps ist eine intakte Basalmembran.

Das nicht infiltrierende Karzinom bildet sich vor allem in zuvor vorhandenen Strukturen wie Drüsengängen und -lappen oder in dilatierten Drüsengängen oder Zysten.

4.1.2 Komplexes Karzinom

Das komplexe Karzinom besteht aus epithelialen und myoepithelialen Anteilen.

Die luminalen Epithelzellen können entweder tubulopapilläre oder solide Strukturen bilden. Die myoepithelialen Zellen (meist Spindelzelltyp) sind häufig sternförmig oder netzartig angeordnet. Vereinzelt kommt es zu squamösen Metaplasien. Die Tumoren zeichnen sich für gewöhnlich durch ein expansives gelapptes Wachstum aus.

Manchmal kommt es zum Einbruch ins Lymphsystem (ca. 10 %). Die Unterscheidung hoch differenzierter Karzinome vom komplexen Typ und komplexen Adenomen gestaltet sich oft schwierig. Das Fehlen einer Kapsel, infiltratives Wachstum, hohe Zelldichte, Nekrosen und eine hohe Mitoserate sind Zeichen für die Malignität der Neoplasie. Komplexe Karzinome kommen beim Hund relativ häufig vor, selten sind sie bei der Katze zu finden.

4.1.3 Einfaches Karzinom

Ein einfaches Karzinom zeigt ausschließlich eine Zellart. Es kommen entweder nur luminalen Epithelzellen oder nur myoepitheliale Zellen vor.

Der Anteil an Stroma ist bei diesem Tumortyp sehr variabel. Häufig finden sich Lymphozytenansammlungen, oftmals in Verbindung mit Nekrosen. Einfache Karzinome tendieren stark zur Infiltration in umliegende Gewebe und Gefäße (bis zu 50 %). Häufig erfolgt eine lymphatische oder hämatogene Metastasierung. Basierend auf dem Differenzierungsgrad und dem biologischen Verhalten, lassen sich einfache Karzinome in drei Kategorien einteilen:

Zur ersten Kategorie zählen die Adenokarzinome vom tubulopapillären Typ, die zweite Kategorie bilden Adenokarzinome des soliden Typs, und der anaplastische Typ fällt in eine dritte Kategorie. Der Malignitätsgrad nimmt von der ersten zur dritten Kategorie zu.

4.1.3.1 Tubulopapilläres Karzinom

Dieses Karzinom ist durch die Bildung von tubulären und/oder papillären Strukturen gekennzeichnet.

4.1.3.2 Solides Karzinom

Charakteristisch für das solide Karzinom ist das Wachstum in soliden Strängen, Flächen oder sonstigen Strukturen.

4.2 Ergebnisse der histologischen Untersuchung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der histologischen Untersuchung der 25 Adenokarzinome im Vergleich zu neoplastisch unverändertem Mammagewebe desselben Individuums präsentiert.

Die einzelnen Proben wurden aufbereitet (siehe 3.2.1), Hämatoxylin-Eosin gefärbt, nach oben aufgeführten Kriterien (siehe 4.1) histologisch bewertet und in einer 10-fachen Vergrößerung fotografiert.

Es wird jeweils das Bild der Neoplasie eines Individuums dem neoplastisch unveränderten Gewebe desselben Individuums gegenübergestellt.

4.3 Qualitativer Nachweis der Transkripte von p21 und p27

Nach der Aufarbeitung der Mammakarzinom-Gewebeproben und des neoplastisch unveränderten Mammagewebes der gleichen Hündin und der anschließenden Isolierung der Gesamt-RNA (siehe 3.4) wurden anhand veröffentlichter homologer Sequenzen spezifische Primerpaare für die Amplifikation der mRNA-Sequenzen der Cyclin-abhängigen Cyclinkinase-Inhibitoren p21 und p27 ausgewählt (siehe 3.5.3) und in RT-PCR-Experimente (siehe 3.5.2, 3.6) eingesetzt. Die Sequenzen der hierfür verwendeten Primerpaare sind der Tabelle 28 (siehe 8.10) zu entnehmen.

Für die Targets p21 und p27 konnte der qualitative Nachweis in caninem im Vergleich zu humanem Mammagewebe mittels konventioneller PCR erbracht werden.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Gelelektrophorese nach erfolgter konventioneller PCR für p21 und p27.

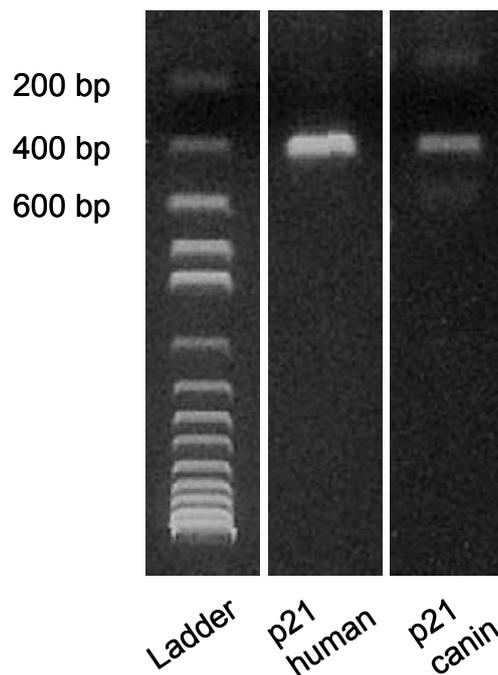


Abbildung 26 mRNA-Nachweis von p21 nach elektrophoretischer Auftrennung. Durch den Vergleich mit dem Größenstandard (DNA-Ladder) konnte das Vorhandensein von p21 canin im Vergleich zu p21 human in der RNA, gewonnen aus caninem und humanem Mammagewebe, nachgewiesen werden.

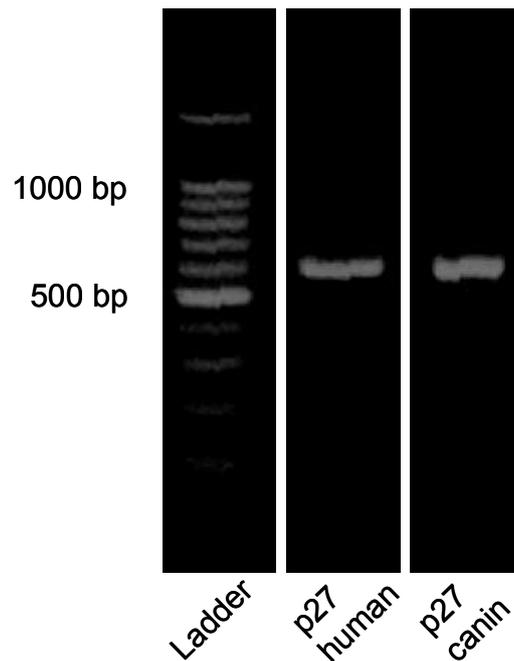


Abbildung 27 mRNA-Nachweis von p27 nach elektrophoretischer Auftrennung. Durch den Vergleich mit dem Größenstandard (DNA-Ladder) konnte das Vorhandensein von p27 canin im Vergleich zu p27 human in der RNA, gewonnen aus caninem und humanem Mammagewebe, nachgewiesen werden.

4.4 Sequenzierungsergebnisse

Die ermittelten Sequenzen für canines p21 und canines p27 wurden mit homologen humanen p21- und p27-Sequenzen mit Hilfe der Software „Jellyfish“ (www.jellyfish-software.com) verglichen. Hierbei ergab sich für alle untersuchten Sequenzen eine Homologie von mehr als 90%. Mit Hilfe der RT-PCR sowie der anschließenden Klonierung und Sequenzierung konnte der qualitative Nachweis für das Vorhandensein der mRNA von p21 und p27 in caninem Mammagewebe erbracht werden.

Die sequenzierten PCR-Produkte wurden in Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) veröffentlicht (siehe Tabelle 5).

Cyclin-abhängiger Cyclinkinase-Inhibitor	Genebank Accession Number
p21	AJ830019
p27	AJ810861

Tabelle 5 Veröffentlichung ermittelter caniner cDNA-Sequenzen

4.5 RNA-Qualität

4.5.1 Photometrische Messung

Die isolierte RNA (siehe 3.4.2) aus den 25 Karzinomproben und jeweils korrespondierendem neoplastisch unveränderten Mammagewebe wurde spektralphotometrisch untersucht (siehe 3.4.3). Bei allen Proben lag der maximale Extinktionswert bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die gemessene Konzentration aller Proben lag bei mindestens 100 ng/µl.

4.5.2 RNA-Integrität

Die isolierte RNA (siehe 3.4.2) aus den Gewebeproben wurde durch Kapillarelektrophorese untersucht (siehe 3.4.4). Die dabei festgestellte RNA-Integritätsnummer (RIN) betrug für die untersuchten Proben im Mittel 7 und war bei keiner Probe kleiner als 5.

4.6 Ergebnisse der relativen Quantifizierung

4.6.1 Etablierung der Assays mittels Regressionsanalyse

Vor der relativen Quantifizierung mittels real-time PCR, muss für jedes Target (p21, p27, β -Aktin) die Etablierung des entsprechenden Assays vorgenommen werden (siehe Abbildung 30).

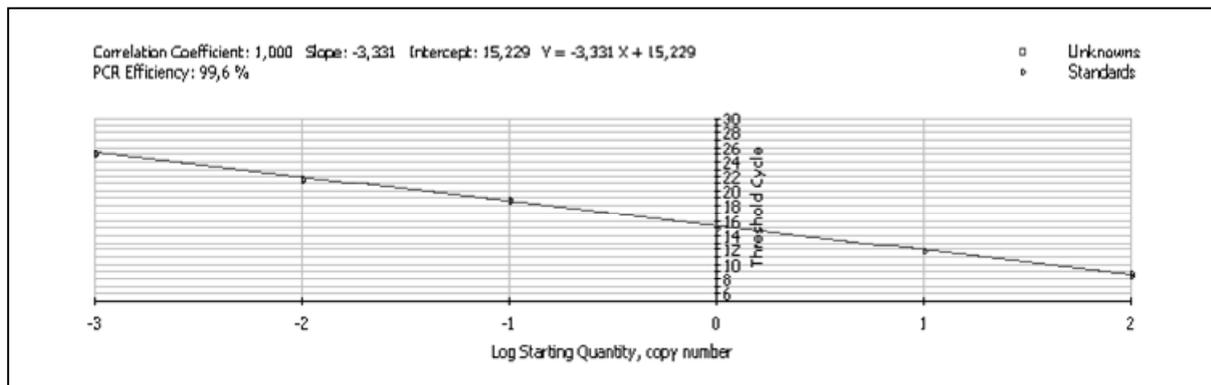


Abbildung 30 Grafische Darstellung der Regressionsanalyse von β -Aktin. Zur Bestimmung der PCR-Effizienz wird mittels Regressionsanalyse die Ausgangsmenge an Target-DNA gegen die Zykluszahl (C_T) in einer logarithmischen Funktion dargestellt. Bei einer Steigung (Slope) der Regressionsgeraden von -3,333 (absteigende Verdünnungsreihe) liegt die PCR-Effizienz bei 100%.

Mittels Regressionsanalyse kann die Effizienz der PCR-Reaktion überprüft werden. Hierbei wird die Ausgangsmenge an Target-DNA gegen die Zykluszahl in einer logarithmischen Funktion dargestellt. Die Steigung (Slope) der Regressionsgeraden gilt als Maß der realen Amplifikation und sollte zwischen 95 und 100% liegen (siehe 3.9.4.3).

Der Korrelationskoeffizient ist dabei ein Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs der PCR-Effizienz in variierenden Mengenbereichen der eingesetzten Kopienzahl. Die Etablierung wurde für p21 und p27 erfolgreich durchgeführt. Die Effizienzdaten können der Tabelle 6 entnommen werden.

Transportprotein	Korrelationskoeffizienten	Slope	Effizienz
p21	0,999	-3,378	97,7 %
p27	0,999	-3,383	97,50 %
β -Aktin	1	-3,331	99,60 %

Tabelle 6 Effizienzdaten der qPCR-Assays

4.6.2 Berechnung der Ergebnisse

Die aus der real-time-PCR gewonnenen Fluoreszenzdaten werden zunächst beurteilt (siehe 3.9.7). Die sich hieraus ergebenden Fluoreszenzmittelwerte werden zur relativen Quantifizierung verwendet (siehe 3.9.8). Die so berechneten FC-Werte (Rohdaten siehe Tabellen 31 und 32 unter 8.14) geben Auskunft über die relative Expressionsrate des entsprechenden Targets in den Mammakarzinomen im Vergleich zu neoplastisch unverändertem Mammagewebe des gleichen Individuums.

4.6.3 Relative Expressionsdaten von p21 und p27 in den untersuchten Mammakarzinomen

Wie bereits beschrieben, wurden ausschließlich Mammakarzinomproben und neoplastisch unverändertes Gewebe des gleichen Individuums ins Verhältnis gesetzt. Das Ergebnis wird als „Fold Change“ (FC) dargestellt und beschreibt die normalisierte Expressionrate des „Gene of interest“ (GOI) in der Testprobe (Test) als Vielfaches der normalisierten Expressionsrate des GOI in der Basisprobe (Basis / Ctrl). Aufgrund der exponentiellen Berechnungsformel (siehe Gleichung 2 unter 3.9.8) liegen Werte von $0,5 < FC < 2$ innerhalb eines Bereiches, in dem keine zuverlässige Aussage über eine Genregulation möglich ist, und werden daher als unverändert gegenüber der Kontrolle bewertet. Bei FC-Werten von 0 bis 0,5 zeigt das GOI in der Testprobe eine verminderte Expression gegenüber der Basisprobe (Abregulation). Bei FC-Werten von über 2 ist das GOI in der Testprobe gegenüber der Basisprobe vermehrt exprimiert (Aufregulation) (siehe auch 3.9.7).

4.6.3.1 Relative Expressionsdaten für p21

Die relative Expression für p21 liegt bei den untersuchten Mammakarzinomen im Mittel beim 1,38-fachen der Expression gegenüber neoplastisch unverändertem Drüsengewebe. Das bedeutet also, dass für dieses Target demzufolge keine zuverlässige Aussage über eine Genregulation möglich ist (siehe 4.6.3). Tendenziell lässt sich eine erhöhte Expression für p21 vermuten. Diese Aussage müsste jedoch an einer wesentlich größeren Anzahl von Tieren geprüft und bestätigt werden. Die grafische Darstellung der p21-Expression erfolgt in Abbildung 31.

Relative Expression von p21 in Mammakarzinomen (Tumor) im Vergleich zu neoplastisch unverändertem Mammagewebe (NUM) des gleichen Individuums:

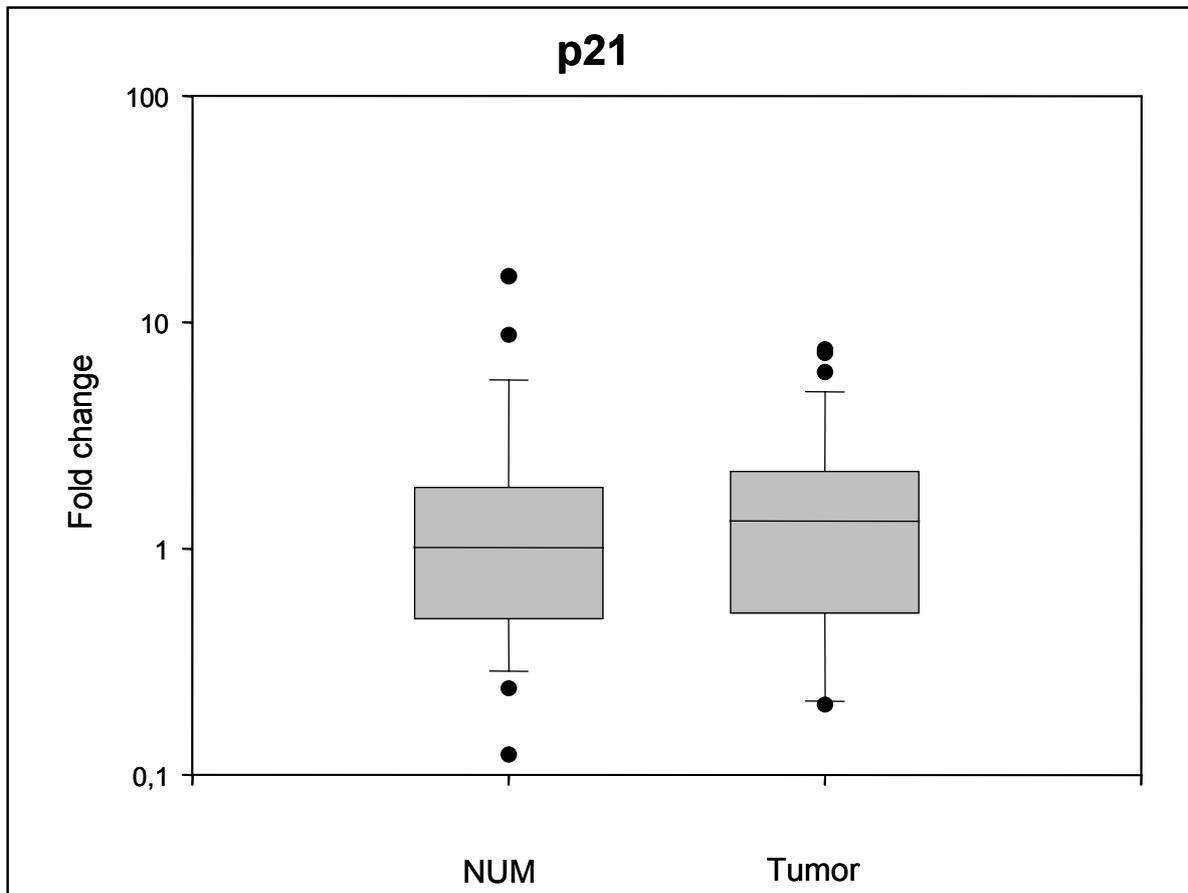


Abbildung 31 Boxplots für neoplastisch unverändertes Mammagewebe (NUM): Der Boxplot der Basisgruppe (NUM) zeigt die FC-Werte der Einzelbasisproben gegenüber dem Median (= 1) der Basisproben dar. Boxplot der Testgruppe (Tumor): Die FC-Werte der 25 einzelnen Tumorproben werden für das normalisierte Targetgen gegenüber dem Median des normalisierten p21 der einzelnen Basisproben dargestellt. Die Boxengröße und deren Erweiterungen zeigen die Streuung der Werte der Einzelproben für p21 in Basis- (links) und Testgruppe (rechts).

In der folgenden Grafik wird die Verteilung der FC-Werte über die Gesamtgruppe von 25 Adenokarzinomen gezeigt.

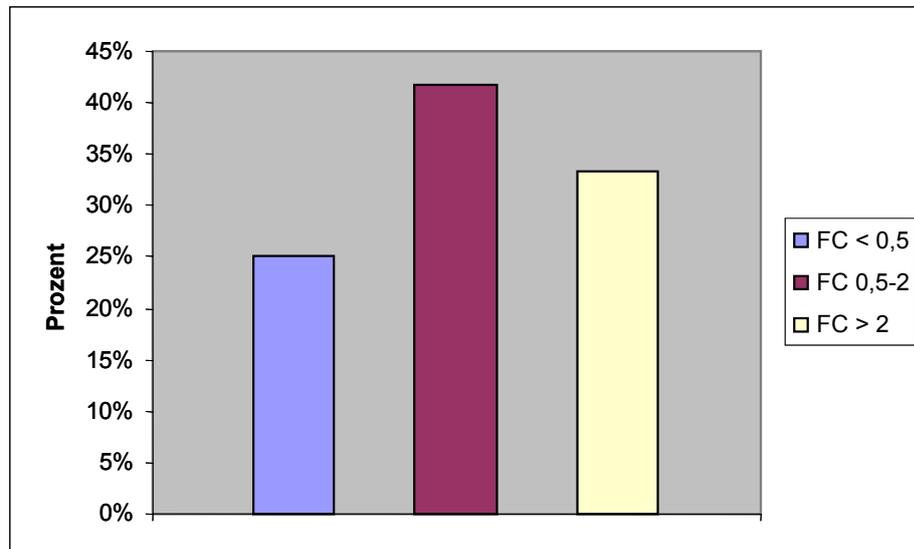


Abbildung 32 Verteilung der Fold-Change-Werte für p21 über die 25 untersuchten Tumorproben: Blau dargestellt ist die Gruppe der Adenokarzinome mit einem Fold Change (FC) von < 0,5, in Rot die Gruppe mit einem FC zwischen 0,5 und 2, gelb hinterlegt ist die Gruppe der Karzinome mit einem FC von > 2.

Etwa 25% der untersuchten Tumoren zeigen im Vergleich zu ihrem korrespondierenden neoplastisch unveränderten Mammagewebe einen Fold Change von < 0,5. Das bedeutet, dass bei 25% der untersuchten Tumorproben eine verminderte Expression von p21 gegenüber dem neoplastisch unveränderten Mammagewebe des gleichen Individuums vorliegt. 42% der Proben zeigen einen Fold Change zwischen 0,5 und 2 und liegen somit in dem Bereich, in dem keine zuverlässige Aussage über eine Genregulation möglich ist. Bei 33% der 25 Proben wurde ein Fold Change von > 2 gezeigt, was bedeutet, dass hier eine erhöhte Expression von p21 im Tumorgewebe im Vergleich zu neoplastisch unverändertem Mammagewebe des gleichen Individuums vorliegt. Die FC-Werte liegen zum größten Teil (42%) in der Gruppe von FC > 0,5 und < 2. Dies deutet darauf hin, dass eine echte Regulation unwahrscheinlich ist.

In Abbildung 33 wird die relative Expression des Referenzgens β -Aktin in Mammakarzinomen (Tumor) im Vergleich zu neoplastisch unverändertem Mammagewebe (NUM) des gleichen Individuums dargestellt. β -Aktin zeigte einen geringgradigen Transkriptionsunterschied zwischen den Karzinomproben und den korrespondierenden Gewebeproben aus neoplastisch unverändertem Mammagewebe.

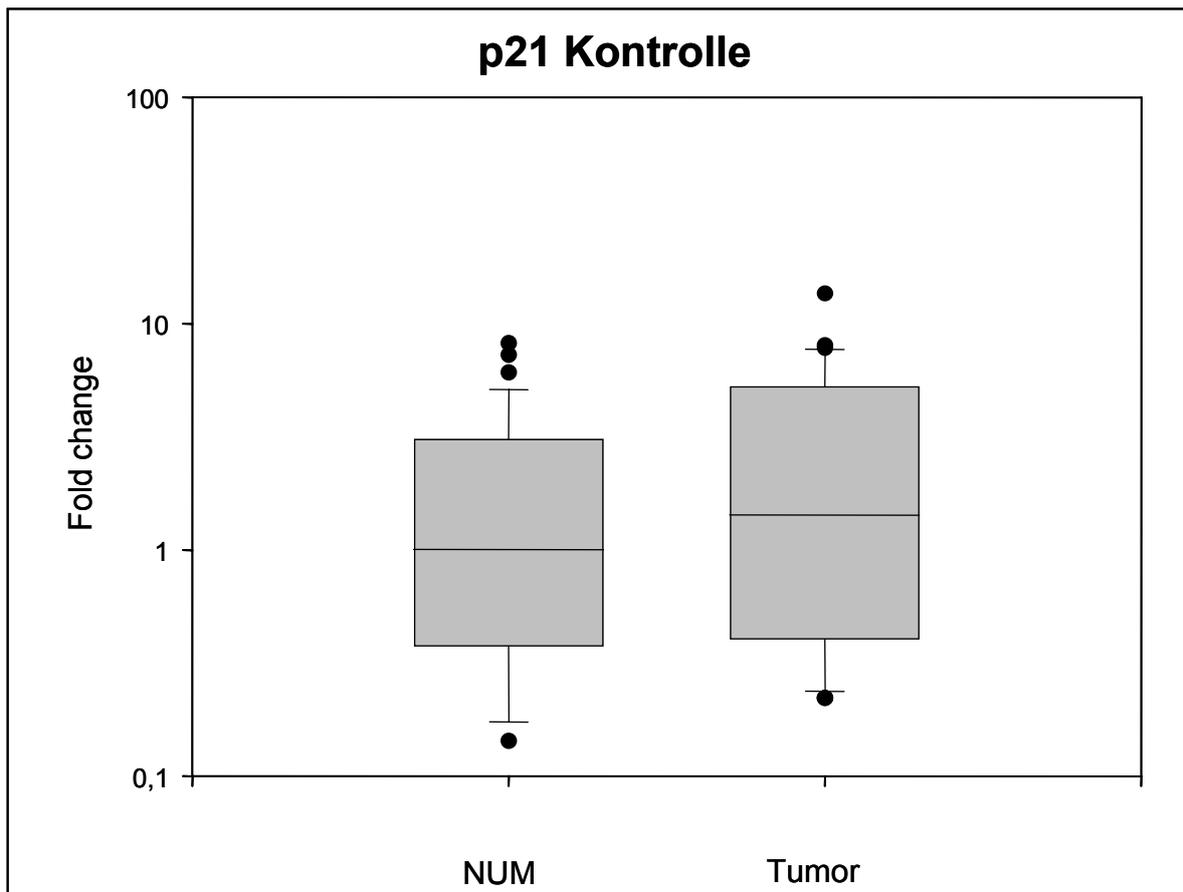


Abbildung 33 Boxplots für neoplastisch unverändertes Mammagewebe (NUM): Der Boxplot der Basisgruppe (NUM) zeigt die FC-Werte der 25 Einzelbasisproben gegenüber dem Median (hier immer = 1) der Basisproben für β -Aktin. Boxplot der Testgruppe (Tumor): Es werden die FC-Werte der einzelnen Tumorproben für β -Aktin gegenüber dem Median der Basisproben (NUM) für β -Aktin gezeigt. Die Boxengröße und deren Erweiterungen zeigen die Streuung der Werte der Einzelproben für β -Aktin in Basis- (links) und Testgruppe (rechts).

4.6.3.2 Relative Expressionsdaten für p27

Die relative Expression für p27 liegt bei den untersuchten Mammakarzinomen im Mittel beim 0,77-fachen der Expression, die in neoplastisch unverändertem Drüsengewebe ermittelt wurde. Das bedeutet, dass auch für dieses Target keine

zuverlässige Aussage über eine Genregulation möglich ist. Tendenziell lässt sich allerdings für p27 eine verminderte Expression vermuten. Diese Aussage sollte jedoch ebenfalls an einer wesentlich größeren Anzahl von Tieren geprüft und bestätigt werden.

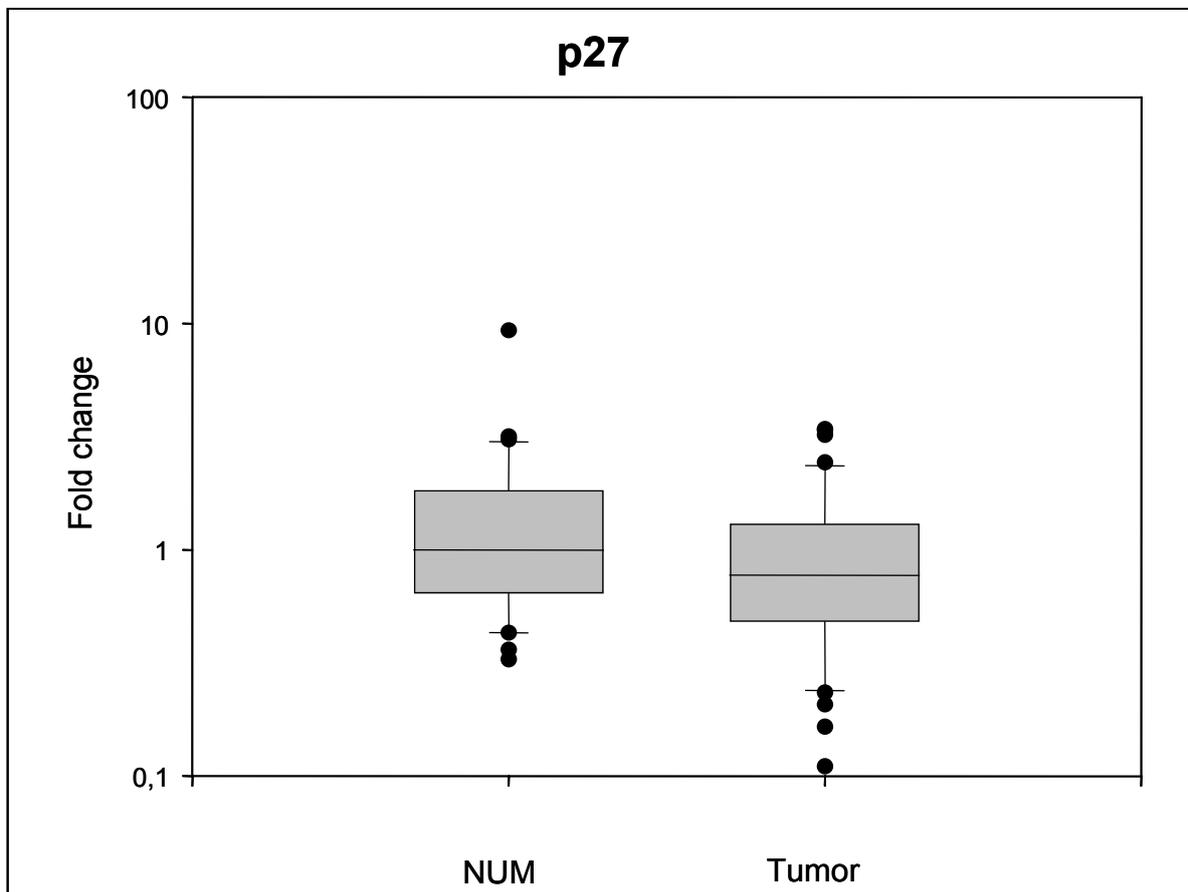


Abbildung 34 Boxplots für neoplastisch unverändertes Mammagewebe (NUM): Der Boxplot der Basisgruppe (NUM) zeigt die FC-Werte der Einzelbasisproben gegenüber dem Median (hier immer = 1) der Basisproben. Boxplot der Testgruppe (Tumor): Die FC-Werte der einzelnen Tumorproben werden für das normalisierte Targetgen gegenüber dem Median des normalisierten p27 der einzelnen Basisproben dargestellt. Die Boxengröße und deren Erweiterungen zeigen die Streuung der Werte der Einzelproben für p27 in Basis- (links) und Testgruppe (rechts).

In der folgenden Grafik wird die Verteilung der FC-Werte von p27 über die Gesamtgruppe von 25 Tumoren gezeigt (siehe Abbildung 35).

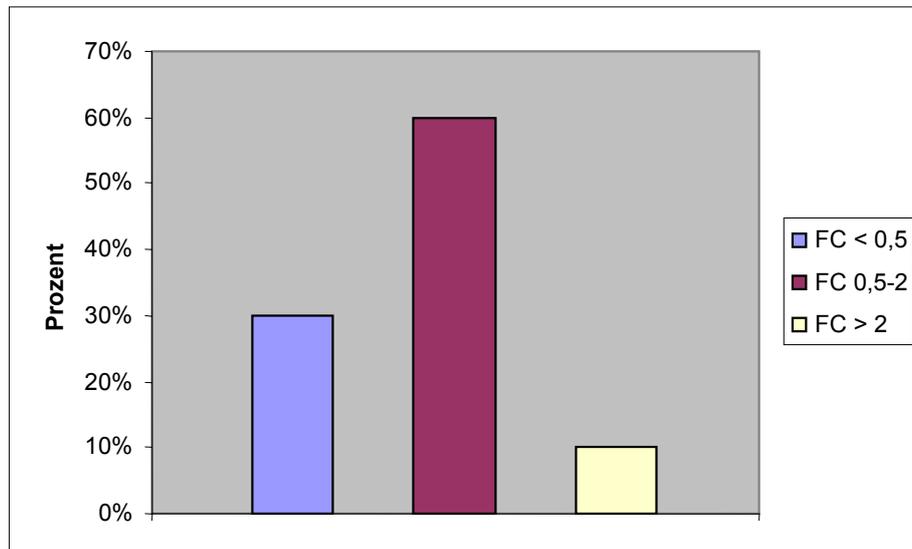


Abbildung 35 Verteilung der Fold-Change-Werte für p27 über die 25 untersuchten Tumorproben: Blau dargestellt ist die Gruppe der Adenokarzinome mit einem Fold Change (FC) von < 0,5, in Rot die Gruppe mit einem FC zwischen 0,5 und 2, gelb hinterlegt ist die Gruppe der Karzinome mit einem FC von > 2.

Für das Expressionsprofil von p27 zeigten etwa 30% der untersuchten Karzinome im Vergleich zum korrespondierenden neoplastisch unveränderten Mammagewebe einen Fold Change von < 0,5. Es liegt demnach bei 30% der untersuchten Tumorproben eine verminderte Expression von p27 gegenüber dem neoplastisch unveränderten Mammagewebe des gleichen Individuums vor. Bei 60% der Tumorproben liegt der Fold Change zwischen 0,5 und 2. Sie liegen somit in dem Bereich, in welchem keine zuverlässige Aussage über eine Genregulation möglich ist. Bei etwa 10% der 25 Proben zeigte sich ein Fold Change von > 2. In diesen Karzinomen liegt eine erhöhte Expression von p21 im Tumorgewebe gegenüber dem neoplastisch unveränderten Mammagewebe des gleichen Hundes vor.

In Abbildung 36 wird die relative Expression des Referenzgens β -Aktin in Mammakarzinomen (Tumor) im Vergleich zu neoplastisch unverändertem Mammagewebe (NUM) des gleichen Individuums dargestellt. β -Aktin zeigte einen geringgradigen Transkriptionsunterschied zwischen den Karzinomproben und den korrespondierenden Gewebeproben aus neoplastisch unverändertem Mammagewebe.

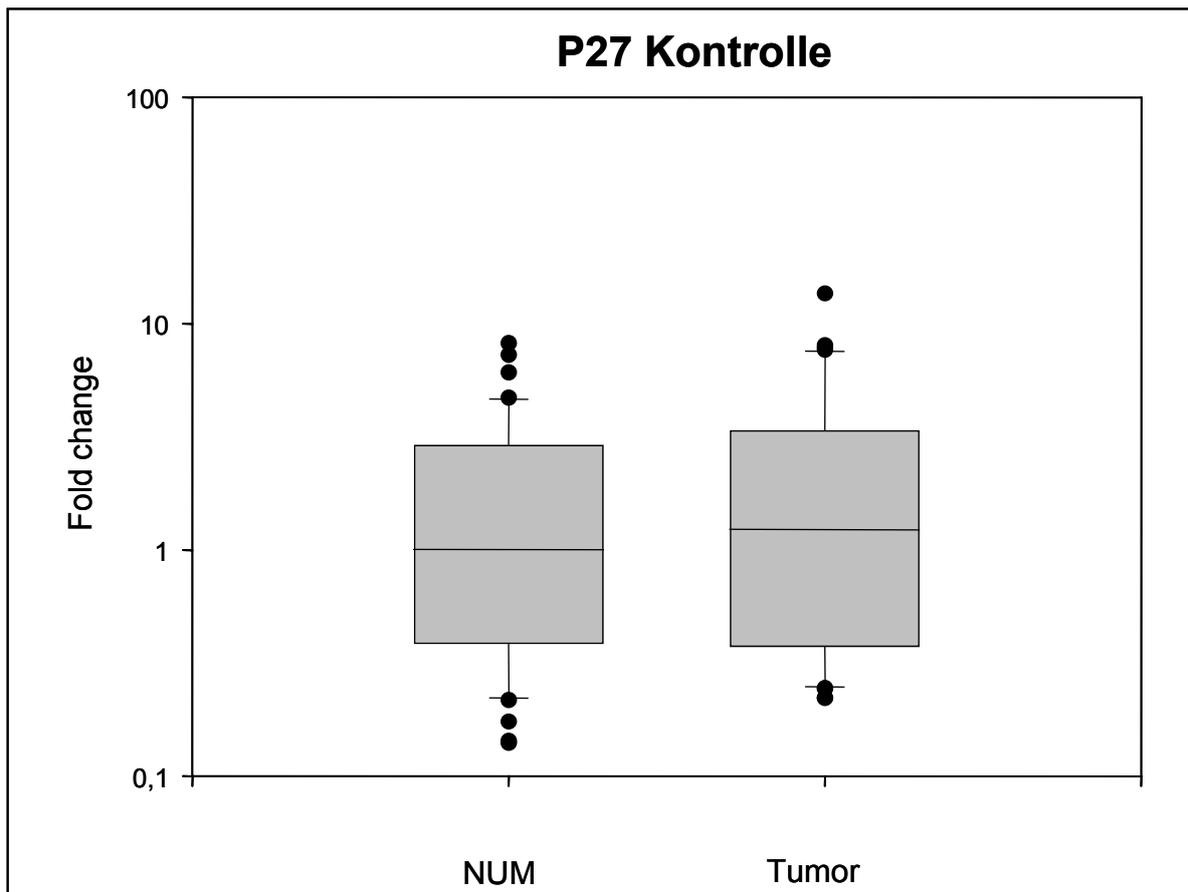


Abbildung 36 Boxplots für neoplastisch unverändertes Mammagewebe (NUM): Der Boxplot der Basisgruppe (NUM) zeigt die FC-Werte der Einzelbasisproben gegenüber dem Median (hier immer = 1) der Basisproben für β -Aktin. Boxplot der Testgruppe (Tumor): Es werden die FC-Werte der einzelnen Tumorproben für β -Aktin gegenüber dem Median der Basisproben (NUM) für β -Aktin gezeigt. Die Boxengröße und deren Erweiterungen zeigen die Streuung der Werte der Einzelproben für β -Aktin in Basis- (links) und Testgruppe (rechts).

4.7 Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen

Es wurde stichprobenartig ein immunhistochemischer Nachweis von p21 und p27 an den Mammakarzinomen im Vergleich zum korrespondierenden nicht neoplastisch veränderten Mammagewebe durchgeführt, um nach optischer Beurteilung eine semiquantitative Aussage über die vorhandene Proteinmenge des exprimierten p21- und p27-Proteins treffen und eventuelle Unterschiede in der Expression dieses Gens auf Proteinebene zwischen neoplastisch verändertem und nicht neoplastischem Mammagewebe erkennen zu können. p21 sowie auch p27 kommen im Zytoplasma und im Nukleus der Zellen vor. Das p21-Protein ist nach Antigen-Antikörper-Reaktion im Zytoplasma und im Nukleus als braune Immunreaktivität (DAB-Chromogen) zu erkennen. Die Immunhistologie der Stichproben zeigte bei den untersuchten Adenokarzinomen semiquantitativ eine deutlich erhöhte Proteinmenge an p21 im Vergleich zu den korrespondierenden nicht neoplastisch veränderten Mammagewebeproben. Dies ist daran zu erkennen, dass im Zytoplasma der Tumorzellen deutlich mehr immunreaktives p21 vorhanden ist als in den korrespondierenden nicht neoplastisch veränderten Mammagewebeproben.

p27 lässt sich als Protein ebenfalls im Zytoplasma, sowie im Nukleus der Zelle darstellen und ist unter der Verwendung des Chromogens Neufuchsin als rote Immunreaktivität zu erkennen. Die hier untersuchten Stichproben zeigen, immunhistologisch und semiquantitativ ausgewertet, eine deutlich verringerte p27-Proteinkonzentration in den Adenokarzinomen im Vergleich zum korrespondierenden nicht neoplastisch veränderten Mammagewebe.