

Redaktion  
H.-P. Zenner, Tübingen

## Originalien

H. Sudhoff<sup>1</sup> · G. Borkowski<sup>1</sup> · J. Bujia<sup>2</sup> · H. Hildmann<sup>1</sup> · A. Fisseler-Eckhoff<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Hals-Nasen-Ohrenklinik (Direktor: Prof. Dr. H. Hildmann), St. Elisabeth Hospital, Ruhr-Universität Bochum · <sup>2</sup> HNO-Klinik und Poliklinik (Direktor: Prof. Dr. E. Kastenbauer), Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München · <sup>3</sup> Institut für Pathologie (Direktor: Prof. Dr. K.-M. Müller), Berufsgenossenschaftliche Kliniken „Bergmannsheil Bochum“, Ruhr-Universität Bochum

# Immunhistochemische Untersuchungen von Mittelohrschleimhautresten im Cholesteatom\*

## Zusammenfassung

Das Cholesteatom ist durch das Einwachsen verhornenden Plattenepithels in das Mittelohr charakterisiert. Um das Verhalten beider Epithelien zu beschreiben, wurden 50 Cholesteatompräparate mit Mittelohrschleimhautanteilen immunhistochemisch auf die Expression und Lokalisation von Interleukin-1 (Il-1), „transforming growth factor- $\alpha$ “ (TGF- $\alpha$ ), „epidermal growth factor“ (EGF), „epidermal growth factor-receptor“ (EGF-R), des Proliferationsmarkers MIB 1, des Protoonkogenprodukts c-myc und des Aktivierungsmarkers 4F2 vergleichend untersucht. Die Keratinozyten des Cholesteatoms besaßen eine deutlich höhere Aktivierungs- und Proliferationsrate als die Mittelohrschleimhautzellen. Die Epithelzellen der Mittelohrmukosa zeigten immunhistochemisch keine Expression von TGF- $\alpha$ , EGF-R, Il-1 und c-myc, im Gegensatz zur deutlichen Immunreaktivität der Cholesteatommatrix. Die lokale Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie TGF- $\alpha$ , EGF und Il-1 aus Zellen des entzündlichen Infiltrats der Perimatrix, scheinen für das hyperproliferative Wachstumsverhalten der Cholesteatommatrix von besonderer Bedeutung zu sein. Die Ergebnisse können als Erklärungsansatz für das Fortschreiten des Cholesteatomwachstums unter Verdrängung der Mittelohrschleimhaut dienen.

## Schlüsselwörter

Cholesteatom · Immunhistochemie · Transforming growth factor- $\alpha$  · Epidermal growth factor · Epidermal growth factor-Rezeptor · Interleukin-1 · Ki-67 Antigen · MIB 1 · c-myc Protoonkogen · Aktivierungsmarker 4F2 · Mittelohrschleimhaut

**B**eim Cholesteatom handelt es sich um einen chronischen Entzündungsprozeß, der sich durch sein progressives Wachstum und die fortschreitende Destruktion der epithelialen und knöchernen Mittelohrstrukturen auszeichnet [14, 22, 31, 32, 34]. Welche Mechanismen und Faktoren dem hyperproliferativen Verhalten des Cholesteatomepithels zugrunde liegen, ist noch nicht geklärt. Einige Studien konnten ein modifiziertes Proliferations-, Differenzierungs- und Migrationsverhalten der Keratinozyten der Cholesteatommatrix belegen [3–5, 27, 28]. Das „aggressive“ Verhalten der Cholesteatommatrix scheint durch die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren aus Zellen des entzündlichen Infiltrats beeinflusst zu werden [1, 10, 15, 18, 22, 34].

Wachstumsfaktoren und Zytokinen kommt eine wichtige Rolle im Rahmen der zellulären Interaktionen, insbesondere der Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung zu. Die meisten Zellen des menschlichen Körpers scheinen diese regulatorischen Peptide in Abhängigkeit von ihrem Aktivitätszustand bilden zu können [7, 11, 29]. Eine Überexpression von Wachstumsfaktoren wurde dabei für die Wundheilung [21], benigne „hyperproliferative“ Erkrankungen, wie z.B. die Psoriasis [20], sowie für eine Vielzahl maligner Tumoren beschrieben [9, 12, 29]. Das Zytokin Interleukin-1, von dem zwei strukturell miteinander verwandte Moleküle bekannt sind, kann von fast allen Zelltypen, wie z.B. von B- und T-Zellen, Hautkeratinozyten, Endothelzellen und Makrophagen synthetisiert werden [10, 23]. Seine Produktion wird durch Antigene, Toxine, Verletzungen und Entzündungsprozesse induziert [1, 25].

\* Auszugsweise vorgetragen auf der 66. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, Chemnitz, 16. Mai 1994

Dr. H. Sudhoff  
Hals-Nasen-Ohrenklinik,  
Ruhr-Universität Bochum, St. Elisabeth Hospital,  
Bleichstraße 15, D-44787 Bochum

H. Sudhoff · G. Borkowski · J. Bujia  
H. Hildmann · A. Fisseler-Eckhoff

### Immunohistochemical investigations on middle ear mucosa remnants in cases with cholesteatoma

#### Summary

The development of a middle ear cholesteatoma is usually associated with chronic inflammation and displacement of the mucosa present by the invading squamous epithelium. To analyze the clinically different behaviors of both epithelia, we used immunohistochemical methods to study the distribution and expression of interleukin-1 (Il-1), transforming growth factor-alpha (TGF- $\alpha$ ), epidermal growth factor (EGF), epidermal growth factor-receptor (EGF-R), the proliferation marker MIB 1, c-myc proto-oncogene product and activation marker 4F2. Results stromal that keratinocytes in a cholesteatoma exhibited a much higher activation and proliferation rate when compared to middle ear mucosa cells. Middle ear epithelial cells showed no immunoreactivity for TGF-alpha, EGF-R, Il-1 and c-myc in contrast to the markedly positive immunoreactivity found in cholesteatoma matrix. The local release of cytokines and growth factors, such as TGF-alpha, EGF and Il-1 by inflammatory cells seems to be an important factor for the hyperproliferative behavior of cholesteatoma epithelium. Our findings could contribute to the pathogenesis of middle ear cholesteatoma and give a possible explanation for the sustained progression of its growth leading to displacement of the middle ear mucosa.

#### Key words

Cholesteatoma · Immunohistochemistry · Transforming growth factors · Cytokines · Pathogenesis · Middle ear mucosa

Um das biologische Verhalten der angrenzenden und bei fortschreitendem Wachstum des Plattenepithels verdrängten Mittelohrmukosa näher zu charakterisieren, führten wir vergleichende immunhistochemische Untersuchungen der Wachstumsfaktoren TGF- $\alpha$ , EGF, EGF-R, sowie des Proliferationsmarkers MIB 1, des proliferationsassoziierten Antigens 4F2 und des Protoonkogenprodukts c-myc an Cholesteatompräparaten mit Mittelohrschleimhautanteilen durch. Anhand der Expression und Verteilung der Zytokine, Wachstumsfaktoren und Proliferationsmarker sollten mögliche Ursachen des „aggressiven“ Cholesteatomwachstums dargestellt und diskutiert werden.

#### Material und Methoden

50 Cholesteatome mit Mittelohrschleimhautresten wurden im Rahmen der operativen Sanierung des Mittelohrs an den HNO-Kiniken der Ruhr-Universität Bochum und Ludwig-Maximilians-

Universität München – den Standards der Deklaration von Helsinki entsprechend – entnommen.

Ein Teil der Präparate wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, der andere Teil wurde in 10%igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Vom formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden 4  $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt und über Nacht luftgetrocknet. Das tiefgefrorene Gewebe wurde nach Anfertigung 4  $\mu$ m dicker Schnitte luftgetrocknet, in Aluminiumfolie eingewickelt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Aufarbeitung asserviert. Die jeweils verwendeten Antikörper können der Tabelle 1 entnommen werden.

#### Avidin-Biotin-Komplex-(ABC)-Methode

Nach der Blockierung der endogenen Peroxidase mit Wasserstoffsuperoxid erfolgte die Reduktion der unspezifischen Bindungen mit Präimmenserum. Der Inkubation mit dem Primärantikörper über 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  schloß sich die

Tabelle 1

**Auflistung der verwendeten Antikörper. Die Immunhistochemie für EGF, TGF- $\alpha$ , EGF-R und MIB 1 wurde an Paraffinschnitten, die Färbungen für Il-1, 4F2 und c-myc an Gefrierschnitten durchgeführt (ABC Avidin-Biotin-Komplex-Methode, PAP Peroxidase-Anti-Peroxidase-Methode, APAAP Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase-Methode)**

Antigen	Antikörper/Verdünnung	Methode	Quelle
Epidermal growth factor (EGF)	Anti Human EGF, Ab-3 (polyklonal)/1:300	ABC	Oncogene Science, New York, USA
Transforming growth factor- $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )	Anti Human TGF- $\alpha$ , Ab-2 (monoklonal)/1:300	ABC	Oncogene Science, New York, USA
Epidermal growth factor-receptor (EGF-R)	Anti Human EGF-R, Ab-4 (polyklonal)/1:150	ABC	Oncogene Science, New York, USA
Interleukin-1	Anti Human Il-1 (polyklonal)/1:20	PAP	Genzyme, Boston, USA
4F2	Anti Human F1/8 (monoklonal)/1:1	APAAP	Prof. Sanchez-Madrid, Madrid, Spanien
c-myc	Anti Human c-myc kodiertes 67 KD Protein, Clone 9E10 (monoklonal)/1:20	APAAP	Oncogene Science, New York, USA
MIB 1	Bakteriell exprimiertes 1002 bp Ki-67cDNA Fragment (monoklonal)/1:8	ABC	Dianova, Hamburg

## Originalien

Inkubation mit dem Brückenantikörper und dem peroxidasekonjugierten Avidin-Biotin-Komplex für jeweils 30 min bei Raumtemperatur an. Das als Substrat eingesetzte 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) rief eine rote Färbung hervor. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt [17].

### Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP-Methode)

Die Gewebeschnitte wurden zuerst mit Azeton für 10 min fixiert. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurden die Schnitte mit Schweineserum in einer Verdünnung von 1:5 für 20 min be-

handelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 30 min in einer Feuchtkammer bei 37°C, danach mit dem Brückenantikörper (DAKO) und dem APAAP-Komplex. Um die Farbreaktion zu entwickeln, wurde die Neu-Fuchsin-Methode verwendet [8].

### Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)-Methode

Die Objektträger wurden für 10 min in Azeton fixiert, wobei sie gleichzeitig mit 0,3%igem Wasserstoffperoxid behandelt wurden, um die endogene Peroxidaseaktivität zu hemmen. Anschlie-

ßend wurden die Proben nacheinander mit dem Primärantikörper, mit dem Brückenantikörper und dem PAP-Komplex inkubiert. Die Inkubationszeit für alle Antikörper betrug 30 min in einer Feuchtkammer. Als Farbstoff diente 3-Amino-9-Ethylcarbazol. Gegengefärbt wurde mit Hämalaun [36].

### Auswertung

Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch (Zeiss® Axiophot Lichtmikroskop). Die Intensität der Färbung wurde semiquantitativ von zwei unabhängigen Beobachtern vorgenommen und mit einer Unterteilung in eine negative (-), schwache (+), mittelgradige (++) oder starke (+++) Anfärbbarkeit mit dem jeweiligen Antikörper unterteilt.

### Ergebnisse

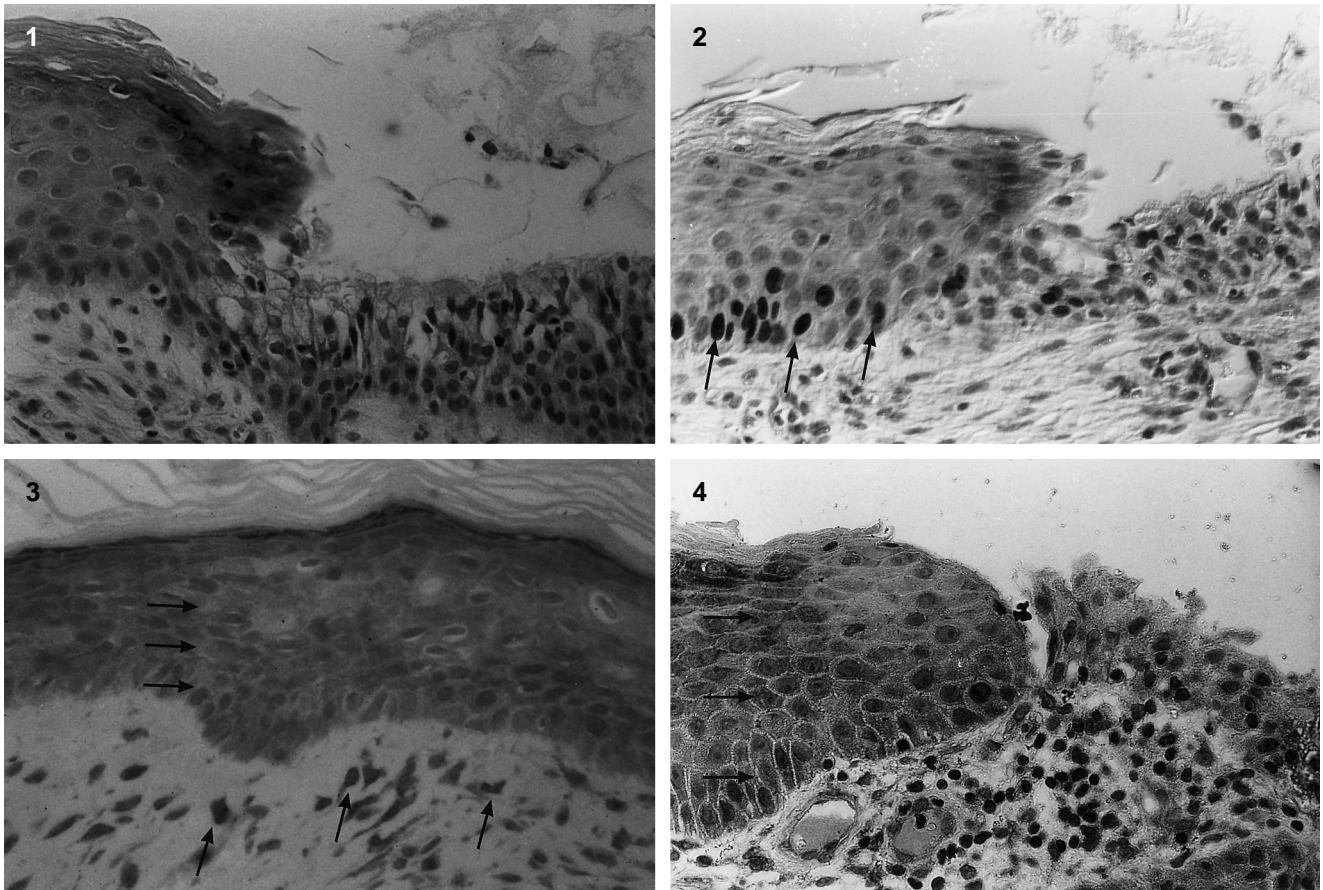
In 50 Cholesteatompräparaten konnten Mittelohrschleimhautreste mit Übergangszonen zum Plattenepithel gefunden werden (Abb. 1). Die Proliferations- und Aktivierungsmarker MIB 1 (Abb. 2), 4F2 und das Protoonkogen-

Abb. 1 ▼ Übergangszone zwischen Cholesteatomepithel (links) und Mittelohrschleimhaut (rechts) (HE-Färbung, Vergr. 400:1)

Abb. 2 ▼ Immunhistochemisch angefärbt mit MIB-1-positive Immunreaktion in basalen Keratinozyten der Cholesteatommatrix als Hinweis auf eine gesteigerte Proliferationsrate (Pfeile). Die Mittelohrschleimhaut läßt sich nicht anfärben (APAAP-Methode, Vergr. 400:1)

Abb. 3 ▼ TGF- $\alpha$ -positive Zellen in der Matrix und Perimatrix des Cholesteatoms (Pfeile) (ABC-Methode, Vergr. 400:1)

Abb. 4 ▼ Übergangszone zwischen Cholesteatomepithel und Mittelohrschleimhaut. Postive Immunreaktionen mit anti-EGF-R in den Keratinozyten der Cholesteatommatrix (Pfeile) (ABC-Methode, Vergr. 400:1)



produkt c-myc konnten sowohl in basalen, als auch in suprabasalen Keratinozyten der Cholesteatommatrix nachgewiesen werden. Die plattenepithelialen Anteile des Cholesteatomepithels zeigten eine deutliche positive Färbung für Interleukin-1, TGF- $\alpha$  und den EGF-R (Abb. 3, 4). Dagegen konnte der EGF nicht in den Keratinozyten nachgewiesen werden. In den angrenzenden Mittelohrschleimhautresten fand sich hingegen keine Immunreaktivität für Il-1, EGF-R (Abb. 3), TGF- $\alpha$  (Abb. 4), EGF, und c-myc und nur vereinzelt MIB 1- und 4F2-positive Mukoszellen (Abb. 2).

In der Perimatrix der untersuchten Cholesteatome mit Mittelohrschleimhautresten ließ sich ein verschieden stark ausgeprägtes entzündliches Infiltrat aus Histiozyten, Lymphozyten, mit teils lymphofollikulären Reaktionszentren, mehrkernigen Riesenzellen, Makrophagen, Fibroblasten und Granulozyten nachweisen. In den einzelnen Stromazellen konnte eine unterschiedliche Immunreaktivität für Il-1, TGF- $\alpha$  (Abb. 3), EGF, EGF-R (Abb. 4), MIB 1 (Abb. 2) und 4F2 belegt werden. Interleukin-1  $\alpha$  und  $\beta$  wurde vor allem in Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten dargestellt. TGF- $\alpha$  und EGF-R ließ sich in Makrophagen und Endothelzellen nachweisen (Abb. 3, 4). EGF wurde in fibroblastären Zellen gefunden, wobei lediglich ein Teil der Fibroblasten angefärbt war (Abb. 3). Eine Übersicht aller Ergebnisse ist in Tabelle 2 zusammengestellt.

## Diskussion

Das Cholesteatom, als hyperproliferative Mittelohrerkrankung, zeichnet sich durch das fortschreitende Wachstum des verhornenden Plattenepithels in der Paukenhöhle unter Verdrängung der Mittelohrschleimhaut aus [31, 32, 34]. Beide „konkurrierenden“ Epithelien sind unterschiedlichen embryologischen Ursprungs [22] und weisen ein unterschiedliches Zytokeratinverteilungsmuster auf [2]. Durch den zellulären Aufbau beider Epithelien und den Turn-over unter physiologischen Bedingungen ergeben sich bereits deutliche biologische Unterschiede [1, 3]. Unter pathologischen Bedingungen im chronisch entzündeten Cholesteatom kommt es durch die Freisetzung von

Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu proliferativen Stimuli, auf die beide Epithelien unterschiedlich zu reagieren scheinen [30, 34].

C-myc ist ein DNA-bindendes, nukleäres Phosphoprotein, das in die Kontrolle der Zellproliferation und -differenzierung eingebunden ist [19]. In vielen Zellen wird als Antwort auf wachstumsstimulierende Substanzen die Expression der zellulären Protoonkogene c-fos und c-myc innerhalb von 1–2 h induziert [19, 29]. Die ungleiche biologische Aktivität beider Epithelien scheint nicht nur in der unterschiedlichen immunhistochemischen Expression von c-myc, sondern auch in der durch MIB 1- und 4F2-Immunreaktivität eindeutig nachgewiesenen höheren Wachstumstendenz der Keratinozyten der Cholesteatommatrix ihren Ausdruck zu finden. MIB 1 ist in der S-, späten G1-, G2- und M-Phase des Zellzyklus nachweisbar [6, 35]. In eigenen Untersuchungen konnten wir feststellen, daß die Keratinozyten des Cholesteatoms einen 2,3fach höheren MIB 1-Index (MIB 1 positive Keratinozyten/Gesamtanzahl der Keratinozyten) besitzen als die der Gehörgangshaut [35]. Die Mittelohrschleimhautreste zeigen nur vereinzelt MIB-1-positive Zellen, als Hinweis auf eine geringe Proliferationsaktivität zu besitzen. Das Antigen 4F2 wird sowohl während des gesamten Proliferationszyklus, als auch schon in der späten Go- bzw. frühen G1-Phase exprimiert und gilt als Hinweis für eine Zellaktivierung. Der monoklonale Antikörper F1/8, der gegen das Antigen 4F2 gerichtet ist, findet sich in der regelrechten Haut ausschließlich in der proliferierenden Basalzellschicht [12, 13, 23]. Dabei steht der Expression von 4F2,

die eine gesteigerte metabolische Aktivität in den Epithelzellen der Mittelohrmukosa vermuten läßt, eine Überexpression von 4F2 im Cholesteatomepithel gegenüber. Die Keratinozyten des Cholesteatoms weisen nach Untersuchungen von Holly et al. andere hyperproliferative Erkrankungen, wie beispielsweise der Psoriasis [16], vergleichbares Verteilungsmuster von 4F2, auf.

Im Hinblick auf die deutlich erhöhte Expression von Interleukin-1, TGF- $\alpha$  und EGF-R weisen die Keratinozyten der Cholesteatommatrix einen aktivierten Zustand auf [1, 27, 28, 34]. Interleukin-1 stimuliert im Rahmen der Wundheilung die Fibroblastenproliferation, die ebenfalls in der Perimatrix des Cholesteatoms nachweisbar ist [25, 34]. Zusätzlich könnten Il-1 und TGF- $\alpha$  als autokrine Wachstumsfaktoren auf die Keratinozyten des Cholesteatomepithels, nicht aber an den Epithelzellen der Mittelohrschleimhaut wirken [4, 28]. Die fehlende Immunreaktivität für den EGF-R ist ein Hinweis darauf, daß die angrenzende Mittelohrschleimhaut nicht auf das lokal freigesetzte EGF und TGF- $\alpha$  reagieren kann. Die Bedeutung der Zytokine und Wachstumsfaktoren in bezug auf eine autokrine und/oder parakrine Wachstumsstimulation des Cholesteatomepithels, die Neovaskularisation und Knochendestruktion wurde bereits von Bujia et al. ausführlich diskutiert [4, 5]. Weiterhin geht man davon aus, daß TGF- $\alpha$  bei der epidermalen Neubildung und der Bildung von Granulationsgewebe eine wichtige Bedeutung zukommt [29]. So gelang es Rapollee et al. die mRNA für die transformierenden Wachstumsfaktoren TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ , „platelet derived growth factor“ (PDGF)-A-Kette und „Insulin-like

Tabelle 2

**Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen; negative (-), schwache (+), mittelgradige (++) oder starke (+++) Markierung der jeweiligen Zellen**

Antikörper	Mittelohrschleimhaut	Cholesteatomepithel	Perimatrix
EGF	-	-	++
TGF- $\alpha$	-	+++	+++
EGF-R	-	+++	++
Interleukin-1	-	-	++
4F2	+	+++	++
c-myc	-	+++	-
MIB 1	+	+++	++

growth factor“ (IGF) an isolierten Wundmakrophagen nachzuweisen [24].

Inwieweit die festgestellten Aktivierungen der Zytokine und Wachstumsfaktoren im Cholesteatomgewebe als Ursache der Cholesteatomproliferation oder nur als Folge der auslösenden Entzündung zu beurteilen sind und somit nur mittelbar das destruierende Wachstum des Cholesteatoms erklären, kann anhand der vorliegenden immunhistochemischen Untersuchungen nicht abschließend geklärt werden. Sicherlich spielen aber noch weitere Faktoren in dem komplizierten Netzwerk der Zytokin- und Wachstumsfaktorenaktivierung eine wesentliche Rolle. So konnten Ryan und Baird beispielsweise den „fibroblast growth factor“ (FGF) in entzündlich veränderter Mittelohrschleimhaut [26] sowie Fujioka und Huang PDGF, die Zytokine TNF- $\alpha$  und  $\beta$  als weitere proliferativ wirkende Faktoren in der Perimatrix des Cholesteatoms nachweisen [15]. Möglicherweise haben auch Viren, wie z.B. humane Papillomviren (HPV) eine Bedeutung bei der Pathogenese des „aggressiven“ Cholesteatoms [33].

Zusammenfassend zeigen die Keratinozyten der Cholesteatommatrix einen deutlich gesteigerten Aktivierungszustand und eine erhöhte Proliferationsaktivität im Vergleich zum Epithel der Mittelohrschleimhaut. Die lokale Freisetzung der untersuchten Zytokine und Wachstumsfaktoren der Perimatrix scheint einen wesentlichen Beitrag zum hyperproliferativen Verhalten des verhornenden Plattenepithels zu leisten. Weitere Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen einer Zellkultur oder eines Tiermodells erscheinen notwendig, um die verantwortlichen Mechanismen näher ergründen zu können.

## Fazit für die Praxis

Es ist bislang nicht geklärt, warum das verhornende Plattenepithel, das im äußeren Gehörgang im wesentlichen eine Schutzfunktion wahrnimmt, im Mittelohr ausgeprägte Destruktionen zur Folge hat. Zytokine und Wachstumsfaktoren scheinen dabei einen wesentlichen Beitrag zum „aggressiven“ Verhalten und Knochenabbau des Cholesteatoms zu leisten. Durch die Verwendung von Proliferationsmarkern, wie z.B. MIB 1, läßt sich eine Abschätzung über das Wachstumsverhalten des jeweiligen Cholesteatoms treffen. Trotz eines besseren Verständnisses der Wachstumsmechanismen kann eine konservative Behandlung eine Cholesteatomerkrankung nicht heilen, sondern höchstens das weitere Fortschreiten verlangsamen. Die operative Therapie ist daher die einzig vertretbare Behandlung dieser Mittelohrerkrankung.

## Literatur

1. Ahn JM, Huang CC, Abramson M (1990) **Localization of interleukin-1 in human cholesteatoma.** Am J Otolaryngol 11: 71–77
2. Broekaert D, Coucke P, Leperque S et al. (1992) **Immunohistochemical analysis of the cytokinin expression in the middle ear cholesteatoma and related epithelial tissues.** Ann Otol Rhinol Laryngol 101: 931–936
3. Bujia J, Schilling V, Holly A, Stammberger M, Kastenbauer E (1993) **Hyperproliferation-associated keratin expression in human middle ear cholesteatoma.** Acta Otolaryngol (Stockh) 113: 364–368
4. Bujia J, Holly A, Schilling V, Pitzke P, Schulz P, Kastenbauer E (1993) **Aberrant expression of epidermal growth factor receptor in aural cholesteatoma.** Laryngoscope 103: 326–329
5. Bujia J, Holly A, Kim C, Sudhoff H, Ostos P, Kastenbauer E (1996) **Epidermal growth factor (EGF-R) in human middle ear cholesteatoma: analysis of protein production and gene expression.** Am J Otol 17: 1–4
6. Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J (1992) **Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections.** J Pathol 168: 357–363
7. Coffey RJ, Lipes NJ, Bascom CC (1988) **Growth modulation of mouse keratinocytes by transforming growth factors.** Cancer Res 48: 1596–1602
8. Cordell JL, Falini B, Erber WN et al. (1984) **Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes).** J Histochem Cytochem 32: 219–229
9. Cowley GP, Smith JA, Gusterson BA (1986) **Increased EGF receptors on human squamous carcinoma cell lines.** Br J Cancer 53: 223–229
10. De Maria TF, Yamaguchi T, Lim DJ (1988) **Quantitative cytologic and histologic changes in the middle ear after injection of non-typhable haemophilus influenzae endotoxin.** In: Lim DJ, Bluestone LD, Klien JO, Nelson JD (eds) Recent advances in otitis media with effusion. Decker, Toronto, pp 320–323
11. Dinarello CA (1988) **Biology of interleukin 1.** FASEB J 2: 108–115
12. Esteban F, Ruiz-Cabello F, Concha A (1990) **Relationship of 4F2 antigen with local growth and metastatic potential of squamous cell carcinoma of the larynx.** Cancer 66: 1493–1498

13. Fernandez-Herrera J, Sanchez-Madrid F, Garcia-Diez A (1989) **Differential expression of the 4F2 activation antigen on human follicular epithelium in hair cycle.** *J Invest Dermatol* 92: 247–250
14. Friedmann I, Arnold W (1993) **Pathology of the ear.** Churchill Livingstone, Edinburgh London
15. Fujioka O, Huang CC (1994) **Platelet-derived growth factor in middle ear cholesteatoma.** *Eur Arch Otorhinolaryngol* 251: 199–204
16. Holly A, Bujia J, Sanchez-Madrid F (1993) **Expression von 4F2-Aktivierungs-Antigen im Mittelohrcholesteatom.** *Laryngorhinootol* 72: 324–327
17. Hsu SM, Rainc L, Fanger H (1981) **Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures.** *J Histochem Cytochem* 29: 577–580
18. Lowell S, Juhn SK, Giebink GS (1980) **Experimental otitis media following middle ear inoculation of nonviable streptococcus pneumoniae.** *Ann Otol Rhinol Laryngol* 89: 479–482
19. Martel C, Lallemandy D, Cremisi C (1995) **Specific c-myc and max regulation in epithelial cells.** *Oncogene* 10: 2195–2205
20. Nanney LB, Stoscheck CM, Magid M (1986) **Altered <sup>125</sup>I epidermal growth factor binding and receptor distribution in psoriasis.** *J Invest Dermatol* 86: 260–265
21. Nanney LB (1990) **Epidermal and dermal effects of epidermal growth factor during wound repair.** *J Invest Dermatol* 94: 624–629
22. Palva T, Taskinen E (1990) **Inflammatory cells in chronic middle ear disease.** *Acta Otolaryngol (Stockh)* 109: 124–129
23. Patterson J, Eisinger M, Haynes BF (1984) **Monoclonal antibody 4F2 reactive with basal layer keratinocytes: Studies in the normal and hyperproliferative state.** *J Invest Dermatol* 83: 210–213
24. Rapollée DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z (1988) **Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping.** *Science* 241: 708–712
25. Ristow HJ (1987) **A major factor contributing to epidermal proliferation in inflammatory skin diseases appears to be interleukin-1 or related protein.** *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1940–1944
26. Ryan AF, Baird A (1993) **Growth factors during proliferation of the middle ear mucosa.** *Acta Otolaryngol (Stockh)* 113: 68–74
27. Schilling V, Bujia J, Negri B, Schulz P, Kastenbauer E (1991) **Immunologically activated cells in aural cholesteatoma.** *Am J Otolaryngol* 12: 249–253
28. Schulz P, Bujia J, Holly A, Kastenbauer E (1993) **Possible autocrine growth stimulation of cholesteatoma epithelium by transforming growth factor-alpha.** *Am J Otolaryngol* 14: 82–87
29. Sporn MB, Roberts AB (1992) **Peptide growth factors and their receptors.** Springer, Berlin Heidelberg New York
30. Stammberger M, Bujia J, Schilling V (1995) **Alteration of epidermal differentiation in middle ear cholesteatoma.** *Am J Otol* 16: 527–531
31. Steinbach E (1985) **Das Mittelohrcholesteatom – Pathogenese und Therapie.** *HNO-Praxis Heute* 5: 1–9
32. Steinbach E (1995) **Pathogenese des Cholesteatoms.** *HNO* 43: 1–2
33. Stremmlau A, Helms J, Müller-Hermelink H-K, Hoppe F, Villiers EM de (1995) **Nachweis der DNS humaner Papillomviren (HPV) in einem „aggressiv“ wachsenden Cholesteatom.** *HNO* 43: 3–5
34. Sudhoff H, Bujia J, Holly A, Kim C, Fisseler-Eckhoff A (1994) **Functional characterization of middle ear mucosa residues in cholesteatoma samples.** *Am J Otol* 2: 217–221
35. Sudhoff H, Bujia J, Fisseler-Eckhoff A, Schulz-Flake C, Kastenbauer E, Hildmann H (1995) **Expression of a cell-cycle-associated nuclear antigen (MIB 1) in cholesteatoma and auditory meatal skin.** *Laryngoscope* 105: 1227–1231
36. Vandesande F (1983) **Peroxidase-antiperoxidase techniques.** In: Cuello AC (ed) *Immunohistochemistry.* Wiley, Chichester, pp 101–119

Eingegangen am 28. Februar 1997  
 Angenommen am 22. April 1997