

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor: Prof. Dr. med. W. Jonat)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian –Albrechts-Universität zu Kiel

**Bedeutung der Syndecan-1 Expression beim
Ductalen Carcinoma in situ der Mamma (DCIS)**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors
der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von **HEIDI MUNDHENKE**
aus **Kellinghusen**

Kiel (2013)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Jonat

2. Berichterstatter: PD Dr. C. Langer

Tag der mündlichen Prüfung: 01. Oktober 2014

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.:

Inhaltsverzeichnis

| | | Seite |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Einleitung | | 5 |
| | DCIS | 6 |
| | Syndecan-1 | 7 |
| | Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit | 9 |
| Material und Methoden | Patientenkollektiv und Materialherkunft | 10 |
| | Hormonrezeptorbestimmung | 10 |
| | Methoden | 11 |
| | • Schneiden der Gewebeblöcke | 11 |
| | • Entparaffinieren und Rehydrieren | 11 |
| | • Epitopdemaskierung | 11 |
| | • Immunhistochemie (IHC) | 12 |
| | Kontrollen | 14 |
| | Mikroskopische Auswertung | 14 |
| | Statistik | 15 |
| Ergebnisse | Rezidivfreies Überleben im Gesamtkollektiv | 17 |
| | Allgemeine epidemiologische Einflussfaktoren auf die Rezidivfreiheit | 18 |

| | | |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| | Einfluss verschiedener Therapiemodalitäten | 22 |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Rezidivfreiheit in Abhängigkeit von einer endokrinen Therapie | 22 |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Rezidivfreiheit in Abhängigkeit vom Operationsverfahren | 23 |
| | Rezidivfreiheit in Abhängigkeit von einer postoperativen Strahlentherapie | 23 |
| | Allgemeine pathologische Einflussfaktoren auf die Rezidivfreiheit | 24 |
| | Wichtige tumorbiologische Faktoren und immunhistochemische Ergebnisse | 26 |
| | Einfluss der Syndecan-1 Färbeintensität und des Anteils positiv gefärbter Zellen | 26 |
| | Die zelluläre Syndecan-1 Lokalisation | 30 |
| | Die Syndecan-1 Lokalisation im DCIS | 31 |
| Diskussion | Allgemeine epidemiologische Einflussfaktoren auf die Rezidivfreiheit | 34 |
| | Einfluss verschiedener Therapiemodalitäten | 36 |
| | Rezidivfreiheit in Abhängigkeit von einer endokrinen Therapie | 36 |
| | Wichtige tumorbiologische Faktoren und immunhistochemische Ergebnisse | 37 |
| | Einfluss der Syndecan-1 Färbeintensität und des Anteils positiv gefärbter Zellen | 37 |
| | Die zelluläre Syndecan-1 Lokalisation | 39 |
| | Die Syndecan-1 Lokalisation im DCIS | 40 |
| Zusammenfassung | | 42 |

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Literatur | | 46 |
| Danksagung | | 50 |
| Lebenslauf | | 51 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--------------------------------|
| ADH | atypische duktale Hyperplasie |
| CLIS | Carcinoma lobulare in situ |
| DAB | Diaminobenzidin-Chromogen |
| DCIS | duktales Carcinoma in situ |
| ER | Östrogenrezeptor |
| FGF | Fibroblast Growth Factor |
| HBGF | Heparin binding Growth Factors |
| HER-2/neu | Epidermal Growth Factor 2 |
| HRT | Hormonersatztherapie |
| IHC | Immunhistochemie |
| IRS | Immunreaktiver Score |
| PR | Progesteronrezeptor |
| S-1 | Syndecan-1 |

1. Einleitung

Brustkrebs ist die häufigste bösartige Neubildung bei Frauen in Deutschland. Schätzungen der Dachdokumentation Krebs des Robert Koch Instituts gehen von jährlich 58000 Brustkrebsneuerkrankungen aus [1]. Das mittlere Lebenszeitrisko von Frauen, an Brustkrebs zu erkranken, beträgt in Deutschland 9,2 %. Das heißt, dass durchschnittlich jede 11. Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt. Es ist eine Vielzahl von endogenen und exogenen Risikofaktoren für das Mammakarzinom bekannt. Dazu gehört z.B. die Lebensführung (insbesondere Überernährung, Alkoholabusus und wenig körperliche Aktivität), der hormonelle Status (Hormonersatztherapie über mehrere Jahre in der Menopause, sowohl bei Substitution von Östrogenen alleine, als auch bei der Kombination mit Gestagenen). So wurde in der britischen Studie "One Million Women Study" ein signifikanter Zusammenhang zwischen Hormonersatztherapie (HRT) in der Kohorte der postmenopausalen Frauen und der erhöhten Inzidenz des Mammakarzinoms bestätigt [2]. Die genetische Disposition (Trägerinnen der BRCA-1- und BRCA-2-Genmutation) ist ursächlich für maximal 5 bis 10% aller Mammakarzinome. Ebenfalls werden reproduktive Faktoren diskutiert, dazu gehören eine frühe Menarche (< 12. Lebensjahr), eine späte erste Schwangerschaft (> 30. Lebensjahr), eine geringe Anzahl von Schwangerschaften, kurzes bzw. kein Stillen (< 6 Monaten) und eine späte Menopause (> 55. Lebensjahr) [3,4,5,6]. Auch ionisierende Strahlung steht in einem direkten Zusammenhang mit der Entstehung des Mammakarzinoms. Hier ist das Lebensalter besonders wichtig: junge Frauen sind strahlensensibler. Besonders die Strahlenexposition während der Kindheit ist mit einem erhöhten Risiko für das Entstehen eines Mammakarzinoms im Erwachsenenalter verbunden [7].

Neben den genannten Risikofaktoren spielt die Bestimmung von prognostischen und prädiktiven Faktoren eine wichtige Rolle für die Therapie von Patientinnen mit einem Mammakarzinom. Dabei handelt es sich zum einen um Merkmale, die eine gewisse Aussage über den Krankheitsverlauf und das individuelle brustkrebsbedingte Rezidiv- und Sterberisiko zulassen und zum anderen helfen, die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens auf eine spezifische Therapie einer Patientin einzuschätzen. Zu diesen Faktoren zählen das Alter der Patientin, der TNM-Status (beschreibt die Größe des Primärtumors, den axillären Lymphknotenstatus und die

Fernmetastasierung), die Morphologie des Tumors (histopathologischer Typ, Differenzierungsgrad der Tumorzellen bzw. das Grading) und der Steroidhormonrezeptor-Status des Tumors (Östrogen- und Progesteronrezeptoren). Routinemäßig wird der HER-2/neu- (*engl.* human epidermal growth factor receptor) Status des Tumors bestimmt, da seine Überexpression in der Regel mit aggressivem Verhalten des Tumors und entsprechend schlechter Prognose einhergeht. Außerdem finden sich in der Literatur zahlreiche weitere Marker, die z.T. Verwendung in der Praxis finden. Dazu zählen etliche Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, deren direkte oder indirekte Beteiligung an der Tumorentstehung, der Tumorzellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Zellmigration und Invasion, sowie an der intrazellulären Signaltransduktion von malignen Zellen von Bedeutung ist.

DCIS

Das duktales Carcinoma in situ (DCIS) der Brust ist eine Läsion, die keine Invasivität zeigt und nicht metastasiert. Das DCIS kann jedoch Ausgangspunkt eines invasiven Mammakarzinoms sein, wenn es unentdeckt, bzw. untherapiert bleibt. Im DCIS nehmen die Tumorzellen ihren Ausgang vom Epithel der Drüsenausführungsgänge (der Milchgänge). Die Tumorzellen werden durch die Basalmembran vom umgebenden Stroma abgegrenzt. Übergänge vom DCIS zu einem invasiven Karzinom stellen ein Kontinuum dar, welches mit dem gesunden Brustepithel beginnt, sich über die atypische duktales Hyperplasie (ADH) und das DCIS fortsetzt und schließlich in ein invasives Karzinom münden kann. 20-50% der DCIS gehen ohne Therapie innerhalb von 20 Jahren in ein invasives Karzinom über [8]. Heutzutage ist die Detektion im Rahmen des Brustkrebsscreenings oder anderer qualitätsgesicherter Vorsorgemaßnahmen sehr gut, so dass mittlerweile das Mikrokalk-assoziierte DCIS bis zu 25% aller neuen Mammakarzinome ausmacht.

Die DCIS zeigen eine große biologische Variabilität. Sie werden genauso, wie die invasiven Mammakarzinome auch, von diversen tumorbiologischen Faktoren beeinflusst. Bei guter Differenzierung zeigt sich fast immer eine ER und PR Positivität. Diese Rate sinkt auf nur 30% bei den schlecht differenzierten Läsionen. Dagegen steigt kontinuierlich die Proliferationsrate von den differenzierten zu den schlecht differenzierten DCIS an. Genexpressionsanalysen zeigen nur geringe Unterschiede zwischen DCIS und invasiven Mammakarzinomen. Dieser Umstand

legt die Vermutung nahe, dass die umgebenden Stromazellen ein wichtiger Faktor für die Tumorprogression von einem nichtinvasiven zu einem invasiven Geschehen sind. Die Genexpressionsanalysen ergeben deutliche Unterschiede, wenn die stromale Mikroumgebung mit in die Analysen einbezogen wurde [10,14].

Das DCIS stellt eine relativ späte Stufe in der Brustkrebsentwicklung dar. Die Einteilung der DCIS Läsionen in low, intermediate oder high grade ist nicht nur relativ gut reproduzierbar, sondern hat auch einen prognostischen Wert. Es hat sich gezeigt, dass DCIS mit einem hohen nukleären Grading ein höheres Lokalrezidivrisiko haben, als invasive Mammakarzinome [10,14]. Von daher werden Bemühungen unternommen, das Grading exakt zu bestimmen.

In den meisten Fällen werden heutzutage DCIS durch eine Tumorexzision und eine postoperative Radiatio behandelt. Die Lokalrezidivrate liegt bei lediglich 10%, wobei die Hälfte invasive Rezidive sind. Eine Mastektomie wird gelegentlich bei großen DCIS oder bei ungünstigen Zusatzkriterien notwendig. Bei Läsionen über 5 cm Durchmesser ist die Sentinel Lymphknotenbiopsie eine Option, da bei der notwendigen komplexen histopathologischen Befundung großer DCIS Läsionen leicht mikroinvasive bzw. kleine invasive Karzinome der Detektion entgehen können. Die sichere R0 Resektion ist ein wesentlicher Faktor zur Rezidivvermeidung, daher kommt der exakten Bestimmung der Resektionsränder eine große Bedeutung zu [9,11,12].

Syndecan-1

Um ihre Wirkung zu entfalten, benötigen einige Wachstumsfaktoren, wie z.B. die Familie der Heparin-Binding Growth Factors (HBGF) bei der Rezeptor-Bindung und Signalübertragung transmembrane Co-Rezeptoren. Die prominentesten Vertreter der HBGF kommen aus der Fibroblast Growth Factor (FGF) Familie. Es handelt sich hierbei um transmembranöse Rezeptor Tyrosinkinasen mit multiplen Aufgaben während der Tumorzellentstehung und –progression. Der wichtigste Vertreter der FGF Familien, das FGF-2 ist ein wichtiger Angiogenesefaktor und wirkt zudem direkt modulierend (stimulierend und hemmend) auf Mammakarzinomzellen. Die stimulierende oder hemmende Wirkung wird insbesondere durch Proteoglykane als Co-Faktoren bestimmt [15]. Proteoglykane sind glykosylierte Proteine, die nach ihren Glykosaminoglykanketten in vier verschiedenen Gruppen eingeteilt werden:

Heparansulfat-Proteoglykane, Keratansulfat-Proteoglykane, Chondroitinsulfat-Proteoglykane und Dermatansulfat-Proteoglykane. Die transmembranen Heparansulfat-Proteoglykane bilden zwei Hauptfamilien: Syndecane und Glypicane. Die Syndecan-Familie besteht aus 4 Mitgliedern: Syndecan-1 bis -4, die sich durch ihre extrazelluläre Domäne unterscheiden. Durch ihre zytoplasmatischen Domänen kommt es zur Verbindung mit dem Zytoskelett, auf diesem Wege tragen sie zur Zell-zu-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, zur Zellproliferation und zur Zellmotilität bei. Syndecan-1 (bekannt auch als CD138) ist eines der am besten erforschten Mitglieder der Syndecan-Familie. Eine Expression des Syndecan-1 wurde in epithelialen Zellen, bei Fibroblasten, Basalzellen der Epidermis, Hepatozyten, Trophoblastzellen, Plasmazellen, Makrophagen und Endometriumzellen beschrieben [16,17,18].

Syndecan-1 ist ein durchaus wichtiger Faktor für die Brustphysiologie und für das Wachstum von Mammakarzinomen. Normale Milchgänge der Brust zeigen auf der Oberfläche der epithelialen Zellen eine charakteristische Syndecan-1 Lokalisation. Im stromalen Gewebe einer gesunden Brustdrüse wird kein Syndecan-1 nachgewiesen. In Mammakarzinomen kann Syndecan-1 in epithelialen Tumorzellen, in Stromaanteilen oder aber auch in beiden Komponenten exprimiert werden. Häufig ist eine hohe Syndecan-1 Expression mit einem aggressiven Tumorwachstum und einer verstärkten Chemotherapieresistenz vergesellschaftet [13,19].

Auch von duktalem Carcinomata in situ (DCIS) wird von einer verstärkten Syndecan-1 Expression, ähnlich wie der bei invasiven Mammakarzinomen berichtet [14]. Allerdings ist die Bedeutung der Syndecan-1 Expression in DCIS unterschiedlicher Kernmalignitäten unklar. Bisher gibt es keine hinreichenden Untersuchungen zum Einfluss des Syndecan-1 auf die Tumorprogression von prä-invasiven hin zu invasiven Tumoren oder zum spezifischen Expressionsverhalten der DCIS Tumorzellen bzw. einer Syndecan-1 Expression im peritumoralen (DCIS) Stroma.

Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Ziel war es, für die untersuchten DCIS Fälle das mittlere rezidivfreie Überleben zu bestimmen. Nach einer exakten Charakterisierung der Krankheitsfälle sollte der Einfluss allgemeiner und individueller epidemiologischer Einflussfaktoren auf die Rezidivfreiheit gemessen werden. Insbesondere sollte hierbei die Rolle von Faktoren wie des Lebensalters und des Menopausenstatus bei der Ersterkrankung untersucht werden. Des Weiteren sollen Lifestylefaktoren wie eine aktuelle oder frühere Hormonersatztherapie und ein Nikotinabusus und konkrete therapeutische Interventionen wie das Operationsverfahren, eine postoperative Radiotherapie der erkrankten Brust und einer endokrinen Therapie bei positivem Hormonrezeptorstatus des DCIS, Beachtung finden. Neben diesen epidemiologischen Faktoren werden allgemeine pathologische Faktoren wie Grading, Wachstumsmuster und Hormonrezeptorstatus am Kollektiv untersucht und mit dem rezidivfreien Überleben korreliert.

Das Hauptziel der Untersuchungen war es, die Bedeutung der Expression des Co-Rezeptors Syndecan-1 in DCIS für den Krankheitsverlauf zu untersuchen. Die tumorbiologischen Untersuchungen schließen den Einfluss der Syndecan-1 Färbeintensität und des Anteils positiv gefärbter Zellen, der zellulären Syndecan-1 Lokalisation und der Syndecan-1 Lokalisation im DCIS mit ein. Sowohl der Einfluss der zuvor bestimmten epidemiologischen Faktoren, wie auch der allgemein-pathologischen Kriterien auf die Syndecan-1 Expression wird weitreichend analysiert. Diese Daten sollen dann im Gesamtkollektiv und in den Subgruppen (low grade, intermediate grade, high grade und frühinvasives Mammakarzinom) mit dem rezidivfreien Überleben korreliert werden. Eine wichtige zu klärende Frage ist, ob zwischen den Subgruppen ein differentielles Expressionsverhalten besteht. Dieses würde ggf. eine aktive Rolle des Syndecan-1 auf den Grad des DCIS und unter Umständen für den Tumorprogress vom low grade DCIS, über das intermediate und high grade DCIS zum mikroinvasiven Karzinom nahelegen.

2. Material und Methoden

Patientenkollektiv und Materialherkunft

Grundlage der vorliegenden Arbeit sind Gewebeschnitte von Patientinnen, die zwischen 2000 und 2006 wegen eines duktales Carcinoma in situ (DCIS) an der Frauenklinik des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel operiert worden waren. Als Vergleichsläsionen wurden exemplarisch zusätzlich jeweils Schnitte von atypischen duktales Hyperplasien (ADH) und Carcinoma lobulare in situ (CLIS) hinzugezogen.

Insgesamt standen von 127 Patientinnen archivierte repräsentative Hämatoxylin-Eosin-Schnitte mit dazugehörigen Paraffingewebeblöcken zur Verfügung. Für jede dieser Patientinnen wurden die folgenden klinischen und pathologischen Daten retrospektiv erhoben:

- Alter der Patientinnen bei der Primäroperation
- Kernmalignitätsgrad
- Hormonrezeptorstatus
- (Aufreten eines Rezidivs)
- Intensität der Syndecan-1 Expression
- % der positiven Zellen im DCIS
- Lokalisationsmuster im Gewebe

Die Patientinnen hatten schriftlich der späteren wissenschaftlichen Bearbeitung des Tumormaterials zugestimmt. Die Durchführung erfolgte nach Befürwortung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Kiel. Die pathologische Begutachtung im Rahmen der Primärtherapie wurde im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel vorgenommen.

Hormonrezeptorbestimmung

Der Hormonrezeptorstatus der untersuchten Tumorpräparate wurde mittels Immunhistochemie postoperativ im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel bestimmt. Das Expressionsmuster des Tumorgewebes wurde nach dem Immunreaktiven Score (IRS) nach Remmele und Stegner ausgewertet [40]. Die Scorewerte zwischen 0 und 12 ergeben sich aus der

Multiplikation der Punktzahlen für Färbeintensität (0 bis 3) mit den Punktzahlen für den Prozentsatz positiver Zellen (0 bis 4).

Methoden

Der praktische Teil der Studie wurde im onkologischen Labor der Frauenklinik des UKSH, Campus Kiel in enger Kooperation mit dem Institut für Pathologie des UKSH, Campus Kiel durchgeführt.

Schneiden der Gewebeblöcke

Zur Anfertigung von Schnittpräparaten wurde ein Rotationsmikrotom verwendet. Von den gekühlten Paraffinblöcken wurden mit dem Mikrotom ca. 2-3 µm dünne Scheiben geschnitten. Die erhaltenen Schnitte wurden für kurze Zeit in einem Kaltwasserbad (Raumtemperatur) aufgefangen und danach in ein Wasserbad (35-40°C) gegeben. Dadurch wurden eine Streckung und Faltenbildung vermieden. Die glatten Paraffinschnitte wurden auf saubere, fettfreie und silanisierte 24x60 mm Objektträger aufgezogen. Durch die Aufbewahrung in einem Brutschrank bei 42°C über Nacht wurden sie getrocknet und ihre Haftung auf dem Objektträger verbessert.

Entparaffinieren und Rehydrieren

Zur Entparaffinierung und Rehydrierung der Paraffinschnitte wurden diese in Xylol eingebracht und durch eine absteigende Alkoholreihe (Ethanol 96%, 80% und 70%) und nachfolgende Spülungen mit TBS-Puffer und Aqua dest. in ein wässriges Milieu überführt. Um das Austrocknen der Schnitte und damit unspezifische Artefakte zu vermeiden, wurden die Objektträger zwischen den einzelnen Schritten der immunhistochemischen Färbung in den TBS-Waschpuffer eingebracht.

Epitopdemaskierung durch Hitzebehandlung

Zur Demaskierung der Antigene wurde eine Mikrowellenbehandlung der Paraffinschnitte durchgeführt. Die Schnitte wurden hierfür in ein hitzestabiles Mikrowellengefäß mit 1 Liter Citratpuffer/Demaskierungspuffer (10 mmol, pH 6) gegeben.

Es erfolgte das „Kochen“ der Schnitte in der Mikrowelle für 20 min bei 1000 Watt. Danach wurden die Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur und anschließend 5 min unter fließendem Leitungswasser abgekühlt und in TBS eingebracht.

Um die endogene Peroxidaseaktivität zu unterdrücken, wurden die vorbehandelten Paraffinschnitte für 20 min bei Raumtemperatur mit Peroxidase-Blockierungslösung inkubiert. Nächster Schritt war das dreimalige Spülen mit Waschpuffer. Vor dem Auftragen des Primärantikörpers wurden die Schnitte für 20 min in „normal goat Serum“ (Dako Glostrup, Dänemark , S 3022) (Verdünnung 1:50 mit 1%igem BSA = Bovine Serum Albumine) inkubiert. Mit diesem Schritt wurde die unspezifische Hintergrundfärbung vermieden. In einem weiteren Schritt erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (CD 138, Syndecan-1, Biozol, BLZ-03405) in optimaler Verdünnung (1:1000) über Nacht bei 4°C. Die Schnitte wurden am nächsten Tag in TBS-Waschpuffer gründlich 3 x 5 min bei Raumtemperatur gewaschen, um nicht gebundene Antikörper und unspezifische Reste wegzuspülen.

Eine zweite Inkubation erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper HRP Kaninchen/Maus („ready to use“- Bestandteil des Dako kit K5007), welcher an die Fc-Teile der primären Antikörper bindet. Nach erneuter gründlicher Spülung im TBS-Waschpuffer wurde die Substratentwicklung mit DAB-Chromogen und Substratpuffer in Verdünnung 1:50 durchgeführt. Das Braunfärben des Antigens durch DAB-Chromogen wurde innerhalb von 10 min ausgelöst und durch das Überführen der Schnitte in eine Küvette mit Leitungswasser gestoppt. Danach erfolgte die Gegenfärbung für 10 min mit Hämalaun nach Mayer mit anschließendem Waschen der Schnitte für 10 min unter fließendem Leitungswasser. Nach Entwässern der Schnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (80%, 96%, 100% Ethanol, und schließlich Xylol), wurden diese mit Eindeckmedium (Fa. Leica Wetzlar, Deutschland) bedeckt und mit einem Deckgläschen eingedeckt.

Immunhistochemie (IHC)

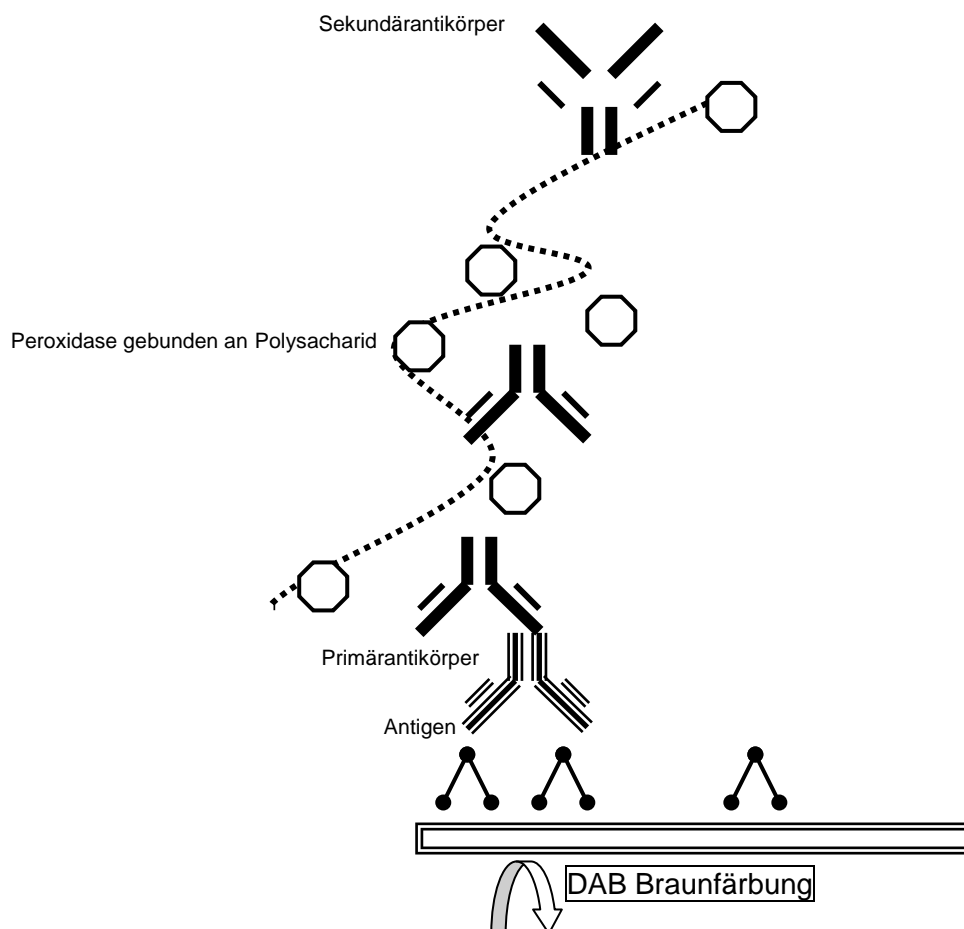
Prinzip der Dako EnVision™-Methode

Mit Hilfe der Immunhistochemie kann man ein bestimmtes Antigen in einem Gewebeschnitt nachweisen. Bei der vorliegenden Arbeit wurde die Dako EnVision™-Technologie verwendet. Das Prinzip beruht darauf, dass zuerst ein primärer unkonjugierter (unveränderter) Antikörper, der gegen das darzustellende Antigen gerichtet ist, an dieses angelagert wird.

Abbildung 1: Schema der Immunperoxidase-Färbung nach der Dako EnVision™-Methode (modifiziert nach Dako)

Schritt 1: Inkubation mit dem Primärantikörper.

Schritt 2: Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der zusammen mit Peroxidase an das Polysaccharid gebunden ist.



Im zweiten Schritt wird ein mit einem Polysaccharidkomplex (Dextrankomplex) konjugierter sekundärer Antikörper, der wiederum Träger zahlreicher Peroxidase-Moleküle ist, angekoppelt. Nach Zugabe von Substratpuffer, Wasserstoffperoxid als Katalysator und des 3,3'-Diaminobenzidin- (DAB) Chromogens entsteht das farbige Endprodukt.

| | |
|-------------------|--------------------------|
| Antikörper | Syndecan-1, CD138 |
| Klonalität | Monoklonal, Klon B-B4 |
| Herkunft | Maus |
| Verdünnung | 1:1000 |
| Detektion | EnVision™ |
| Firma | BIOZOL |
| Code-Nr. | BLZ-03405 |

Primärantikörper

Für die immunhistologische Analyse des Tumormaterials wurde der folgende Primärantikörper gegen die beschriebenen Epitope verwendet. Die optimale, spezifische Färbung der Schnitte bei gleichzeitig geringster Hintergrundanfärbung, die den Kontrast der spezifischen Reaktion erheblich vermindern kann, wurde für den primären Antikörper durch vorhergehende Testreihen ermittelt. Durch diese wurde für den Antikörper die optimale

Verdünnung, Inkubationszeit und –temperatur sowie die nötige Antigendemaskierungszeit erzielt.

Kontrollen

Bei der Färbereihe wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Als Positivkontrollen diente Gewebe mit bekannter Expression von Syndecan-1 (invasiv duktales Mammakarzinom).

Die Negativkontrollen dienten dazu, unspezifische Reaktionen zu erkennen. Dieses wurde durch fehlendes Auftragen des Primärantikörpers auf die oben genannten Präparate bei ansonsten gleicher Vorgehensweise erzielt.

Mikroskopische Auswertung

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops ausgewertet. Die Schnitte wurden zur Orientierung und zum Aufsuchen der repräsentativen DCIS Regionen im Gewebe zunächst bei 10- und 25-fach Lupenvergrößerung betrachtet. Danach erfolgte die Betrachtung und Auszählung der angefärbten Zellen bei 40-

facher Lupenvergrößerung. Als beurteilbar wurden solche Zellen angesehen, deren Zellgrenzen erkennbar waren und die entweder durch den spezifischen Antikörper oder durch die Gegenfärbung angefärbt waren. Die Zahl der angefärbten (positiven) Tumorzellen wurde semiquantitativ abgelesen. Die Intensität der Färbung wurde folgendermaßen unterteilt:

0 = keine Anfärbbarkeit

1 = schwache Färbeintensität

2 = mäßige Färbeintensität

3 = starke Färbeintensität

Daneben erfolgte jeweils eine Beurteilung, in welchem Zellkompartiment die zelluläre Färbung exakt lokalisiert ist (membranständig, zytoplasmatisch oder nukleär). Bei den Färbungen gegen Syndecan-1 wird auch Stroma markiert. Daher erfolgt zusätzlich zu der reinen Betrachtung der Zellen, eine Evaluation der Syndecan-1-Verteilung im DCIS Gewebe. Zur Beschreibung der Lokalisationen wurden hier die Gruppen zentral, peripher und diffus (zentral und peripher) gebildet.

Statistik

Quantitative Größen wurden anhand von Mittelwert und Standardabweichung, Minimum und Maximum sowie den Quartilen beschreibend dargestellt und mittels Kolmogorov-Smirnov-Test oder bei kleinen Fallzahlen in den zu vergleichenden Gruppen mit dem Shapiro Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Aufgrund signifikanter Abweichung von einer Normalverteilung erfolgten der Vergleich zweier unabhängiger Stichproben mit dem U-Test und der Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben mit dem Kruskal-Wallis-Test, nur das Alter konnte parametrisch mittels ANOVA analysiert werden.

Zu ordinal und nominal skalierten Größen wurden absolute und prozentuale Häufigkeiten angegeben. Je zwei Größen dieser Skalierung wurden in Kontingenztafeln gegenübergestellt, so dass mit dem Chi-Quadrat-Test geprüft werden konnte, ob eine Abhängigkeit bestand. Bei zu kleinen erwarteten Häufigkeiten wurde alternativ der exakte Test nach Fisher eingesetzt.

Mittels Kaplan-Meier-Analyse und Log Rang-Test oder Coxregression wurden die untersuchten Parameter hinsichtlich Einfluss auf das rezidivfreie Überleben untersucht.

Es wurde stets zweiseitig getestet und ein Signifikanzniveau von 5% zugrunde gelegt. Eine Alpha-Adjustierung für multiples Testen fand nicht statt, die Ergebnisse wurden entsprechend vorsichtig interpretiert. Für die Durchführung der statistischen Berechnungen wurde IBM SPSS Statistics 20 (SPSS Inc. an IBM Company, Chicago, IL) eingesetzt.

Ergebnisse

Für die Auswertung standen prinzipiell für insgesamt 127 Patientinnen repräsentatives paraffiniertes DCIS Gewebe und auswertbare klinische Daten zur Verfügung. Das mediane Follow-Up der Patientinnen lag bei 45,4 Monaten.

Rezidivfreies Überleben im Gesamtkollektiv

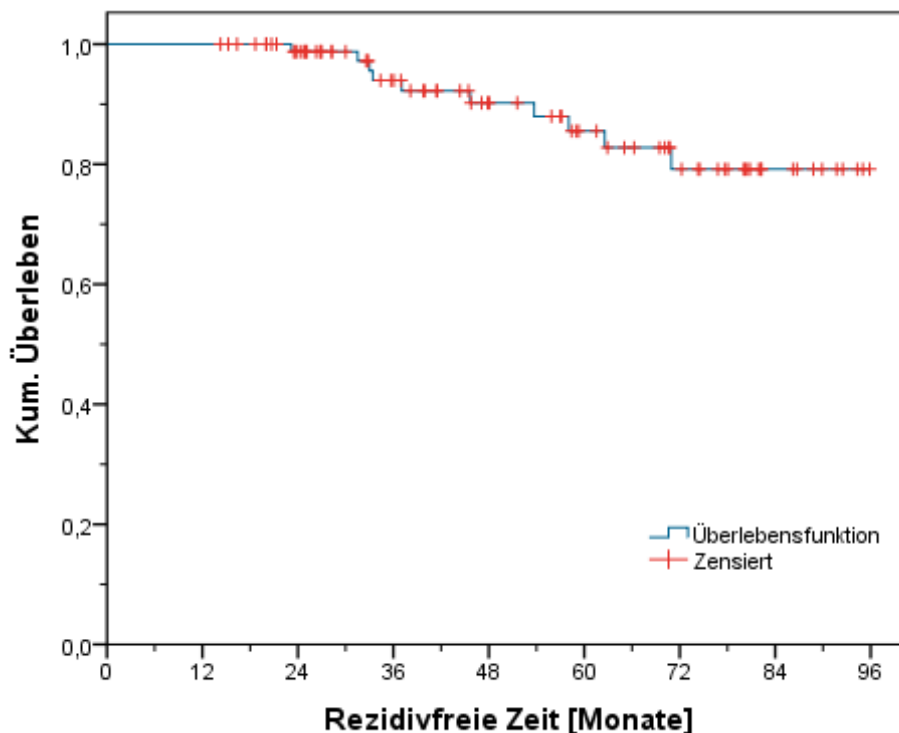


Abbildung 2: Darstellung des rezidivfreien Überlebens, n=127

Für die Berechnung des rezidivfreien Überlebens steht für n=88 Patientinnen mit DCIS ein ausreichendes Follow-Up zur Verfügung. 11 Patientinnen erlitten ein DCIS Rezidiv oder ein invasives Mammakarzinomrezidiv. 4 Patientinnen erkrankten an anderen Malignomen oder verstarben aus einer nicht brustkrebsbedingten Ursache. Insgesamt überlebten 88% der Patientinnen 96 Monate rezidivfrei. Damit liegt das mittlere rezidivfreie Überleben bei 86 Monaten.

In den Subgruppen unterschiedlicher Kernmaliginität fanden sich 16 low grade, 44 intermediate grade, 21 high grade und 7 high grade DCIS mit einer Mikroinvasion. In der low grade, sowie in der high grade Gruppe mit Mikroinvasion trat während des

Follow-Up kein Rezidiv auf. 6 Fälle mit einem intermediate grade DCIS und 4 high grade DCIS rezidierten im Lauf der Nachbeobachtungszeit. Die mediane rezidivfreie Überlebenszeit lag dabei in der intermediate Gruppe bei 85 Monaten und in der high grade DCIS Gruppe bei 77 Monaten. Im Log-Rank-Test ergab sich kein signifikanter Nachweis eines Unterschiedes für das rezidivfreie Überleben zwischen der intermediate grade und der high grade DCIS Gruppe ($p=0,208$) [Abb. 3].

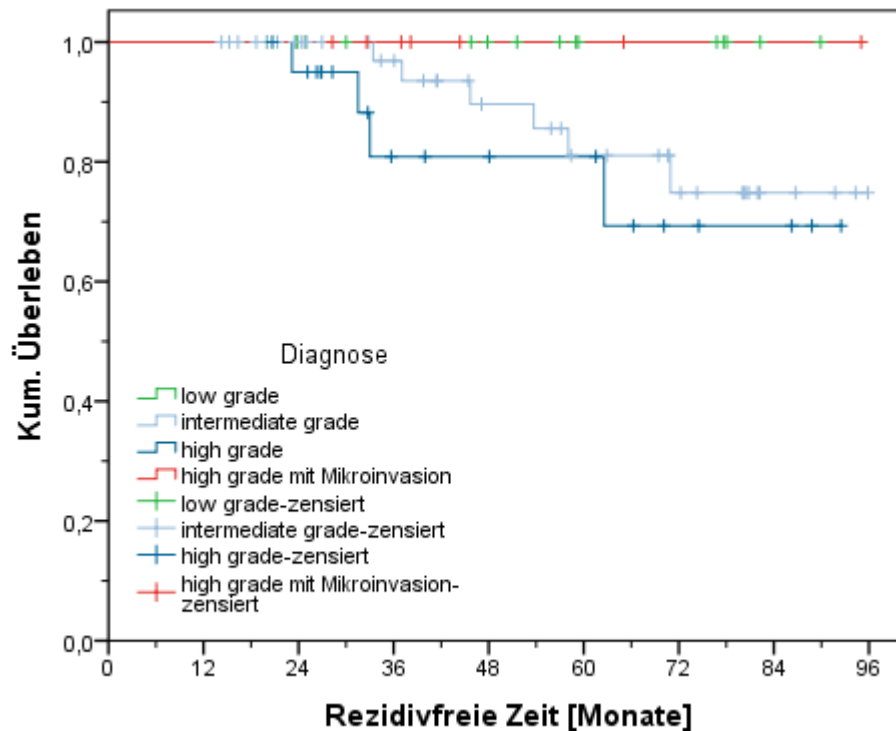


Abbildung 3: Darstellung des rezidivfreien Überlebens nach Subgruppen unterschiedlicher Kernmalignität bzw. unterschiedlichem Wachstumsverhalten.

Weder die Expression des Östrogenrezeptors ($p=0,657$), noch des Progesteronrezeptors ($p=0,674$) hatte einen Einfluss auf das rezidivfreie Überleben.

Allgemeine epidemiologische Einflussfaktoren auf die Rezidivfreiheit

Das Alter der Patientinnen bei Diagnosestellung hatte in der durchgeführten Cox-Regressions-Analyse keinen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben

($p=0,111$). Die an dieser Studie teilnehmenden Patientinnen waren im Durchschnitt 58 Jahre alt (36-82 Jahre) (Median 59 Jahre).

Für 81 DCIS Patientinnen lagen Daten hinsichtlich ihres Menopausenstatus vor. 19 der Frauen waren prämenopausal. 62 waren postmenopausal.

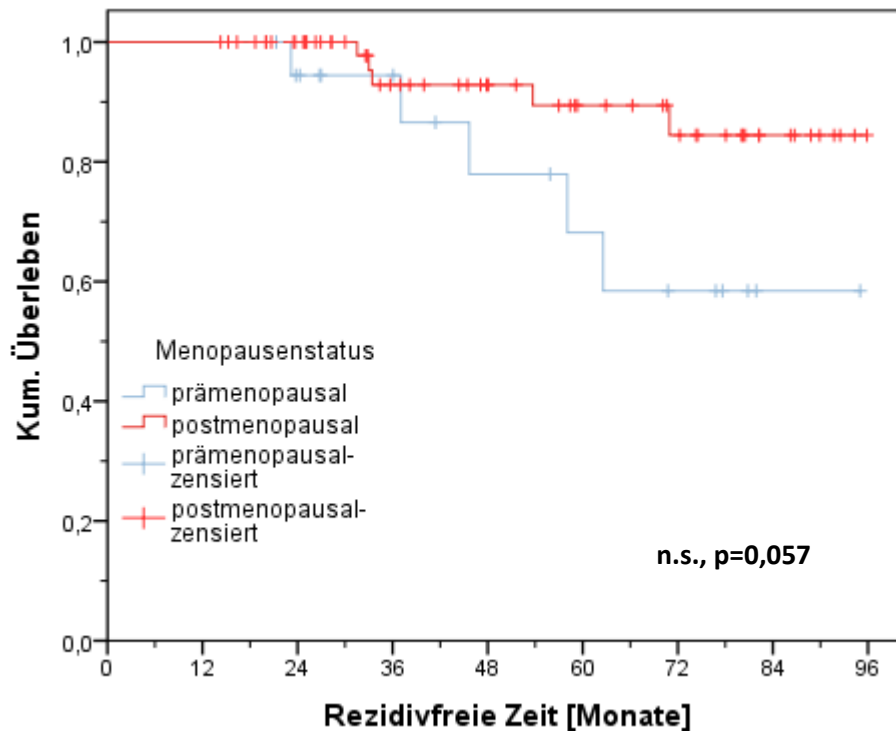


Abbildung 4: Korrelation des Menopausenstatus mit dem rezidivfreien Überleben

Der postmenopausale Status ging im Vergleich mit prämenopausalen Patientinnen mit einer deutlich verbesserten Rezidivfreiheit einher (statistischer Trend). In der Log-Rank-Analyse ergab sich jedoch kein statistisch signifikanter Einfluss des Menopausenstatus auf das rezidivfreie Überleben ($p=0,057$).

Im Gesamtkollektiv lag zu 69 Patientinnen eine Information zu einer früheren Einnahme von Hormonersatzpräparaten (HRT) vor. 38 DCIS Patientinnen hatten früher keine HRT und 31 hatten eine Hormonersatztherapie erhalten. Für eine frühere HRT konnten keine ungünstigen Einflüsse auf das rezidivfreie Überleben nach DCIS ($p=0,128$) nachgewiesen werden.

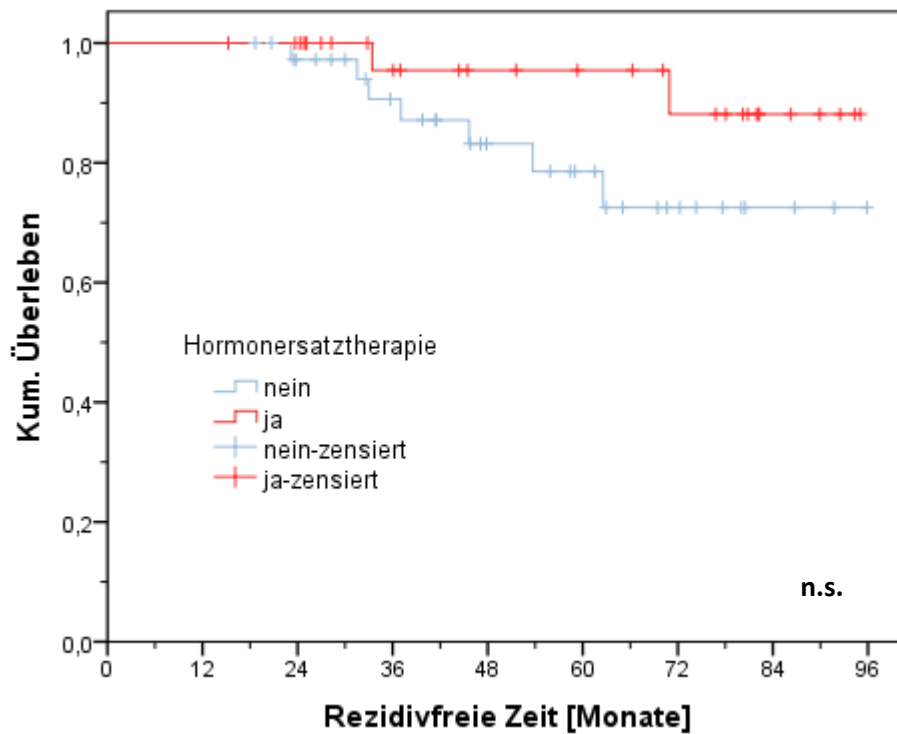


Abbildung 5: Korrelation einer früheren Hormonersatztherapie mit dem rezidivfreien Überleben

In einer weiteren epidemiologischen Analyse wurde der Einfluss eines früheren und aktuellen Nikotinkonsums auf die Rezidivfreiheit nach DCIS untersucht. Zu 69 Patientinnen lagen dafür Daten zu einem etwaigen Nikotinkonsum vor. 46 der Patientinnen hatten zu keinem Zeitpunkt geraucht. 17 hatten früher geraucht und 6 Patientinnen rauchten noch bei der DCIS Diagnosestellung, bzw. danach.

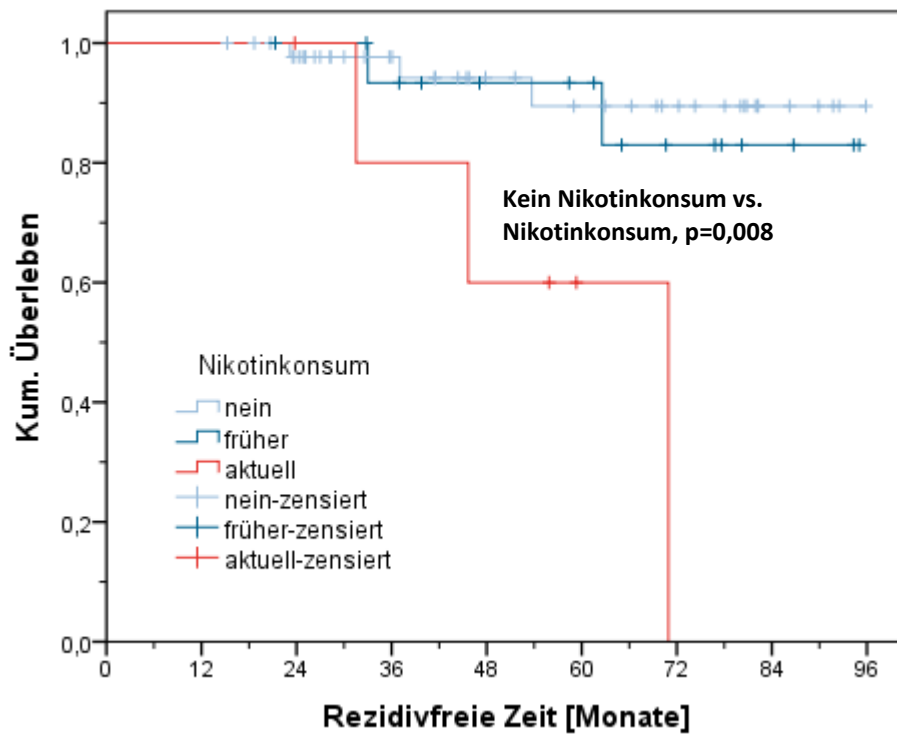


Abbildung 6: Einfluss eines früheren oder aktuellen Nikotinkonsums auf das rezidivfreie Überleben

In der Gruppe der Nichtraucherinnen ergaben sich im Follow-Up 3 brustkrebsbedingte Ereignisse, während sich bei den Ex-Raucherinnen 2 Ereignisse und bei den aktuellen Raucherinnen 3 Ereignisse (50% der an einem DCIS erkrankten Frauen) eingestellt hatten. Im Log-Rank Test zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Nikotinkonsums auf ein verschlechtertes rezidivfreies Überleben ($p=0,008$).

Einfluss verschiedener Therapiemodalitäten

Rezidivfreiheit in Abhängigkeit von einer endokrinen Therapie

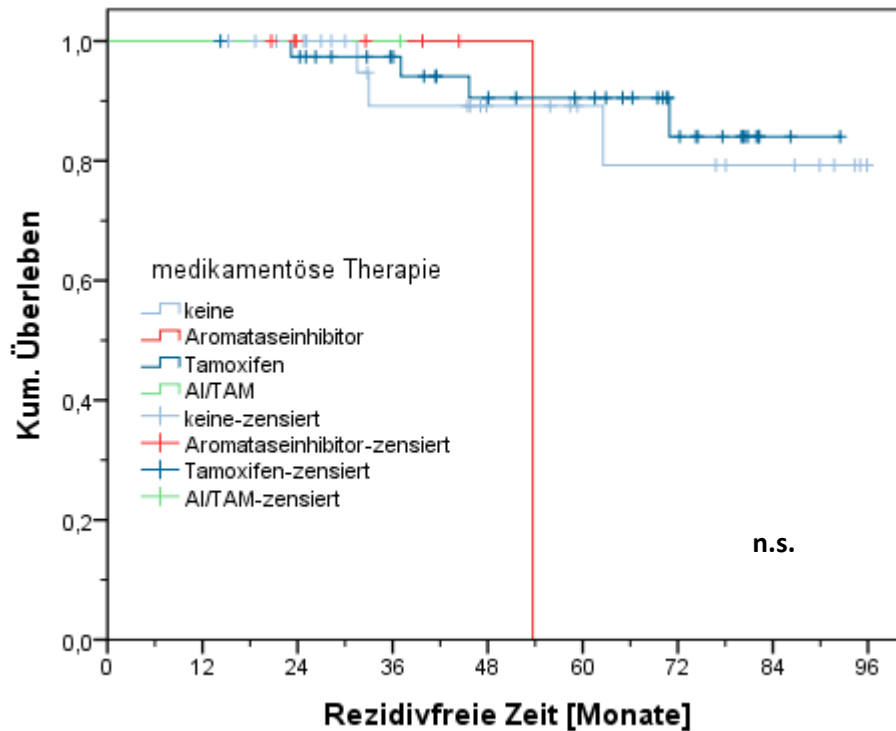


Abbildung 7: Einfluss einer endokrinen Therapie auf die Rezidivfreiheit nach DCIS

Von 75 vor Patientinnen lagen Follow-Up Daten und Daten zu einer medikamentösen Therapie vor, so daß sie für die folgende Analyse auswertbar waren. 28 Patientinnen hatten keine endokrine Therapie erhalten. 39 Frauen haben Tamoxifen als quasi adjuvante Therapie erhalten, 7 einen Aromataseinhibitor und eine Patientin eine Switch Therapie mit einem Aromataseinhibitor und Tamoxifen. Im Log-Rank-Test ergab sich kein Vorteil für eines der endokrinen Schemata. Insgesamt brachte auch der prinzipielle Einsatz einer endokrinen Therapie (n=47) im Vergleich zu keiner medikamentösen Therapie (n=28) im Hinblick auf das rezidivfreie Überleben keinen Vorteil (p=0,815).

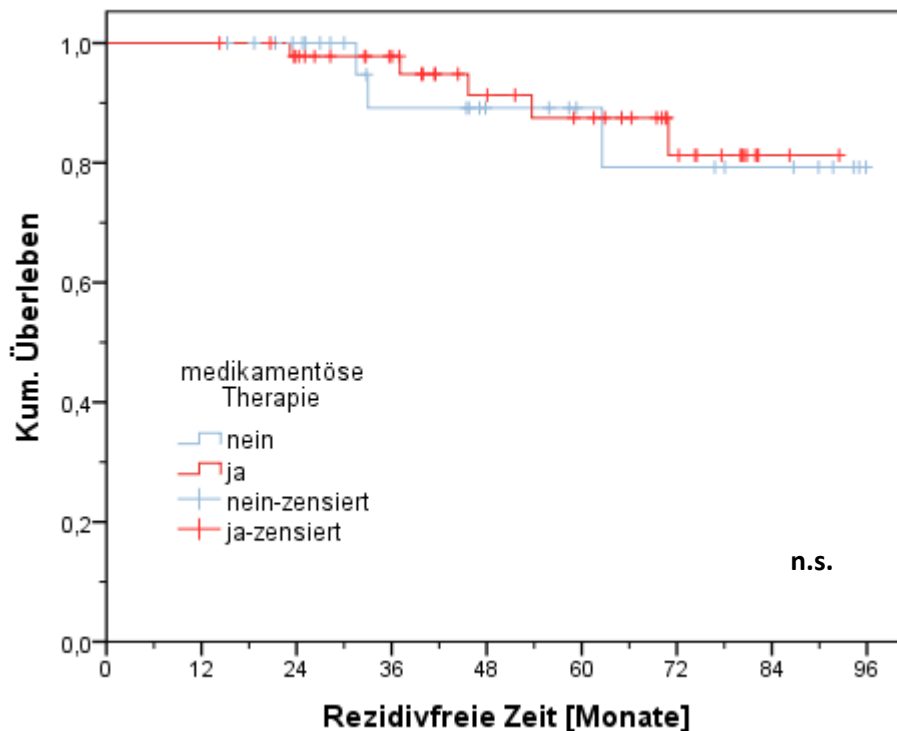


Abbildung 8: Einfluss einer medikamentösen Intervention auf die Rezidivfreiheit nach DCIS

Rezidivfreiheit in Abhängigkeit vom Operationsverfahren

Von insgesamt 127 Patientinnen lagen von 124 aussagekräftige Operationsberichte vor. 92 der DCIS Patientinnen waren danach brusterhaltend und 32 ablativ operiert worden. Von den Patientinnen nach Ablatio blieben 29 rezidivfrei. Nach brusterhaltender Therapie traten 8 Rezidive auf.

Rezidivfreiheit in Abhängigkeit von einer postoperativen Strahlentherapie

Von 77 Patientinnen haben 42 keine Radiatio erhalten. 35 haben eine postoperative Strahlentherapie erhalten. Darunter waren 4 mit low grade DCIS, 18 mit einem intermediate grade, 11 mit einem high grade DCIS und 2 mit einem high grade DCIS und einer Mikroinvasion. Der durchgeführte Log-Rank-Test erbrachte keinen Vorteil für das rezidivfreie Überleben durch eine Strahlentherapie ($p=0,941$).

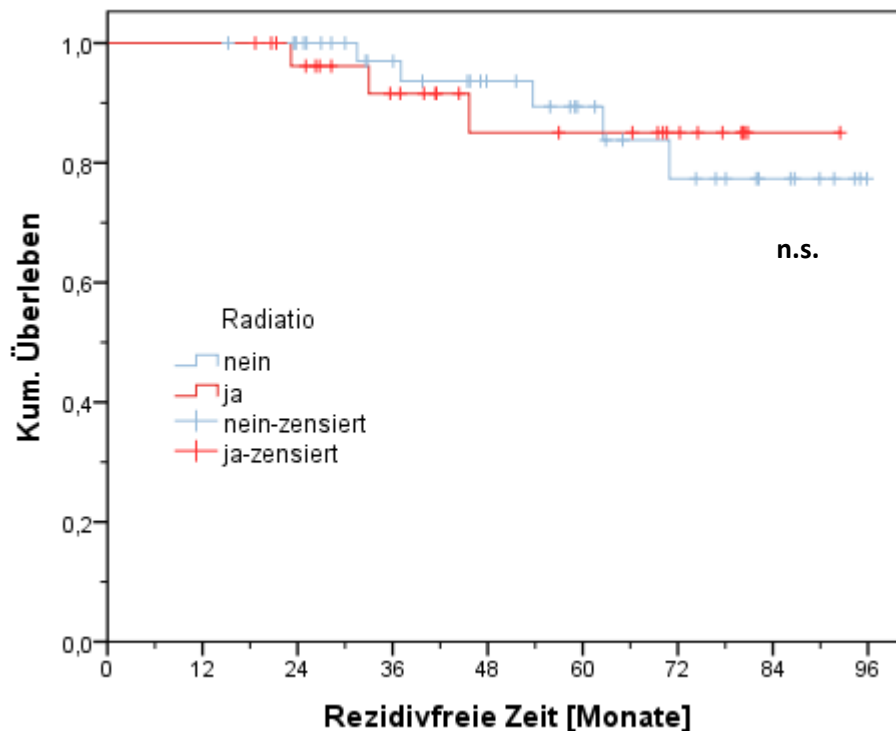


Abbildung 9: Korrelation einer durchgeführten postoperativen Radiatio nach brusterhaltender Therapie mit der Rezidivfreiheit (kumulativ für DCIS Subgruppen, unabhängig von der Kernmalignität).

Allgemeine pathologische Einflussfaktoren auf die Rezidivfreiheit

In dieser Auswertung erbrachte die Cox-Regressionsanalyse keinen signifikanten Einfluss für die Größe des DCIS auf die spätere Entstehung eines Rezidivs ($p=0,206$). Auch der tumorfreie Resektionsrand war keine signifikante Einflussgröße für die spätere Rezidivfreiheit ($p=0,381$). Für 54 der DCIS Fälle lagen die Daten hinsichtlich einer Östrogen (ER)- und Progesteronrezeptor(PR)-Expression mit anschließendem Follow-Up vor. 7 der Tumoren zeigten keine ER Expression, 47 DCIS waren ER positiv. 22 DCIS waren PR negativ, 32 zeigten eine immunhistochemisch nachgewiesene PR Expression.

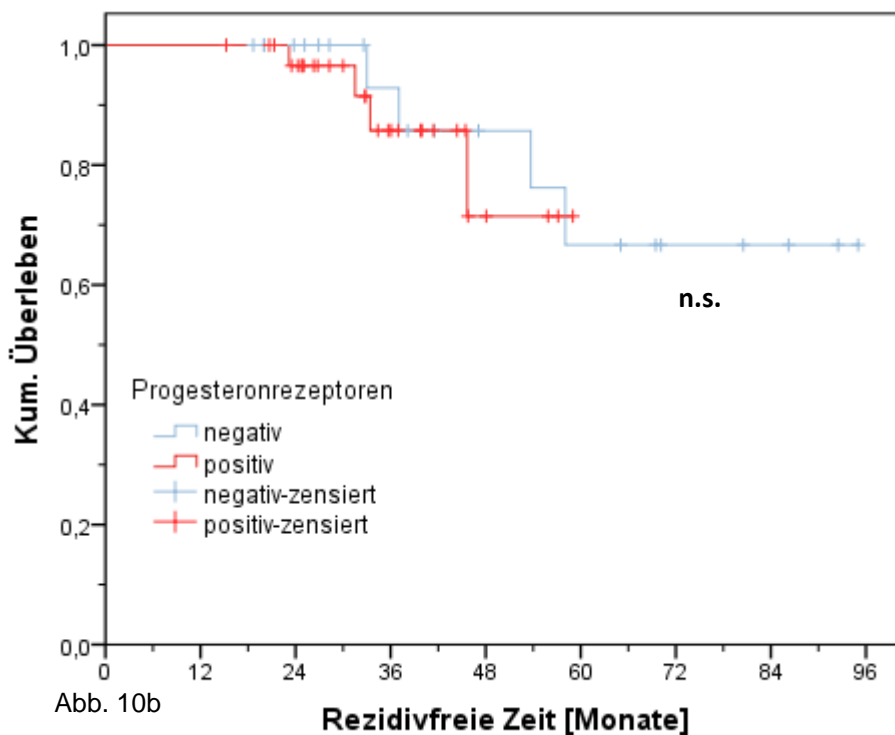
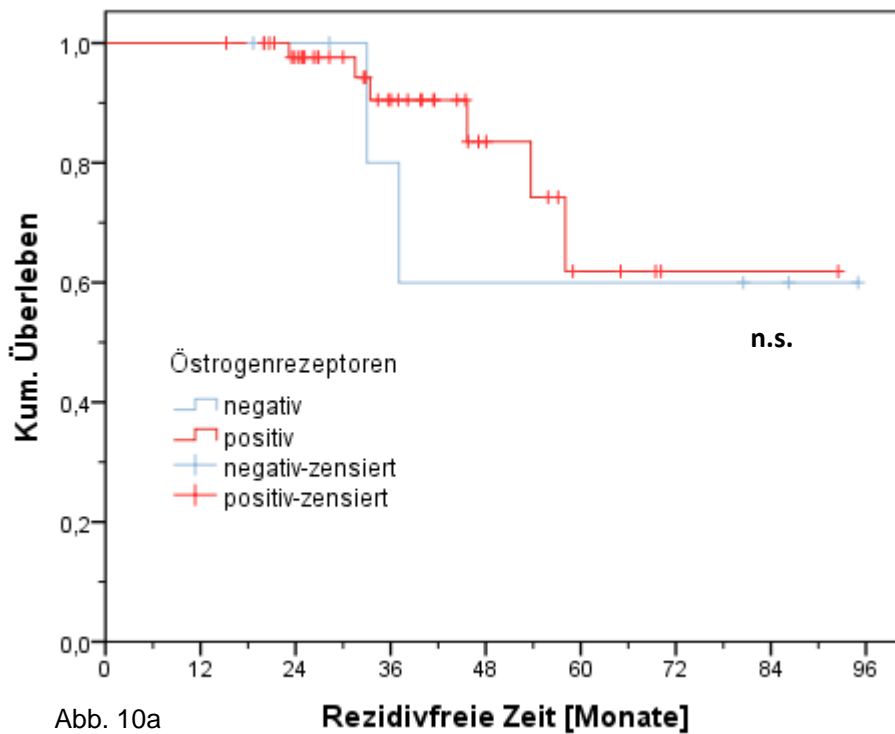


Abbildung 10a: Korrelation der Östrogenrezeptor Expression mit dem rezidivfreien Überleben
Abbildung 10b: Korrelation der Progesteronrezeptor Expression mit dem rezidivfreien Überleben.

Die Östrogenrezeptorexpression hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Rezidivhäufigkeit ($p=0,657$). Auch für die Progesteronrezeptorexpression fand sich

im Log-Rank-Test kein signifikanter Einfluss auf das rezidivfreie Überleben ($p=0,674$).

Wichtige tumorbiologische Faktoren und immunhistochemische Ergebnisse

Einfluss der Syndecan-1 Färbeintensität und des Anteils positiv gefärbter Zellen

Insgesamt wurden 30 low grade, 58 intermediate grade, 29 high grade DCIS und 8 high grade DCIS mit Mikroinvasion in die Untersuchung eingeschlossen. Exemplarisch wurden 2 CLIS ebenfalls mit untersucht. Die 4 unterschiedlichen Diagnosen wurden mit der Färbeintensität und dem Anteil positiv gefärbter Zellen korreliert. Die Färbeintensität korrelierte nicht mit dem Schweregrad der Diagnose. Dem entgegen, zeigten sich im Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede zwischen low grade und high grade DCIS ($p=0,043$), wie auch zwischen intermediate und high grade DCIS ($p=0,049$) in Bezug auf die Anzahl S-1 positiver Zellen. Die schwerere Diagnose korreliert jeweils mit einer höheren Zahl Syndecan-1 positiver Zellen.

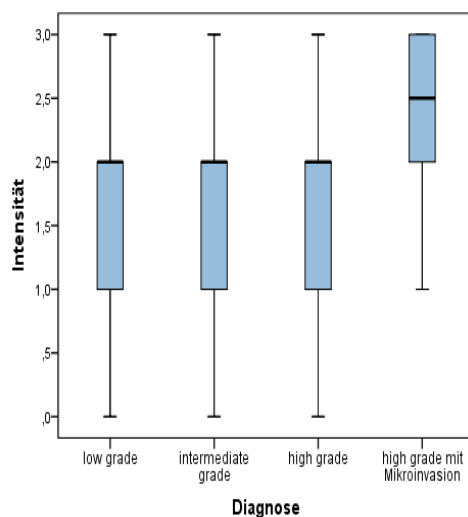


Abb. 11a

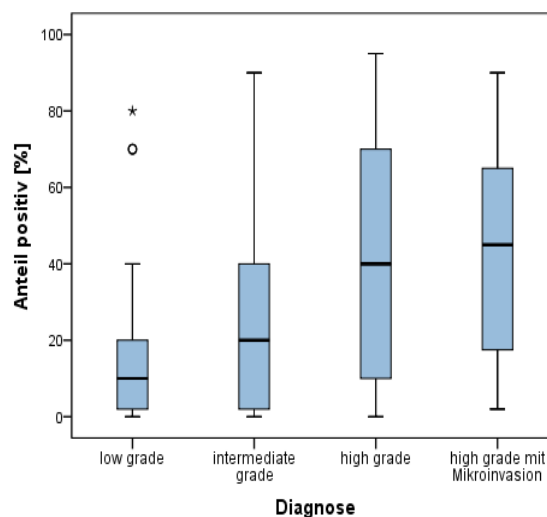


Abb. 11b

Abbildung 11a: Messung der Syndecan-1 Färbeintensität in den DCIS Subgruppen unterschiedlicher Kernmalignitäten (n.s.); 11b: Anteil Syndecan-1 positiver Zellen in den DCIS Subgruppen unterschiedlicher Kernmalignitäten, signifikante Korrelationen: low vs. high grade ($p=0,043$) und intermediate vs. high grade ($p=0,049$).

Das Alter der Patientinnen korrelierte weder mit der Zahl Syndecan-1 positiver Zellen noch mit der S-1 Färbeintensität.

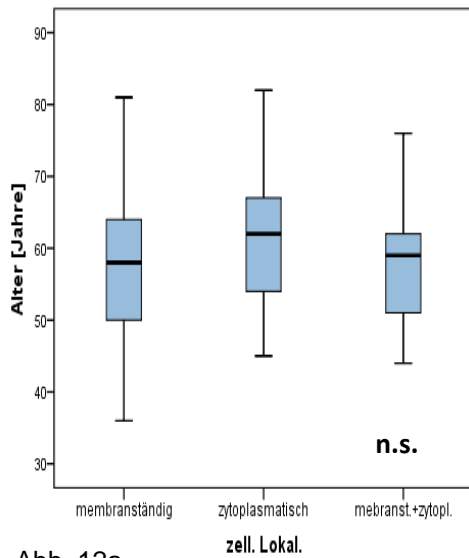


Abb. 12a

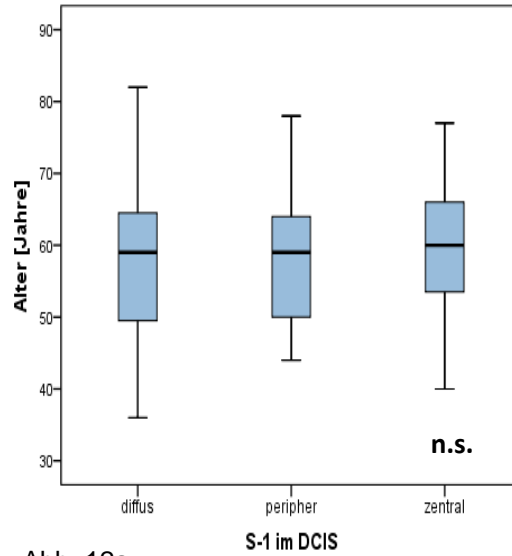


Abb. 12a

Abbildung 12a: Korrelation des Patientenalters mit der zellulären Syndecan-1 Lokalisation; 12b: Korrelation des Lebensalters mit der Syndecan-1 Lokalisation im DCIS.

Auch der Menopausenstatus hatte keinerlei statistisch signifikanten Einfluss auf die Färbeintensität und den Anteil Syndecan-1 positiver Zellen (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$).

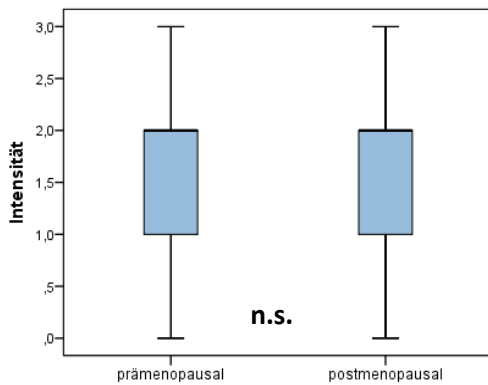


Abb. 13a

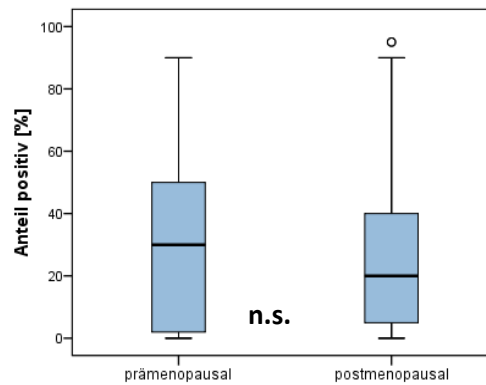


Abb. 13b

Abbildung 13a: Korrelation des Menopausenstatus mit der Syndecan-1 Färbeintensität; Abbildung 13b: Korrelation des Menopausenstatus mit dem Anteil Syndecan-1 positiver Zellen.

Zu 77 Frauen lagen Daten bezüglich einer früheren Hormonersatztherapie (HRT) vor. 33 Frau hatten eine HRT eingenommen, 44 hatte keine HRT erhalten. Eine

frühere HRT hatte keinen statistischen Einfluss auf die zelluläre Färbeintensität und den Anteil positiv gefärbter Zellen.

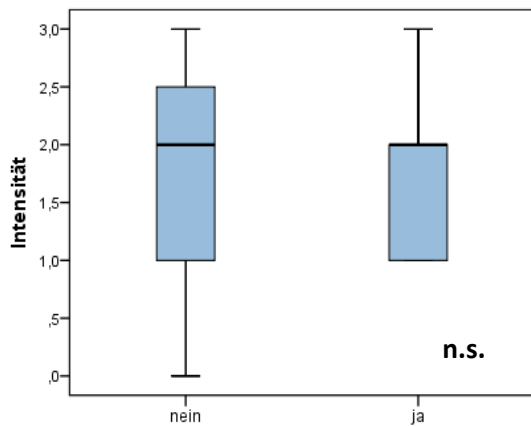


Abb. 14a

Hormonersatztherapie

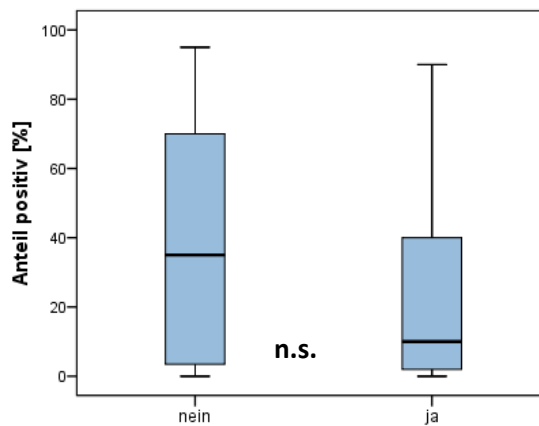


Abb. 14b

Hormonersatztherapie

Abbildung 14a: Korrelation einer früheren Hormonersatztherapie (HRT) mit der Syndecan-1 Färbeintensität; Abbildung 14b: Korrelation einer früheren HRT mit dem Anteil Syndecan-1 positiver Zellen.

Von 77 DCIS Patientinnen lagen Information zu einem früherem bzw. aktuellem Nikotinabusus vor. 51 haben nie geraucht, 19 haben früher geraucht und vor längerer Zeit aufgehört und 7 sind aktuelle Raucher.

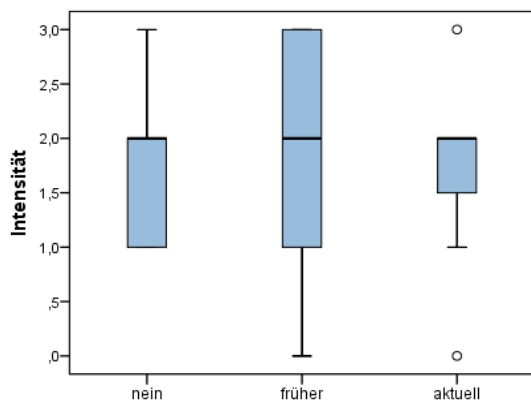


Abb. 15a

Nikotinkonsum

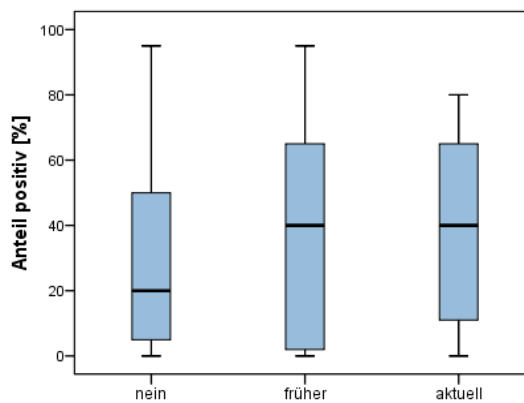


Abb. 15b

Nikotinkonsum

Abbildung 15a: Korrelation eines Nikotinabusus mit der Syndecan-1 Färbeintensität (n.s.); Abbildung 15b: Korrelation eines Nikotinabusus mit dem Anteil Syndecan-1 positiver Zellen (n.s.).

Im Kruskal-Wallis-Test konnte kein Unterschied in den unterschiedlichen Gruppen in Bezug auf die Färbeintensität ($p=0,88$) oder den Anteil S-1 positiver Zellen ($p>0,999$)

nachgewiesen werden. Ein Einfluss für den Nikotinkonsum konnte statistisch nicht nachgewiesen werden.

Von 94 DCIS Fällen zu denen Östrogen- und Progesteronrezeptorbestimmungen vorliegen sind 13 Östrogenrezeptor-negativ und 61 positiv.

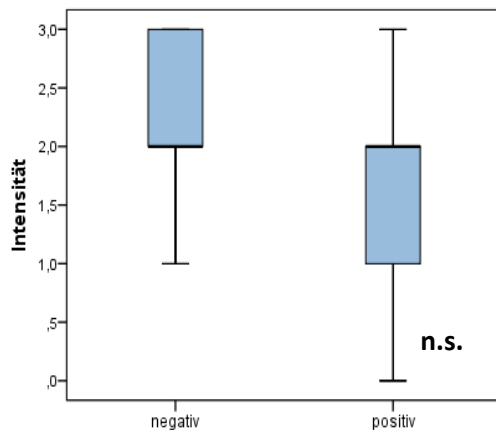


Abb. 16a Östrogenrezeptoren

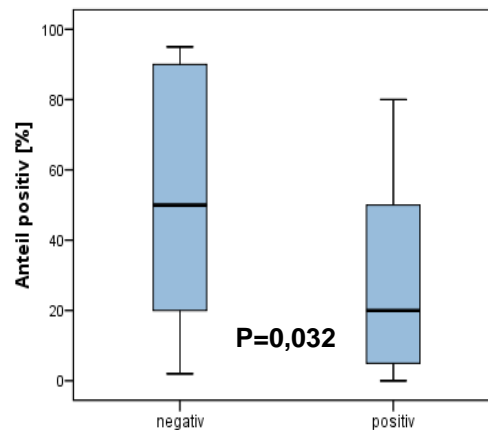


Abb. 16b Östrogenrezeptoren

Abbildung 16a: Korrelation des Östrogenrezeptorstatus (ER) mit der Syndecan-1 Färbeintensität; Abbildung 16b: Korrelation des ER Status mit dem Anteil Syndecan-1 positiver Zellen.

Im Mann-Whitney-U Test erbrachte die Berechnung keinen Einfluss der Östrogenrezeptorexpression auf die Färbeintensität von Syndecan-1 ($p=0,247$). Die Analyse ergab jedoch, daß die Östrogenrezeptorexpression negativ mit dem Anteil S-1 positiver Zellen korreliert ist ($p=0,032$). Das bedeutet, daß bei einem positiven Östrogenrezeptorstatus signifikant seltener Syndecan-1 positive Zellen im DCIS vorhanden sind.

Für 75 DCIS Fälle liegen Angaben zum Progesterorezeptorstatus (PR) vor. Es sind 33 PR-negativ und 42 PR-positiv. Im Mann-Whitney-U Test zeigen sich statistisch signifikante Unterschiede sowohl hinsichtlich der Intensität ($p=0,010$), als auch des Anteils Syndecan-1 positiver Zellen ($p=0,004$). Die S-1 Färbeintensität war signifikant stärker bei den PR-negativen DCIS Fällen. Der Anteil S-1 positiver Zellen war ebenfalls signifikant größer in der PR-negativen Population.

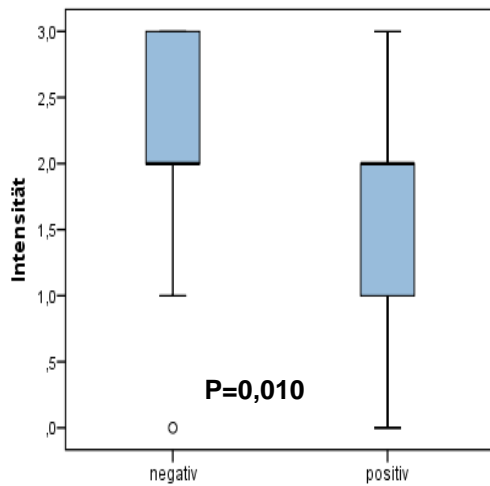


Abb. 17a Progesteronrezeptoren

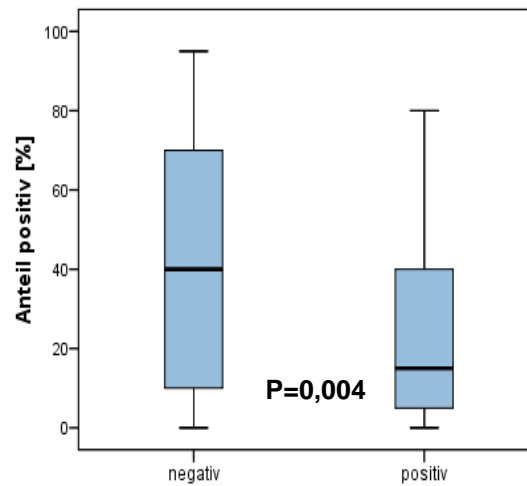


Abb. 17b Progesteronrezeptoren

Abbildung 17a: Korrelation des Progesteronrezeptorstatus (PR) mit der Syndecan-1 Färbeintensität; Abbildung 17b: Korrelation des PR mit dem Anteil Syndecan-1 positiver Zellen.

In der Cox-Regressionsanalyse ergab sich kein signifikanter Einfluss der Syndecan-1 Färbeintensität im DCIS auf das rezidivfreie Überleben ($p=0,629$). Auch der Anteil auf Syndecan-1 positiv gefärbter Zellen im DCIS hatte keinen Einfluss auf die Rezidivfreiheit ($p=0,169$).

Die zelluläre Syndecan-1 Lokalisation

Insgesamt wurden für diese Analyse 118 DCIS immunhistochemisch analysiert. Von den 28 low grade DCIS zeigten 25 eine membranständige, 1 eine zytoplasmatische und 2 eine diffuse (membranständige und zytoplasmatische) Syndecan-1 Färbung. Von den 54 intermediate grade DCIS zeigen 43 eine membranständige, 4 eine zytoplasmatische und 7 eine diffuse S-1 Färbung. Die 28 high grade DCIS Fälle waren in 16 Fälle mit S-1 membranständig, mit 6 Fällen zytoplasmatisch und mit 6 Fällen einer diffusen Syndecan-1 Expression. Bei den 8 Fällen eines high grade DCIS mit Mikroinvasion zeigte sich 3 x eine membranständige, 2 x eine zytoplasmatische und 3 x eine diffuse S-1 Färbung. Mittels Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend konnte eine signifikante Assoziation zwischen der Diagnose und der Färbelokalisation des Syndecan-1 gezeigt werden ($p=0,001$).

Ein signifikanter Einfluss des Menopausenstatus auf die zelluläre Syndecan-1 Expression konnte nicht nachgewiesen werden, (Exakter Fisher-Test, $p=0,332$).

Auch eine frühere Hormonersatztherapie hatte keinen signifikanten Einfluss auf die zelluläre Syndecan-1 Färbung. Ein Einfluss eines Nikotinabusus (früher oder aktuell) auf die zelluläre Syndecan-1 Lokalisation konnte nicht nachgewiesen werden (getestet mit einem exakten Fisher Test, $p=0,582$).

Auch durch den Einfluss unterschiedlicher Östrogenrezeptorexpressionen (ER) ergeben sich Unterschiede in der zellulären Syndecan-1 Verteilung. Von den 13 ER-negativen DCIS zeigen 3 eine membranständige, 5 eine zytoplasmatische und 5 eine diffuse (membranständige und zytoplasmatische) zelluläre Färbung. Die 58 ER-positiven DCIS teilen sich auf in 49 mit einer membranständigen, 3 mit einer zytoplasmatischen und 6 mit einer diffusen zellulären Syndecan-1- Verteilung. Die Unterschiede im Färbemuster sind im exakten Fisher-Test statistisch signifikant ($p < 0,001$). Die ER-positiven DCIS zeigen signifikant häufiger eine membranständige Syndecan-1 Färbung. Von den 32 PR-negativen DCIS zeigten 14 eine membranständige, 8 eine zytoplasmatische und 10 eine diffuse zelluläre Syndecan-1 Verteilung. Deutlich hiervon divergierte die Syndecan-1 Lokalisation in den PR-positiven DCIS Fällen. 39 Fälle weisen eine membranständige und kein Fall eine zytoplasmatische Syndecan-1 Verteilung auf. 1 DCIS zeigt keine Syndecan-1 Färbung. Der Einfluss des Progesteronrezeptor-Status auf die zelluläre S-1 Färbung ist statistisch im exakten Fisher Test hochsignifikant ($p < 0,001$). Die PR-positiven Fälle zeigen fast ausschließlich eine membranöse Syndecan-1 Färbung. Die PR-negativen Fällen zeigen in über der Hälfte der Fälle keine membrangebundene Färbung von Syndecan-1, sondern in diesen Fällen einen diffusen oder zytoplasmatischen Nachweis.

Die Syndecan-1 Lokalisation im DCIS

Auch die Syndecan-1 Lokalisation im Gewebe divergiert in Abhängigkeit vom Grading teilweise deutlich. In 28 low grade Fällen (von 117 Fällen insgesamt) zeigt sich die Syndecan-1 Expression in 11 Fällen diffus im Gewebe, in 11 Fällen mit einer peripheren und 6 mal mit einer zentral im DCIS gelegenen S-1 Expression. Bei 54 intermediate grade DCIS zeigen 26 eine diffuse, 19 eine periphere und 9 eine zentrale Expression von S-1. Die 28 high grade DCIS teilen sich auf in 22 Fälle mit einer diffusen Syndecan-1 Expression, 2 Fälle mit peripherem und 4 mit einem

zentralen Muster. Bei den 7 Fällen high grade DCIS mit Mikroinvasion zeigen in 6 Fällen ein diffuses und einmal ein peripheres Muster.

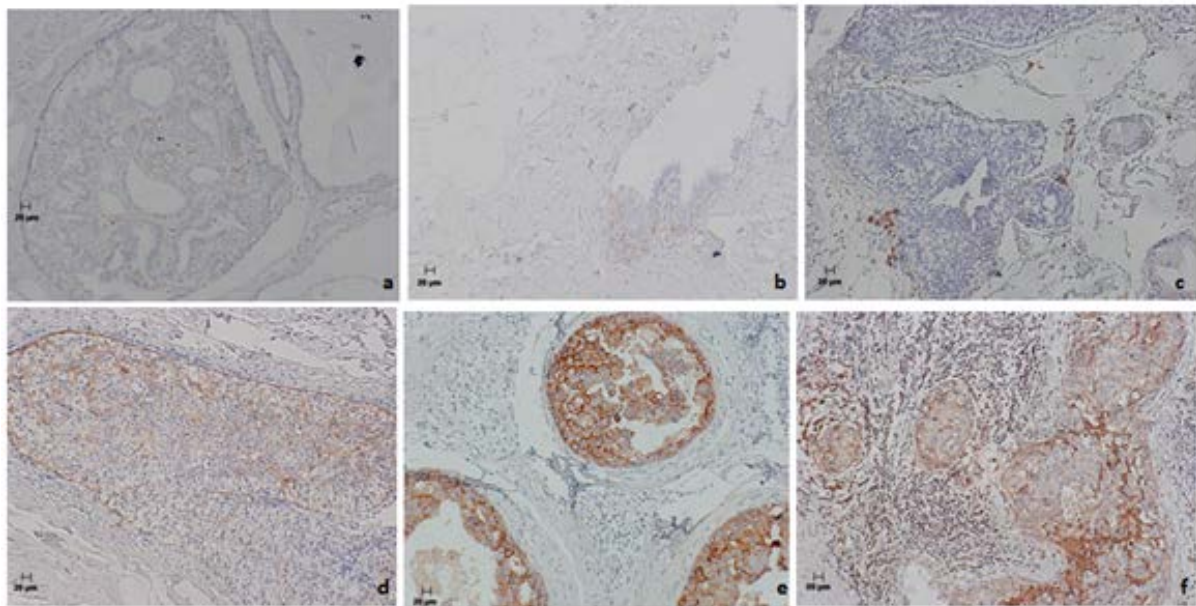


Abbildung 18: Beispiele unterschiedlicher immunohistochemischer Syndecan-1 Färbemuster in DCIS (x 100 Vergrößerung). a) low grade DCIS mit geringer membranöser Syndecan-1 Zellfärbung in <5% der Tumorzellen und einer diffusen Gewebeverteilung; b) low grade DCIS mit geringer membranöser Zellfärbung in <10% der Tumorzellen und einer zentralen Gewebeverteilung; c) intermediate grade DCIS mit starker membranöser Zellfärbung in 80% der Tumorzellen und einer diffusen Gewebeverteilung; d) intermediate grade DCIS mit geringer membranöser Zellfärbung in <5% der Tumorzellen und einer peripheren Gewebeverteilung; e) high grade DCIS mit einer starken zytoplasmatischen Färbung von 90% der Tumorzellen und einer diffusen Gewebeexpression; f) high grade DCIS mit Mikroinvasion mit einer starken membranösen und zytoplasmatischen Zellfärbung in 70% der Tumorzellen und einer diffusen Gewebeverteilung.

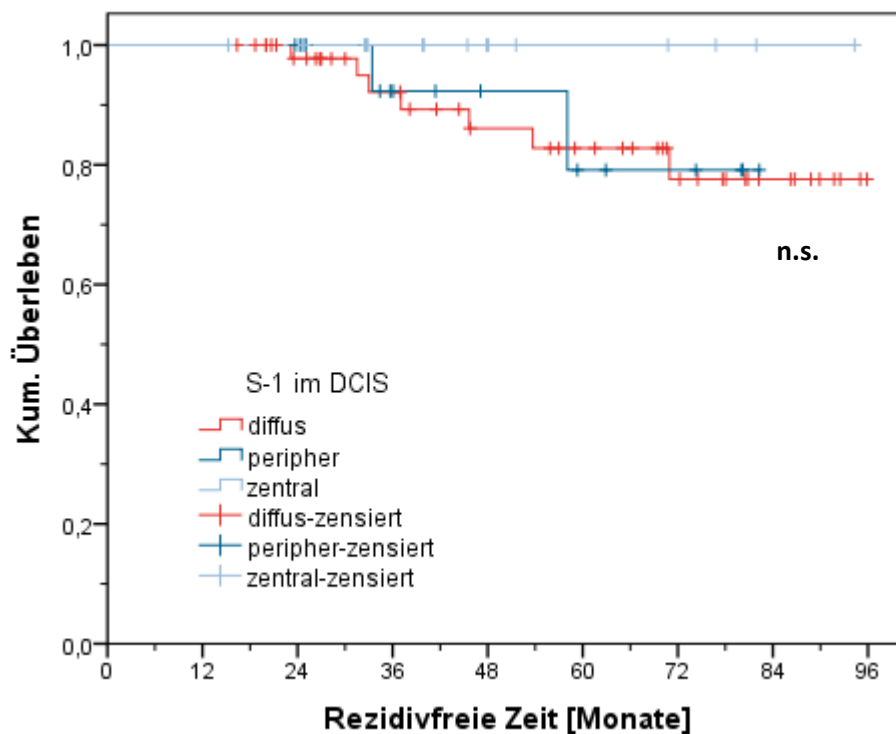
Im Chi-Quadrat-Test auf linearem Trend zeigt sich eine signifikante Abhängigkeit zwischen den histologischen Diagnosen (Gradings) und der Lokalisation der Syndecan-1 Expression im DCIS Gewebeverband ($p=0,005$). Ein signifikanter Einfluss der Östrogenrezeptorexpression auf die Syndecan-1 Verteilung im Gewebe (zentral, peripher oder diffus lokalisiert) konnte nicht nachgewiesen werden (Exakter Fisher-Test, $p=0,250$). Hiervon unterscheidet sich der Einfluss der Progesteronrezeptorexpression deutlich. Von 71 DCIS Fällen in dieser Auswertung, sind 32 PR-negativ und 39 PR-positiv. Von den PR-negativen sind 24 mit einer

diffusen, 5 mit einer peripheren und 3 mit einer zentralen Syndecan- 1 Expression. Bei den 39 PR-positiven DCIS zeigen sich 16 mit diffuser, 14 mit peripherer und 9 mit zentraler Syndecan-1 Expression. Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigt daß zwischen der Progesteronrezeptorexpression und dem Expressionsmuster von Syndecan-1 im Zellverband eine statistisch signifikante Assoziation besteht ($p=0,016$).

Der Menopausenstatus zeigt im durchgeführten Chi-Quadrat-Test keinen Einfluss auf die Lokalisation des Syndecan-1 im DCIS Gewebsverband ($p=0,332$). Auch eine frühere Hormonersatztherapie hatte im Chi Quadrat nach Pearson keine Korrelation zur Lokalisation der Syndecan-1 Expression im DCIS Gewebe gezeigt ($p=0,067$). Auch ein möglicher Nikotinabusus (früher oder aktuell) war im exakten Fisher-Test ohne Korrelation zur Syndecan-1 Lokalisation im DCIS Gewebe ($p=0,691$).

Bei 50 DCIS Fällen mit vollständigem Follow-Up zeigte sich eine diffuse Färbung für Syndecan-1 im Gewebe. 18 Fälle wiesen eine periphere Färbung und 14 Fälle eine zentrale Färbung für Syndecan-1 auf. Kein Fall mit zentraler Färbung rezidierte. 7 Fälle mit diffusem Färbemuster und 2 mit peripherem Färbemuster rezidierten.

Die Analyse im Log-Rank-Test ergab für die Syndecan-1 Lokalisation im DCIS jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben ($p=0,415$).



Diskussion

Insgesamt überlebten 88% der Patientinnen 96 Monate rezidivfrei. Damit liegt das mittlere rezidivfreie Überleben bei 86 Monaten [Abb. 2]. Die mediane rezidivfreie Zeit lässt sich statistisch nicht angeben, da der Zeitpunkt, zu dem die Hälfte der Patientinnen ein Rezidiv bekommen hat, nicht erreicht wird. In der low grade DCIS Gruppe, sowie bei den high grade DCIS mit Mikroinvasion trat während des Follow-Up kein Rezidiv auf. Die mediane rezidivfreie Überlebenszeit lag in der intermediate grade DCIS Gruppe bei 85 Monaten und in der high grade DCIS Gruppe bei 77 Monaten. Damit ergab sich ein Trend für ein längeres rezidivfreies Überleben in der intermediate grade Gruppe. Im Log-Rank-Test ergab sich allerdings kein signifikanter Nachweis eines Unterschiedes für das rezidivfreie Überleben zwischen diesen beiden Gruppen [Abb. 3]. Insgesamt ist die Fallzahl in den Subgruppen relativ klein, so dass statistische Auswertungen eine eingeschränkte Aussage haben müssen. Außerdem werden Fälle gemeinsam ausgewertet, die über einen relativ langen Zeitraum gesammelt worden sind. Im Laufe dieser Zeit hat sich z.T. das therapeutische Vorgehen nach DCIS erheblich verändert. Dadurch sind Patientinnen auch innerhalb biologisch definierter gleicher Subgruppen teilweise unterschiedlich behandelt worden. Allein dieser Umstand kann dazu geführt haben, dass sich die biologischen Unterschiede nicht statistisch signifikant im rezidivfreien Überleben niedergeschlagen haben.

Allgemeine epidemiologische Einflussfaktoren auf die Rezidivfreiheit

Das Alter der Patientinnen bei Diagnosestellung hatte in der durchgeführten Cox-Regressions-Analyse keinen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben und lag bei den an dieser Studie teilnehmenden Patientinnen im Durchschnitt bei 58 Jahren (36-82 Jahre) (Median 59 Jahre). Diese Altersverteilung entspricht in etwa der großer DCIS Kohortenstudien aus den USA [19,20]. Auch für den Menopausenstatus ergab sich kein signifikanter Einfluss auf das rezidivfreie Überleben. Allerdings zeigte sich ein deutlicher Trend für ein verbessertes rezidivfreies Überleben in der Postmenopause [Abb. 3]. Vermutlich ergab sich durch die kleine Fallzahl prämenopausaler Patientinnen die in diese Analyse eingingen keine statistische Signifikanz.

Für eine frühere Hormonersatztherapie konnten in der vorliegenden Untersuchung keine ungünstigen Einflüsse auf das rezidivfreie Überleben nach DCIS nachgewiesen werden [Abb. 4]. Dieses lässt sich durch Beobachtungen anderer Gruppen erklären. Hier hatte das Absetzen der HRT bei Östrogenrezeptor-positivem DCIS zu einer raschen und signifikanten Reduktion der Zellproliferation geführt [21]. Viele Ärzte und Patientinnen setzen eine HRT kurzfristig im Zusammenhang mit einer DCIS Diagnose ab. In der großen US-amerikanischen Wisconsin In Situ Cohort (WISC) verblieben lediglich ca. 3% der DCIS Patientinnen unter HRT. Unter den risikohaften Lebensstilfaktoren (Übergewicht, Rauchen usw.) ist das Absetzen der HRT der Faktor, der von den DCIS Patientinnen in der WISC Studie am ehesten geändert wurde [22,23].

Seit ca. 20 Jahren werden DCIS mammographisch detektiert, dadurch ging jedoch nicht wie erhofft, die Inzidenz der invasiven Karzinome zurück. Erst der vor einigen Jahren stattgefundenen Rückgang der Hormonersatztherapien reduziert die Inzidenz invasiver Mammakarzinome [24,25].

In einer weiteren epidemiologischen Analyse wurde der Einfluss eines früheren und aktuellen Nikotinkonsums auf die Rezidivfreiheit nach DCIS untersucht. Hierbei zeigte ein Nikotinkonsum eine signifikante Korrelation mit einem schlechteren rezidivfreien Überleben [Abb. 5]. Andere Gruppen berichten, daß bis zu 35% der rauchenden Frauen nach der DCIS Diagnose das Rauchen aufgeben [22,23,25]. Die rauchenden Frauen sollten darüber aufgeklärt werden, daß durch das fortwährende Rauchen nach einem DCIS das Rezidivrisiko steigen könnte. Allerdings weichen die vorliegenden Daten von denen größerer epidemiologischer Studien ab, die allerdings zum invasiven Mammakarzinom durchgeführt wurden. So konnte beispielsweise in einer großen Observationsstudie (Nurses Health Study) nach einem invasiven Mammakarzinom keine erhöhte brustkrebsbedingte Mortalität durch einen fortgesetzten Nikotinabusus nachgewiesen werden [22]. In der großen Kohortenstudie der Women's Health Initiative (WHI) zeigt sich kein erhöhtes Risiko für Raucherinnen an einem DCIS zu erkranken. Das Risiko in dieser Gruppe war im Gegenteil eher reduziert (n.s.). Wenn Raucherinnen erkrankten, so gab es keine Assoziation für eine höhere Kernmalignität [24]. Daten für das Rezidivrisiko nach DCIS bei Raucherinnen hat diese Studie allerdings nicht hervorgebracht. In der Literatur gibt es insgesamt nur sehr eingeschränkt Daten zum Einfluss des

Rauchens auf die Prognose nach einem DCIS. Da sich die DCIS Biologie doch von der der invasiven Karzinome unterscheidet, ist eine direkte Übertragung der Daten des Rauchens nach invasiven Karzinomen auf die Situation beim DCIS nicht möglich.

Einfluss verschiedener Therapiemodalitäten

Rezidivfreiheit in Abhängigkeit von einer endokrinen Therapie

Keine der endokrinen Therapien zeigte einen Vorteil gegenüber den anderen Substanzen [Abb. 6]. Insgesamt brachte auch der prinzipielle Einsatz einer endokrinen Therapie im Vergleich zu keiner medikamentösen Therapie im Hinblick auf das rezidivfreie Überleben keinen Vorteil [Abb. 7]. Mittlerweile wird die endokrine Therapie nach DCIS und positivem Hormonrezeptorstatus nicht mehr mit Nachdruck empfohlen. Allerdings stehen noch Daten größerer randomisierter Studien zu dieser Fragestellung aus [26].

Eine postoperative Strahlentherapie nach brusterhaltender Operation erbrachte im durchgeführten Log-Rank-Test keinen Vorteil für das rezidivfreie Überleben [Abb. 8]. Allerdings waren die in dieser Analyse ausgewerteten Fallzahlen sehr klein. So hatten im vorliegenden Patientenkollektiv über >50% keine postoperative Radiatio erhalten. Bestrahlt worden waren 4/17 Patientinnen aus der low grade, 18/33 aus der intermediate grade, 11/13 aus der high grade Gruppe und 2/2 aus der high grade (mit Mikroinvasion) Gruppe. Die fehlenden Rezidive in der low grade DCIS Gruppe belegen das niedrige Malignitätspotential dieser Läsionen. Da ein Teil der Hochrisikoläsionen bereits ablativ behandelt worden war, erscheint es auch nicht verwunderlich zu sein, dass in dieser Gruppe keine Rezidive auftraten. Zudem traten in diesen Gruppen zahlenmäßig nur wenig DCIS Fälle auf. Die meisten Fälle verteilten sich bei der Erstdiagnose auf die intermediate und high grade Fälle. Heutzutage ist eine Radiatio jedoch, unabhängig vom Grad der Kernmalignität, Teil einer brusterhaltenden Behandlungsstrategie [26].

Prinzipiell wäre eine Aussage zum Nutzen einer Strahlentherapie für die einzelnen DCIS Subgruppen (aufgeteilt nach Kernmalignität) interessant. Insbesondere für das low grade DCIS erscheint die Datenlage hinsichtlich des Nutzens einer Radiatio dünn

zu sein. Der detaillierte Nutzen einer Radiatio für alle DCIS Fälle (einschließlich der low grade Fälle) wird jedoch ausschließlich durch große prospektive Multicenterstudien zu überprüfen sein.

Wichtige tumorbiologische Faktoren und immunhistochemische Ergebnisse

Die Expression von Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor zeigte im untersuchten Kollektiv im Log-Rank Test keine Korrelation mit dem rezidivfreien Überleben nach DCIS Diagnose. Allerdings war nur von der Minderheit des Gesamtkollektivs der Rezeptorstatus bekannt, so dass die kleinen Fallzahlen die Aussage der Statistik beeinflusst haben können.

Einfluss der Syndecan-1 Färbeintensität und des Anteils positiv gefärbter Zellen

In Subgruppenanalysen wurden low grade, intermediate grade, high grade DCIS und high grade DCIS mit Mikroinvasion in die Untersuchung eingeschlossen. Exemplarisch wurden 2 CLIS ebenfalls mit untersucht. Die Syndecan-1 Färbeintensität korrelierte nicht mit dem Schweregrad der Diagnose [Abb 10a]. Allerdings zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen low grade und high grade DCIS, wie auch zwischen intermediate und high grade DCIS in Bezug auf die Anzahl Syndecan-1 positiver Zellen. Die schwerere Diagnose korreliert jeweils mit einer höheren Zahl Syndecan-1 positiver Zellen [Abb 10b].

Es ist bereits früher von anderen Gruppen berichtet worden, dass in Proben von invasiven Mammakarzinomen membrangebundenes Syndecan-1 im Vergleich zu benignem Mammagewebe deutlich hochreguliert ist [27,28,29] und dadurch Wachstumsfaktoren, wie z.B. FGF-2 verstärkt im Tumorbereich gebunden werden können [15,30,39]. Bei invasiven Mammakarzinomen korreliert eine starke Expression von Syndecan-1 mit einem aggressiven Tumortyp, einer verstärkten Tumorangiogenese und mit einer schlechten Prognose [17, 19, 31]. Die verstärkte Expression korrelierte in Untersuchungen deutlich mit einem schlechteren Grading der Mammakarzinome [32]. Wird die Syndecan-1 Expression in primären Karzinomen zu der in Rezidiven verglichen, fällt eine deutliche Hochregulierung der Expression auf [32]. Häufig zeigt sich eine verstärkte intrazelluläre, teilweise auch perinukleäre intravesikuläre, Konzentration von Syndecan-1 in Tumorzellen von

aggressiven Karzinomen. Gut differenzierte Tumoren dagegen weisen häufiger eine Syndecan-1 Expression auf der Zelloberfläche, ähnlich wie es bei benignem Epithel der Fall ist [32]. Zusätzlich zeigen die Syndecan-1 positiven Karzinome eine reduzierte Chemosensitivität [31,33]. Offensichtlich vermag eine Chemotherapie jedoch auch eine Downregulation der Syndecan-1 Expression zu verursachen [33]. Allerdings ist nicht bei jedem Tumor die Syndecan-1 Expression erhöht, sondern kann auch deutliche Variabilitäten zeigen. Bei einem Teil der Tumoren wird im Verlauf der Tumorprogression die Syndecan-1 Expression sogar herunter reguliert [32]. Zusätzlich gibt es *in vitro* Hinweise auf entgegengesetzte Funktionen der löslichen Form des Syndecan-1, die eher hemmend auf proliferative Vorgänge, aber fördernd auf die Zellinvasion wirkte [30]. Ein offensichtliches Ergebnis der vorliegenden Untersuchung ist es, dass auch beim DCIS eine höhere Zahl Syndecan-1 positiver Tumorzellen mit einer höheren Kernmalignität korreliert ist. Es kann daher vermutet werden, dass Syndecan-1 einen mittelbaren oder unmittelbaren Einfluss auf das Wachstumsmuster des DCIS und auf die Tumorprogression hat.

In dieser Untersuchung korrelierte das Alter der Patientinnen, ihr Menopausenstatus, wie auch eine frühere Hormonersatztherapie oder ein Nikotinabusus weder mit der Zahl Syndecan-1 positiver Zellen noch mit der Syndecan-1 Färbeintensität [Abb. 11a,b und 12a,b und 13a,b und 14a,b]. Andere Autoren beschreiben, daß bei Frauen in der Postmenopause mit Mammakarzinom oder bei Mammographie-dichtem Brustdrüsengewebe die Syndecan-1 Expression vom Epithel in das Stroma verlagert ist [34]. Dabei sei das epitheliale Syndecan-1 Muster mit einem ER negativen Phänotyp vergesellschaftet und die stromale Syndecan-1 Expression mit einem ER positiven Tumortyp [35]. Im Rattenmodell sanken die Gesamtlevel der HSPG nach einer Oophorektomie und stiegen nach Östradiolsubstitution wieder an [36]. Ebenso führte eine Gabe von Gestagenen (Progesteron) allein und auch in Kombination mit Östradiol zu einer verstärkten Expression von Heparansulfatproteoglykanen im Brustgewebe [36]. Weiter erstaunen die Ergebnisse vor dem Hintergrund früherer Arbeiten, die zeigten, daß ein direkter Hormoneinfluss, z.B. im Verlauf des Menstruationszyklus, die Syndecan-1 Expression in gesundem Brustgewebe reguliert hat. So wurde gezeigt, daß Syndecan-1 während der Lutealphase signifikant (fünffach) schwächer exprimiert wird, als in der Follikelphase [37].

Die vorliegende Untersuchung zeigte keinen Einfluss der Östrogenrezeptorexpression auf die Färbeintensität von Syndecan-1. Die Analyse ergab jedoch, daß die Östrogenrezeptorexpression negativ mit dem Anteil Syndecan-1 positiver Zellen korreliert ist. Das bedeutet, daß bei einem positiven Östrogenrezeptorstatus signifikant seltener Syndecan-1 positive Zellen im DCIS vorhanden sind [Abb. 15a,b]. Die S-1 Färbeintensität war signifikant stärker bei den Progesteronrezeptor-negativen DCIS Fällen. Der Anteil S-1 positiver Zellen war ebenfalls signifikant größer in der PR-negativen Population [Abb. 16a,b].

Insgesamt ergab sich kein signifikanter Einfluss der Syndecan-1 Färbeintensität im DCIS auf das rezidivfreie Überleben. Auch der Anteil Syndecan-1 positiv gefärbter Zellen im DCIS hatte keinen Einfluss auf die Rezidivfreiheit.

Die zelluläre Syndecan-1 Lokalisation

Von den low grade DCIS zeigen nahezu alle eine membranständige Syndecan-1 Färbung. Von den intermediate grade DCIS zeigt die Mehrzahl eine membranständige und eine Minderheit eine zytoplasmatische oder eine diffuse Syndecan-1 Färbung. Die high grade DCIS Fälle waren etwas häufiger mit membranständiger, als mit zytoplasmatischer und diffuser Syndecan-1 Expression nachweisbar. Die Fälle eines high grade DCIS mit Mikroinvasion zeigten sich ausgewogen mit membranständiger, zytoplasmatischer und diffuser Syndecan-1 Färbung. Die Unterschiede zwischen den DCIS mit den unterschiedlichen Kernmalignitäten sind deutlich. Es besteht eine signifikante Assoziation zwischen der Diagnose und der Färbelokalisation des Syndecan-1.

Neben dem nukleären Grading ist auch die Östrogenrezeptorexpression (ER) mit einem spezifischen zellulären Muster der Syndecan-1 Expression korreliert. So zeigen ER-negative DCIS eher eine Syndecan-1 Expression auch im Zytoplasma, während die ER-positiven DCIS überwiegend einen membranständigen Syndecan-1 Nachweis aufweisen. Die ER-positiven DCIS zeigen signifikant häufiger eine membranständige Syndecan-1 Färbung. Von den Progesteronrezeptor-negativen DCIS zeigt sich ein gemischtes Syndecan-1 Muster (relative Gleichverteilung der Fälle mit membranständiger, zytoplasmatischer und diffuser zellulärer Syndecan-1 Verteilung). Deutlich hiervon divergiert die Syndecan-1 Lokalisation in den PR-positiven DCIS Fällen. Diese weisen ausnahmslos eine membranständige Syndecan-1 Verteilung auf.

Die signifikante Häufung einer verstärkten membranständigen Syndecan-1 Expression in low grade DCIS und Hormonrezeptor-positiven und signifikante Häufung der zytoplasmatischen Lokalisation bei high grade, sowie Hormonrezeptor-negativen DCIS Fällen, legt die Vermutung nahe, dass die membranöse Expression von Syndecan-1 einen eher antiproliferativen Effekt vermitteln könnte, während die zytoplasmatische Expression mit einer eindeutig aggressiveren DCIS Biologie einhergeht.

Weder der Menopausenstatus, noch eine frühere Hormonersatztherapie oder ein Nikotinabusus hatten einen Einfluss auf die zelluläre Syndecan-1 Expression. Auch eine frühere Hormonersatztherapie hatte keinen signifikanten Einfluss auf die zelluläre Syndecan-1 Färbung. Ein Einfluss eines Nikotinabusus (früher oder aktuell) auf die zelluläre Syndecan-1 Lokalisation konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Offensichtlich sind die untersuchten Lifestylefaktoren keine Einflussfaktoren der Syndecan-1 Expression. Von daher kann vermutet werden, dass über ihre Optimierung oder Modifikation kein Einfluss auf eine Syndecan-1 bedingte Progression hin zu DCIS mit höherer Kernmalignität oder gar zu einem invasiven Wachstum genommen werden kann.

Die Syndecan-1 Lokalisation im DCIS

Ein signifikanter Einfluss der Östrogenrezeptorexpression auf die Syndecan-1 Verteilung im Gewebe (zentral, peripher oder diffus lokalisiert) konnte nicht nachgewiesen werden. Bei invasiven Mammakarzinomen ist eine enge Assoziation zwischen einer Syndecan-1 Expression und dem Fehlen des Östrogenrezeptors, wie auch einer hohen Proliferationsrate beschrieben worden [38]. Dieses lässt sich offensichtlich auch auf die Situation beim DCIS übertragen, da hier abhängig vom Hormonrezeptor-Status signifikant unterschiedliche Raten Syndecan-1 positiver Zellen nachgewiesen werden können [Abb. 15a,b und 16a,b]. Bei den ER-negativen Fällen finden sich überproportional häufig (ca. 50%) Syndecan-1 positive Zellen, wohingegen bei den ER-positiven im Median nur ca. 20% der Zellen eine Syndecan-1 Positivität aufweisen.

Dieses verhält sich analog ebenso bei der Progesteronrezeptorexpression. Von den PR-negativen sind die überwiegende Zahl mit einer diffusen Syndecan-1 Expression. Von den PR-positiven DCIS zeigen sich die Expressionsmuster sowohl diffus, als auch peripherer und mit zentraler Syndecan-1 Expression. Allerdings

divergierte die Syndecan-1 Lokalisation im Gewebe in Abhängigkeit vom Grading teilweise deutlich. In low grade Fällen zeigte sich die Syndecan-1 Expression in überwiegend nicht diffus, sondern auch peripher oder zentral im DCIS. Bei intermediate grade DCIS Fällen zeigt sich etwas über der Hälfte eine diffuse Expression. Die high grade DCIS zeigen zum größten Teil eine diffuse Syndecan-1 Expression. Bei den Fällen mit high grade DCIS und Mikroinvasion zeigt sich fast ausschließlich ein diffuses Muster. Die Abhängigkeit zwischen dem nukleären Grading und der Lokalisation der Syndecan-1 Expression im DCIS Gewebeverband war statistisch hochsignifikant [Abb. 17]. Auch wenn kein Fall mit einer zentralen Syndecan-1 Expression ein späteres Rezidiv entwickelte, ergab sich insgesamt für die Syndecan-1 Lokalisation trotz der auffälligen Expressionsmuster in den einzelnen Subgruppen kein statistisch signifikanter Einfluss auf das rezidivfreie Überleben. Statistisch lässt sich retrospektiv nicht ermitteln, ob die geringe Fallzahl der Subgruppen hier keine Korrelation erbracht hat oder ob ein vielleicht zu geringer Einfluss der Lokalisation der Syndecan-1 Expression im DCIS Gewebe dazu geführt hat, dass sich die Unterscheide der Syndecan-1 Lokalisation in den Subgruppen unterschiedlicher Kernmalignität sich nicht im rezidivfreien Überleben niedergeschlagen hat.

Diese Beobachtungen decken sich mit denen anderer Gruppen, die zum invasiven Mammakarzinom gearbeitet haben. Bei diesem sind nämlich in Abhängigkeit vom Wachstumsmuster ebenfalls unterschiedliche Muster der Syndecan-1 Expression aufgefallen. Zusätzlich ist bekannt, dass die Produktion von Syndecan-1 in reaktiven stromalen Fibroblasten eine optimale Mikroumgebung für ein beschleunigtes Zellwachstum und eine gesteigerte Angiogenese bietet [17, 29].

Lebensumstände bzw. Lifestylefaktoren wie der Menopausenstatus, eine frühere Hormonersatztherapie und ein Nikotinabusus hatten keinerlei Einfluss auf die Lokalisation der Syndecan-1 Expression im DCIS.

Somit sind als wesentliche Aussagen der Arbeit eine signifikante Korrelation der DCIS Kernmalignität mit der Zahl Syndecan-1 positiver Zellen und ein Trend für ein längeres rezidivfreie Überleben bei niedriger Kernmalignität des DCIS zu nennen. Zwischen DCIS unterschiedlicher Kernmalignitäten war die Färbelokalisation des Syndecan-1 im DCIS signifikant unterschiedlich. Zusätzlich ist die Hormonrezeptorexpression invers mit dem Anteil Syndecan-1 positiver Zellen

korreliert, so dass bei einem positiven Hormonrezeptorstatus signifikant seltener Syndecan-1 positive Zellen im DCIS vorhanden sind. Die Syndecan-1 Färbeintensität oder der Anteil Syndecan-1 positiver Zellen im DCIS hatte allerdings keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben.

Die teilweise signifikant divergenten Syndecan-1 Färbemuster in den DCIS unterschiedlicher Kernmalignitäten deuten darauf hin, dass Syndecan-1 einen direkten Einfluss auf das Wachstumsmuster des DCIS und auf die Tumorprogression haben könnte.

Zusammenfassung

Einleitung: Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren sind bei invasiven Mammakarzinomen z.T. an der Tumorentstehung und -progression beteiligt. Um ihre Wirkung zu entfalten, benötigen einige Wachstumsfaktoren bei der Rezeptor-Bindung und Signalübertragung Co-Rezeptoren. So kann z.B. FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) modulierend (stimulierend und hemmend) auf Mammakarzinomzellen wirken. Seine modulatorische Wirkung wird insbesondere durch Heparansulfat Proteoglykane (HSPG) als Co-Faktoren bestimmt. Das Syndecan-1 (CD138) ist deren wichtigster Vertreter. Häufig ist bei Mammakarzinomen eine hohe Syndecan-1 Expression mit einem aggressiven Tumorwachstum und einer schlechteren Prognose vergesellschaftet. Auch duktales Carcinoma in situ (DCIS) zeigen häufig eine verstärkte Syndecan-1 Expression. Allerdings sind das Ausmaß und die tumorbiologische Bedeutung der Syndecan-1 Expression in DCIS unterschiedlicher Kernmalignitäten unklar. Ein differentielles Expressionsverhalten zwischen den Subgruppen würde für eine aktive Rolle des Syndecan-1 bei der Zelldifferenzierung und der DCIS Tumorprogression sprechen.

Material und Methoden: Besonders die Syndecan-1 Färbeintensität, der Anteil positiv gefärbter Zellen, die zelluläre Syndecan-1 Lokalisation und die Lokalisation im DCIS sind von Interesse. Es stehen von 127 Patientinnen, die von 2000 bis 2006 wegen eines DCIS operiert worden waren, archivierte Hämatoxylin-Eosin-Schnitte mit dazugehörigen Paraffingewebeblöcken, sowie den klinischen und pathologischen Daten zur Verfügung. Nach spezifischer Syndecan-1

Antikörperfärbung wird die Zahl der positiven Tumorzellen semiquantitativ bestimmt und die Färbeintensität nach einem Score bewertet.

Ergebnisse: Die mediane Follow-Up-Zeit der Patientinnen (n=88) liegt bei 45,4 Monaten. Das mittlere rezidivfreie Überleben bei 86 Monaten. In der low grade, sowie in der high grade Gruppe mit Mikroinvasion trat während des Follow-Up kein Rezidiv auf. Die mediane rezidivfreie Überlebenszeit liegt in der intermediate Gruppe bei 85 Monaten und bei den high grade DCIS bei 77 Monaten (kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden, (n.s., $p=0,208$)). Das Alter, der Menopausenstatus ($p=0,057$) und eine frühere Hormonersatztherapie zeigen keinen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben. Im Log-Rank Test zeigt sich ein signifikanter Einfluss des Nikotinkonsums auf ein verschlechtertes rezidivfreies Überleben ($p=0,008$). Es ergibt sich kein statistischer Vorteil für das rezidivfreie Überleben durch eine der endokrinen Therapien oder eine Strahlentherapie. Die DCIS Kernmalignität korreliert zwar nicht mit der Syndecan-1 Färbeintensität, jedoch signifikant mit der Zahl Syndecan-1 positiver Zellen (low vs. high grade, $p=0,043$ und intermediate vs. high grade DCIS, $p=0,049$). Das Patientenalter, der Menopausenstatus, ein Nikotinkonsum und eine frühere HRT korrelieren nicht mit der Zahl Syndecan-1 positiver Zellen oder der S-1 Färbeintensität. Es zeigt sich kein Einfluss der Östrogenrezeptorexpression auf die Färbeintensität von Syndecan-1 ($p=0,247$), jedoch eine negative Korrelation der Östrogenrezeptorexpression mit dem Anteil S-1 positiver Zellen ($p=0,032$). Das bedeutet, daß bei einem positiven Östrogenrezeptorstatus signifikant seltener Syndecan-1 positive Zellen im DCIS vorhanden sind. Der Progesterorezeptorstatus (PR) zeigt statistisch einen signifikanten Einfluss auf Intensität ($p=0,010$), als auch auf den Anteil Syndecan-1 positiver Zellen ($p=0,004$). Die S-1 Färbeintensität, wie auch der Anteil S-1 positiver Zellen ist signifikant stärker bei den PR-negativen DCIS Fällen. Einen signifikanten Einfluss des Menopausenstatus, einer früheren HRT oder eines Nikotinabusus auf die zelluläre Syndecan-1 Expression konnte nicht nachgewiesen werden. Es ergibt sich auch kein signifikanter Einfluss der Syndecan-1 Färbeintensität im DCIS oder der Zahl Syndecan-1 positiver Zellen auf das rezidivfreie Überleben. Allerdings kann eine signifikante Assoziation zwischen der Diagnose und der Färbelokalisation des Syndecan-1 gezeigt werden ($p=0,001$). So tritt bei höhergradiger Kernmalignität

neben einer membrangebundenen Syndecan-1 Färbung auch häufiger eine zytoplasmatische, bzw. eine diffuse Farblokalisation auf.

ER-positive DCIS zeigen signifikant häufiger eine membranständige Syndecan-1 Färbung als ER-negative Fälle [$p=0,001$]. Analog findet sich dieses Ergebnis beim Progesteronrezeptorstatus. Hier zeigt sich die zelluläre S-1- Expression bei PR+ Fällen ausschließlich membrangebunden und bei PR- Fällen auch diffus und zytoplasmatisch ($p=0,001$).

Es besteht eine signifikante Abhängigkeit zwischen dem Grading und der Lokalisation der Syndecan-1 Expression im DCIS Gewebeverband ($p=0,005$). In low grade DCIS zeigt sich Syndecan-1 in 40% diffus im Gewebe, in 40% mit einer peripheren und in 20% mit einer zentral im DCIS gelegenen S-1 Expression. Bei intermediate grade DCIS sind 47% mit diffuser, 35% mit peripherer und 17% mit einer zentralen S-1 Expression. Bei den high grade DCIS zeigen 79% eine diffuse Syndecan-1 Expression, 7% ein peripheres und 14% ein zentrales Muster. Bei den high grade DCIS mit Mikroinvasion zeigen in 86% ein diffuses und 14% ein peripheres Muster. Ein signifikanter Einfluss der Östrogenrezeptorexpression auf die Syndecan-1 Verteilung im Gewebe (zentral, peripher oder diffus lokalisiert) konnte nicht nachgewiesen werden.

Hiervon unterscheidet sich der Einfluss der Progesteronrezeptorexpression deutlich. Von den PR-negativen zeigen ca. 80% eine diffuse, 12% eine periphere und 8% eine zentrale Syndecan- 1 Expression. Bei den PR-positiven DCIS zeigen sich 40% mit diffuser, 35% mit peripherer und 25% mit zentraler Syndecan-1 Expression. Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigt daß zwischen der Progesteronrezeptorexpression und dem Expressionsmuster von Syndecan-1 im Zellverband eine statistisch signifikante Assoziation besteht ($p=0,016$). Für die Syndecan-1 Lokalisation im DCIS ergibt sich kein statistisch signifikanter Einfluss auf das rezidivfreie Überleben.

Diskussion: Es ergibt sich ein Trend für ein längeres rezidivfreie Überleben in der intermediate grade (vs. High grade) DCIS Gruppe. Signifikante Unterschiede bestehen zwischen low grade und high grade DCIS, wie auch zwischen intermediate und high grade DCIS in Bezug auf die Anzahl Syndecan-1 positiver Zellen. Die höhere Kernmalignität korreliert mit einer höheren Zahl Syndecan-1 positiver Zellen. Zusätzlich ist Hormonrezeptorexpression invers mit dem Anteil Syndecan-1 positiver

Zellen korreliert, so dass bei einem positiven Hormonrezeptorstatus signifikant seltener Syndecan-1 positive Zellen im DCIS vorhanden sind.

Dieses verläuft analog zu den invasiven Mammakarzinomen, bei denen eine starke Expression von Syndecan-1 mit einem aggressiven Tumortyp und einer schlechteren Prognose korreliert. Es kann vermutet werden, dass Syndecan-1 einen Einfluss auf das Wachstumsmuster des DCIS und auf die Tumorprogression hat, allerdings konnte kein signifikanter Einfluss der Syndecan-1 Färbeintensität oder des Anteils Syndecan-1 positiver Zellen im DCIS auf das rezidivfreie Überleben nachgewiesen werden. Zwischen DCIS unterschiedlicher Kernmalignitäten ist die Färbelokalisation des Syndecan-1 signifikant divergent, was auf einen Einfluss bei der Tumorprogression hindeutet.

Literatur

1. Robert-Koch Institut 2010, Krebs in Deutschland 2005/2006- Häufigkeiten und Trends
2. Beral V; Million Women Study Collaborators (2003), Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study., *Lancet*, 9;362(9382):419-27. Erratum in: *Lancet* (2003), 4;362(9390):1160.
3. Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, Bennett LM, Haugen-Strano A, Swensen J, Miki Y, et al. (1994), BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas., *Science*, 7;266(5182):120-2.
4. Krainer M, Silva-Arrieta S, FitzGerald MG, Shimada A, Ishioka C, Kanamaru R, MacDonald DJ, Unsal H, Finkelstein DM, Bowcock A, Isselbacher KJ, Haber DA. (1997), Differential contributions of BRCA1 and BRCA2 to early-onset breast cancer., *N Engl J Med.*, 15;336(20):1416-21.
5. Shattuck-Eidens D, Oliphant A, McClure M, McBride C, Gupte J, Rubano T, Pruss D, Tavtigian SV, Teng DH, Adey N, Staebell M, Gumpfer K, Lundstrom R, Hulick M, Kelly M, Holmen J, Lingenfelter B, Manley S, Fujimura F, Luce M, Ward B, Cannon-Albright L, Steele L, Offit K, Thomas A et al. (1997), BRCA1 sequence analysis in women at high risk for susceptibility mutations. Risk factor analysis and implications for genetic testing, *JAMA*, 15;278(15):1242-50.
6. Langston AA, Malone KE, Thompson JD, Daling JR, Ostrander EA (1996), BRCA1 mutations in a population-based sample of young women with breast cancer, *N Engl J Med*, 18;334(3):137-42.
7. Preston DL, Ron E, Tokuoka S, Funamoto S, Nishi N, Soda M, Mabuchi K, Kodama K. (2007), Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998., *Radiat Res.*,168(1):1-64.
8. Purushotham AD (2003), The diagnosis and management of pre-invasive breast disease Problems associated with management of pre-invasive lesions, *Breast Cancer Res*, 5:309-312.
9. Bijker N, Meijnen P, Peterse JL, Bogaerts J, Van Hoorebeeck I, Julien JP, Gennaro M, Rouanet P, Avril A, Fentiman IS, Bartelink,H and Rutgers EJT (2006), Breast-Conserving Treatment With or Without Radiotherapy in Ductal Carcinoma-In-Situ: Ten-Year Results of European Organisation for Research and Treatment of Cancer randomized Phase III Trial 10853—A Study by the EORTC Breast Cancer Cooperative Group and EORTC Radiotherapy Group, *J Clin Oncol*, 24:3381-3387.
10. Nelson NJ (2010), DCIS Prognostic Markers: A Few New Candidates Emerge, *JNCI J Natl Cancer Inst*, Volume102, 9:588-590.

11. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2010), Overview of the Randomized Trials of Radiotherapy in Ductal Carcinoma In Situ of the Breast, *J Natl Cancer Inst Monogr*; 41:162–177.
12. Eng-Wong J, Costantino JP, Swain SM (2010), The Impact of Systemic Therapy Following Ductal Carcinoma In Situ, *J Natl Cancer Inst Monogr*;41:200–203.
13. Loussouarn D, Campion L, Sagan C, Frenel JS, Dravet F, Classe JM, Pioud-Martigny R, Berton-Rigaud D, Bourbouloux E, Mosnier JF, Bataille FR, Campone M (2008), Prognostic impact of syndecan-1 expression in invasive ductal breast carcinomas; *Br J Cancer*, 17;98(12):1993-8.
14. Porter D, Lahti-Domenici J, Keshaviah A, Bae YK, Argani P, Marks J, Richardson A, Cooper A, Strausberg R, Riggins GJ, Schnitt S, Gabrielson E, Gelman R, Polyak K. (2003), Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mol Cancer Res.*, 1(5):362-75.
15. Mundhenke C, Meyer K, Drew S, Friedl A. (2002), Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 receptor binding in breast carcinomas. *Am J Pathol.*, 160(1):185-94.
16. Ojeh N, Hillesvuo K, Wärrä A, Salmivirta M, Henttinen T, Määttä A. (2008), Ectopic expression of syndecan-1 in basal epidermis affects keratinocyte proliferation and wound re-epithelialization, *J Invest Dermatol.*, 128(1):26-34.
17. Maeda T, Desouky J, Friedl A. (2006), Syndecan-1 expression by stromal fibroblasts promotes breast carcinoma growth in vivo and stimulates tumor angiogenesis, *Oncogene*, 2;25(9):1408-12.
18. Lai TH, King JA, Shih IeM, Vlahos NF, Zhao Y. (2007), Immunological localization of syndecan-1 in human endometrium throughout the menstrual cycle, *Fertil Steril.*, 87(1):121-6.
19. Lendorf ME, Manon-Jensen T, Kronqvist P, Multhaupt HA, Couchman JR. (2011), Syndecan-1 and syndecan-4 are independent indicators in breast carcinoma, *J Histochem Cytochem.*, 59(6):615-29.
20. Silverstein MJ, Parker R, Grotting JC, Cote RJ, Russell CA (2001)., Ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast: diagnostic and therapeutic controversies. *J Am Coll Surg.*, 192(2):196-214.
21. Sprague BL, Trentham-Dietz A, Nichols HB, Hampton JM, Newcomb PA (2010), Change in lifestyle behaviors and medication use after a diagnosis of ductal carcinoma in situ. *Breast Cancer Res Treat.*, 124(2):487-95.
22. Boland GP, McKeown A, Chan KC, Prasad R, Knox WF, Bundred NJ (2003), Biological response to hormonal manipulation in oestrogen receptor positive ductal carcinoma in situ of the breast, *Br J Cancer.*, 21;89(2):277-83.
23. Holmes MD, Murin S, Chen WY, Kroenke CH, Spiegelman D, Colditz GA (2007), Smoking and survival after breast cancer diagnosis. *Int J Cancer*, 15;120(12):2672-7.

24. Kerlikowske K (2010), Epidemiology of ductal carcinoma in situ. *J Natl Cancer Inst Monogr.*, (41):139-41. Review
25. Kabat GC, Kim M, Kakani C, Tindle H, Wactawski-Wende J, Ockene JK, Luo J, Wassertheil-Smoller S, Rohan TE (2010), Cigarette smoking in relation to risk of ductal carcinoma in situ of the breast in a cohort of postmenopausal women. *Am J Epidemiol.*, 1;172(5):591-9.
26. Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie (2012), Therapieempfehlungen zur Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome, Kapitel Ductales Carcinoma in situ (DCIS).
27. Barbareschi M, Maisonneuve P, Aldovini D, Cangi MG, Pecciarini L, Angelo Mauri F, Veronese S, Caffo O, Lucenti A, Palma PD, Galligioni E, Doglioni C (2003), High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis, *Cancer*, 98:478-483.
28. Sahlin L, Jiang S, Von Schoultz B, Fernstad R, Skoog L, Von Schoultz E (2007), Expression of syndecan-1 in paired samples of normal and malignant breast tissue from postmenopausal women, *Anticancer Res.*,27: 3045-3050.
29. Matsuda K, Maruyama H, Guo F, Kleeff J, Itakura J, Matsumoto Y, Lander AD, Korc M (2001), Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells., *Cancer Res.*, 15;61(14):5562-9.
30. Nikolova V, Koo CY, Ibrahim SA, Wang Z, Spillmann D, Dreier R, Kelsch R, Fischgräbe J, Smollich M, Rossi LH, Sibrowski W, Wülfing P, Kiesel L, Yip GW, Götte M (2009), Differential roles for membrane-bound and soluble syndecan-1 (CD138) in breast cancer progression, *Carcinogenesis*,30(3):397-407.
31. Tokes AM, Szasz AM, Farkas A, Toth AI, Dank M, Harsanyi L, Molnar BA, Molnar IA, Laszlo Z, Rusz Z, Kulka J (2009), Stromal matrix protein expression following preoperative systemic therapy in breast cancer, *Clin Cancer Res.*, 15(2).
32. Burbach BJ, Friedl A, Mundhenke C, Rapraeger AC (2003), Syndecan-1 accumulates in lysosomes of poorly differentiated breast carcinoma cells, *Matrix Biol.*, 22(2):163-77.
33. Götte M, Kersting C, Ruggiero M, Tio J, Tulusan AH, Kiesel L, Wülfing P (2006), Predictive value of syndecan-1 expression for the response to neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer, *Anticancer Res.*, 26(1B):621-7.
34. Lundström E, Sahlin L, Skoog L, Hägerström T, Svane G, Azavedo E, Sandelin K, von Schoultz B (2006), Expression of Syndecan-1 in histologically normal breast tissue from postmenopausal women with breast cancer according to mammographic density. *Climacteric*, 9(4):277-82.
35. Leivonen M, Lundin J, Nordling S, von Boguslawski K, Haglund C (2004), Prognostic value of syndecan-1 expression in breast cancer, *Oncology*, 67:11-18.

36. Sunil N, Srinivasan N, Aruldas MM, Govindarajulu P (2000), Impact of oestradiol and progesterone on the glycosaminoglycans and their depolymerizing enzymes of the rat mammary gland. *Acta Physiol Scand.*, 168(3):385-92.
37. Hallberg G, Andersson E, Naessén T, Ordeberg GE (2010), The expression of syndecan-1, syndecan-4 and decorin in healthy human breast tissue during the menstrual cycle. *Reprod Biol Endocrinol.*, Apr 16;8:35.
38. Baba F, Swartz K, van Buren R, Eickhoff J, Zhang Y, Wolberg W, Friedl A (2006)., Syndecan-1 and syndecan-4 are overexpressed in an estrogen receptor-negative, highly proliferative breast carcinoma subtype., *Breast Cancer Res Treat.*, 98(1):91-8.
39. Su G, Blaine SA, Qiao D, Friedl A (2007), Shedding of syndecan-1 by stromal fibroblasts stimulates human breast cancer cell proliferation via FGF2 activation. *J Biol Chem.*, 18;282(20):14906-15.
40. Remmele W, Stegner HE (1987), Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue, *Pathologe*, 8(3):138-40.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. K. Tiemann (ehemals Institut für Pathologie, UKSH, Kiel, jetzt Institut für Hämatopathologie Hamburg) dafür, dass sie mir während der gesamten Arbeit beratend und unterstützend zur Seite stand und immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Walter Jonat (Direktor der Frauenklinik am UKSH, Kiel) danke ich für die Überlassung des Themas, die ideelle Unterstützung und die Möglichkeit des wissenschaftlichen Arbeitens an der Frauenklinik des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

Danken möchte ich auch den MTAs Sigrid Hamann und Frank Rösel, die immer freundlich und hilfsbereit waren, mich in die Methoden einarbeiteten und mit wertvollen Anregungen unterstützten.

Meinem Mann Christoph danke ich für die ständige Unterstützung und die Betreuung unserer Söhne Frederik Caspar und August während des Erstellens der Dissertationsschrift.

Lebenslauf

| | |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Name: | Heidi Mundhenke, geb. Schott |
| Geboren: | 08.01.1974 |
| Familienstand: | verheiratet, 3_Söhne |
| Adresse: | Luisenweg 10, 24105 Kiel |
| Schulzeit: | Grund- und Realschule in Kellinghusen, 1980-1991 Gymnasium in Itzehoe, 1991-1994 Abitur 1994 |
| Ausbildung: | Krankenpflegeausbildung am Klinikum der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 1994-1997 |
| Berufstätigkeit vor dem Studium: | OP Schwester an der Universitäts-Frauenklinik Kiel, 1997-2001 |
| Studium: | Pädagogik und Nordistik, 1998-2001 Zahnmedizin, 2001-2006, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2006 Zahnärztliche Prüfung/ Staatsexamen (Note: gut) in Regelstudienzeit |
| Approbation: | Als Zahnärztin, 16. August 2006 |
| Weiterbildung | 1.5.2007 bis 26.9.2008 in der Zahnarztpraxis Dr. Behrens, Kiel 1.9.2009 bis zum 31.12.2010 in der Zahnarztpraxis Dr. Stitz/Dr. Mogadas, Kiel |

Kiel, den 30.7. 2013

Heidi Mundhenke