

Aus der Forschungsgruppe Chirurgische Onkologie  
am Experimental and Clinical Research Center  
des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin und  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

***Immunhistochemische Untersuchung des  
Neoangiogenesemarkers CD105 in ausgewählten Stadien der  
Mammakarzinogenese unter besonderer Berücksichtigung des  
Ductalen Carcinoma In Situ der Mamma***

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Alexandra Röhrich  
aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. K. Th. Moesta  
2. Prof. Dr. med. C. Stroszczynski  
3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Th. Jöns

Datum der Promotion: 19. März 2010

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>6</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
<b>2 GRUNDLAGEN</b>	<b>9</b>
2.1 Aufbau der weiblichen Brust	9
2.2 Das Ductale Carcinoma In Situ der Mamma	9
2.2.1 <i>Definition</i>	9
2.2.2 <i>Epidemiologie</i>	10
2.2.3 <i>Klassifikation</i>	10
2.2.4 <i>Diagnose</i>	11
2.2.5 <i>Therapie und Prognose</i>	12
2.3 Mamma-Karzinogenese	13
2.4 Benigne Veränderungen der Mamma	14
2.5 Tumorangiogenese	14
2.5.1 <i>Einführung</i>	14
2.5.2 <i>Quantitative Erfassung der Angiogenese</i>	15
2.5.3 <i>Anti-angiogene Strategien, „vascular targeting“ und „molecular imaging“</i>	16
2.5.4 <i>DCIS und Angiogenese</i>	17
2.6 CD105	18
2.6.1 <i>Struktur und Expression</i>	18
2.6.2 <i>Funktion und Modulation</i>	18
2.6.3 <i>Einsatz von CD105 in Diagnostik, Prognostik und Therapie</i>	19
2.7 CD31	21
2.7.1 <i>Struktur und Expression</i>	21
2.7.2 <i>Funktion und Modulation</i>	22
2.8 Anforderungen an diagnostische Tests	23
<b>3 HERLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>24</b>

---

<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>26</b>
4.1	Grundlagen der Immunhistochemie	26
4.1.1	<i>Prinzip</i>	26
4.1.2	<i>Avidin-Biotin-Methode</i>	26
4.1.3	<i>ABC-Methode mit Tyramid-Signalverstärkung (CSA)</i>	27
4.1.4	<i>Antigen-Demaskierungs-Methoden</i>	27
4.2	Histologisches Material	28
4.3	Immunhistochemie	29
4.3.1	<i>Verwendete Antikörper</i>	29
4.3.2	<i>Vorbereitung des histologischen Materials</i>	29
4.3.3	<i>Herstellung der verwendeten Lösungen</i>	29
4.3.4	<i>Erarbeitung der Färbeprotokolle</i>	30
4.3.5	<i>Färbeprotokoll CD105</i>	31
4.3.6	<i>Färbeprotokoll CD31</i>	32
4.4	Histologische Auswertung	33
4.5	Statistische Auswertung	34
4.6	Liste der verwendeten Materialien	36
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
5.1	Qualitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	38
5.1.1	<i>Übersicht</i>	38
5.1.2	<i>CD105</i>	39
5.1.3	<i>CD31</i>	42
5.2	Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CD105	44
5.2.1	<i>Übersicht</i>	44
5.2.2	<i>Auswertung der CD105-MVD</i>	45
5.2.3	<i>Auswertung der CD105-Necklace-VD</i>	48
5.2.4	<i>Auswertung der CD105-FI</i>	49
5.2.5	<i>Korrelationen zwischen CD105-MVD und CD105-Necklace-VD</i>	50

---

5.3	Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CD31	51
5.3.1	<i>Übersicht</i>	51
5.3.2	<i>Auswertung der CD31-MVD</i>	52
5.3.3	<i>Auswertung der CD31-Necklace-VD</i>	55
5.3.4	<i>Auswertung der CD31-FI</i>	56
5.3.5	<i>Korrelationen zwischen CD31-MVD und CD31-Necklace-VD</i>	57
5.4	Analyse des Quotienten CD105/CD31-MVD	58
5.5	Analyse des Quotienten CD105/CD31-Necklace-VD	61
5.6	Korrelationen zwischen CD105 und CD31	64
5.6.1	<i>Überblick</i>	64
5.6.2	<i>Korrelationen zwischen CD105- und CD31-MVD</i>	64
5.6.3	<i>Korrelationen zwischen CD105- und CD31-Necklace-VD</i>	65
5.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	66
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>69</b>
6.1	Beurteilung der Methodik	69
6.1.1	<i>Beurteilung des Materials</i>	69
6.1.2	<i>Beurteilung der qualitativen Färbeergebnisse</i>	69
6.1.3	<i>Beurteilung der quantitativen Auswertung</i>	70
6.1.4	<i>Beurteilung der statistischen Auswertung</i>	71
6.2	Beurteilung der Ergebnisse	72
6.3	Vergleich mit anderen Arbeiten	76
6.4	Bewertung der Gesamtergebnisse	80
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>83</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>94</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>95</b>
	<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b>	<b>97</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AK	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata
CD	Cluster of differentiation
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAB-Lösung	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Lösung
DCIS	Ductales Carcinoma in situ
FFPE-Gewebe	(in) Formalin fixiertes (und in) Paraffin eingebettetes Gewebe
FI	Färbeintensität
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HPF	High power field
IDC	Invasive ductal Carcinoma (Invasiv Ductales Karzinom)
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
mAK	Monoklonaler Antikörper
MVD	Microvessel-Density (hier: Stromagefäßdichte)
n	Fallzahl
Necklace-VD	Necklace-Vessel-Density (Ringgefäßdichte)
NG	Nuclear grade (Kerngrad)
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate buffered saline
PBS/Tween	Phosphate buffered saline with tween
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
s	Standardabweichung
sCD105	Soluble (lösliches) CD105

SCID	Severe combined immunodeficiency
TBS	Tris buffered saline
TBS/Tween	Tris buffered saline with tween
TDLE	Terminale ductulo-lobuläre Einheit
TMA	Tissue Microarray
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VNPI	Van Nuys Prognostischer Index
vWF	von Willebrandt Faktor

## 1 EINLEITUNG

Mit ca. 55 000 Neuerkrankungen pro Jahr allein in Deutschland ist das Mammakarzinom die häufigste bösartige Krebserkrankung der Frau [1]. Jede zehnte bis elfte Frau wird im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkranken. Bei den 45- bis 55-jährigen steht Brustkrebs an erster Stelle der Todesursachen [2].

Viele Forschungsarbeiten befassen sich deshalb mit der Entwicklung besserer Methoden zur Früherkennung und Therapie. Von essentieller Bedeutung ist dafür die Klärung der genauen Entstehung der Mammakarzinome (Karzinogenese). Zwar wurden in den letzten Jahren und Jahrzehnten große Fortschritte im Verständnis dieser Vorgänge erzielt, jedoch sind viele Zusammenhänge noch unklar. Seit einigen Jahren mehren sich Zweifel an dem lange Zeit anerkannten Konzept, dass die Mamma-Karzinogenese linear über nicht invasive Vorstufen, wie dem Ductalen Carcinoma in situ (DCIS), mit schrittweiser Umwandlung in invasive Karzinome verläuft. Die Bedeutung des DCIS für die Mamma-Karzinogenese ist deshalb bis heute nicht eindeutig geklärt.

Die Neoangiogenese (Neubildung von Gefäßen aus dem bestehenden Gefäßbett) hat große Bedeutung hinsichtlich Wachstum und Metastasierung von Tumoren aller Art, wodurch ihr eine entscheidende Rolle hinsichtlich Prognose und Überleben betroffener Patienten zukommt. Sie kann in Tumoren durch verschiedene Marker quantifiziert werden. Einer von diesen Angiogenesemarkern ist CD105, ein Protein, welches vor allem auf aktivierten (angiogenen) Endothelien exprimiert wird. In vielen Tumoren, u. a. dem Mammakarzinom, konnte diesem Molekül bereits eine herausragende prognostische Bedeutung nachgewiesen werden. Außerdem bietet es Ansätze für Diagnostik und Therapie verschiedenster Tumoren. Untersuchungen der CD105-Expression am DCIS liegen bis jetzt jedoch noch nicht vor.

Ziel der hier vorgelegten Arbeit ist es, die Neoangiogenese im DCIS mit Hilfe des Gefäßmarkers für angiogene Endothelien CD105 sowie des Panendothelmarkers CD31 immunhistochemisch zu quantifizieren und mit anderen Mammageweben (Normalgewebe, benigne Mamma-Läsionen, invasive Karzinome) zu vergleichen. Anhand der erhaltenen Ergebnisse sollen neue Ansätze für Diagnostik, Prognostik und gegebenenfalls Therapie überprüft werden. Da vor allem die Früherkennung des DCIS noch problematisch, für die Prognose jedoch von äußerster Wichtigkeit ist, liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Beurteilung der Möglichkeit der Frühdiagnostik durch optisch-molekulare Bildgebung mittels eines fluoreszenzmarkierten anti-CD105-Antikörpers.



## 2 GRUNDLAGEN

### 2.1 Aufbau der weiblichen Brust

Die Brust besteht aus drei Gewebearten: Drüsengewebe, Fettgewebe und umgebendes Bindegewebe. Das Drüsengewebe ist in mehrere von einander abgegrenzte Lappen unterteilt, die wiederum aus einem lobulären Anteil (Drüsenläppchen) und einem ductalen Anteil (Drüsen­gängen) bestehen. Die Drüsenendstücke (Azini) münden über terminale, subsegmentale und segmentale Milchgänge (Ductus) in die Milchsäckchen (Sinus lactiferi), welche wiederum über die Brustwarze nach außen führen. Der terminale Milchgang und die korrespondierenden Läppchen bilden zusammen die „terminale ductulo-lobuläre Einheit“ (TDLE).

Der gesamte Drüsenbaum wird an der Innenseite von Epithel ausgekleidet. Nach außen schließt sich eine Myoepithelschicht an, die zum Stroma hin durch eine Basalmembran abgegrenzt ist.

Benigne und maligne Veränderungen der Mamma können theoretisch von allen drei Gewebearten ausgehen. Das Mammakarzinom entsteht jedoch durch maligne Transformation der Drüsenepithelien.

### 2.2 Das Ductale Carcinoma In Situ der Mamma

#### 2.2.1 Definition

Synonyme: intraduktales Karzinom bzw. nicht-invasives duktales Karzinom

Das Ductale Carcinoma In Situ (DCIS) der Mamma stellt eine heterogene Läsion dar, die durch eine klonale Proliferation (maligne) transformierter epithelialer Zellen innerhalb des Milchgangsystems der Brust ohne lichtmikroskopische Anzeichen einer Invasion durch die Basalmembran und fehlender Metastasierung gekennzeichnet ist.

Bei mamillennaher Lokalisation können die transformierten Zellen des DCIS bis in die Epidermis der Mamille vordringen und dort zum Bild des Morbus Paget führen.

Es herrschen unterschiedliche Meinungen darüber, ob das DCIS den benignen oder den malignen Erkrankungen zuzuordnen ist, da ihm einerseits wichtige maligne Merkmale wie Invasion und Metastasierung fehlen, es aber andererseits mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung eines invasiven Mammakarzinoms einhergeht. Auf Grund dessen wird das DCIS gelegentlich auch als Borderline-Läsion bzw. als Präkanzerose bezeichnet.

Von dem DCIS abzugrenzen ist das LCIS, das Lobuläre Carcinoma In Situ. Es stellt eine monomorphe Zellproliferation in den Lobuli mit kolbenförmiger Auftreibung der Azini dar und geht mit einem wesentlich geringeren Risiko der Entwicklung eines invasiven Karzinoms einher als das DCIS.

### 2.2.2 Epidemiologie

Die Inzidenz des DCIS hat sich in den letzten Jahrzehnten durch verbesserte Diagnostik dramatisch gesteigert. Während das DCIS vor Einführung der Mammographie als Screeningmethode nur einen Anteil von etwa 5 % ausmachte, stellt es heutzutage ca. 15-20 % aller detektierten Mammaneoplasien dar [3-6].

### 2.2.3 Klassifikation

Die Klassifikation des DCIS ist schwierig und ständigen Änderungen unterworfen. Traditionell wurden DCIS histologisch an Hand ihres Architekturmusters in die fünf Subtypen papillär, mikropapillär, solide, kribriform und komedo unterteilt. Diese Unterteilung erlaubt jedoch kaum prognostische Aussagen. Oft wird deshalb auch die Einteilung in „comedo type“ (Komedokarzinom) und „non-comedo type“ DCIS (alle anderen Subtypen) vorgenommen. Dabei ist das comedo DCIS durch das Auftreten sogenannter Komedonekrosen (zentrale, über 50 % des Gangquerschnittes einnehmende Nekrosen mit starker zellulärer und nukleärer Polymorphie) gekennzeichnet. Es ist im Gegensatz zu dem non-comedo DCIS mit erhöhter Aggressivität und schlechterer Prognose assoziiert [7]. Als prognostisch wichtigste histologische Eigenschaft hat sich der Kerngrad erwiesen, nach dem DCIS in drei Grade eingeteilt werden (s. Tab. 1). Dabei ist ein hoher Kerngrad prognostisch ungünstiger [8].

Tabelle 1: Klassifikation des DCIS nach Kerngrad

<b>Kerngrad</b>	<b>Kriterien</b>
Low grade (NG1)	<i>Erscheinungsbild:</i> monomorph <i>Größe:</i> Kerne mit 1-1,5fachem Erythrozytendurchmesser <i>Merkmale:</i> gewöhnlich diffuses, fein disperses Chromatin, nur gelegentlich Nucleoli und Mitosefiguren, üblicherweise Assoziation mit Zellpolarisation <i>Vorbehalt:</i> das Auftreten von Kernen ähnlicher Größe aber mit Pleomorphie schließt eine low grade Klassifikation aus
Intermediate grade (NG2)	Kerne, die weder NG1 noch NG3 sind <i>Größe:</i> Kerne mit 1-2fachem Erythrozytendurchmesser <i>Merkmale:</i> grobes Chromatin und vereinzelt Nucleoli
High grade (NG3)	<i>Erscheinungsbild:</i> deutlich pleomorph <i>Größe:</i> Kerne mit gewöhnlich mehr als 2,5fachem Erythrozytendurchmesser <i>Merkmale:</i> vesikuläres Chromatin und prominente, häufig multiple Nucleoli, eventuell auffällige Nekrosen

Auf der „*Consensus Conference on the Classification of the Ductal Carcinoma in situ*“ wurde 1997 ein einheitlicher Standard zur Erfassung und Dokumentierung von DCIS erarbeitet, der u. a. Kerngrad, Nekrose, Polarisierung, Architekturmuster und zusätzlich Ränder, Größe (Ausdehnung und Verteilung), Mikrokalzifikationen sowie die Korrelation der Gewebeprobe mit Präparatradiographie und Mammographie umfasst [9]. In einer von Tsikitis et al. [10] kürzlich postulierten Klassifikation erfolgt die Unterteilung in „high“, „moderate“ und „low aggressive“ an Hand von sowohl histopathologischen (Kerngrad, Nekrose, Hormon-Rezeptor-Status) als auch molekularen Eigenschaften (Expression von Ki-67, p53, HER-2/neu, COX-2 und Chromosomenaberrationen). Dieser Klassifikation wird von den Autoren eine bessere Aussagekraft bezüglich Prognose und notwendiger Therapie zugesprochen.

#### 2.2.4 Diagnose

Häufig bleiben DCIS asymptomatisch. Sie können sich allerdings auch durch eine Sekretion aus der Mamille äußern und teilweise sogar makroskopisch auffällig werden.

Die Mehrzahl der heutzutage diagnostizierten DCIS werden im Rahmen des Mammographie-screenings entdeckt. Dabei stellen sich je nach Studie 62 %-98 % der DCIS als Mikrokalk und 2 %-23 % als fokale Masse, asymmetrische Dichte oder architektonische Verzerrung dar, während 6 %-23 % der anderweitig (z. B. intraoperativ) diagnostizierten DCIS mammographisch unauffällig bleiben [11-15]. Auffällige Mammographiebefunde werden in der Regel durch Feinnadel- oder Stanzbiopsien abgeklärt. Unbekannt ist die Dunkelziffer der DCIS, die mit keiner der herkömmlichen Methoden erfasst werden.

Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Magnet-Resonanz-Tomographie oft eine höhere Sensitivität für den Nachweis von DCIS aufweist als die Mammographie [16, 17]. Dies gilt insbesondere für high-grade DCIS und junge Patientinnen, bei denen die Mammographie auf Grund der höheren Brustgewebedichte schlechtere Ergebnisse erzielt. Dennoch wird die Magnet-Resonanz-Tomographie bisher nur begrenzt zur DCIS-Diagnostik eingesetzt.

Seit einiger Zeit wird außerdem vereinzelt die Duktoskopie zur Diagnostik des DCIS eingesetzt [18-20]. Sie kommt vor allem bei der präoperativen Diagnostik invasiver Mammakarzinome zur Bestimmung der Ausdehnung intraductaler Läsionen und zur Abklärung unklarer Mamillensekretion zum Einsatz. Außerdem bietet sie auch interventionelle Möglichkeiten. Allerdings erscheint ihr Einsatz als Screeningmethode eher ungeeignet, da es sich um eine invasive Methode handelt und außerdem nicht alle Milchgänge von der Mamille aus zugänglich sind. Somit wären in jedem Fall weitere Untersuchungen nötig.

In der Entwicklung befinden sich außerdem u. a. die intraductale Magnet-Resonanz-Tomographie und -Spektroskopie [21], die Autofluoreszenz-Duktoskopie [22] sowie die Analyse von Mamillenaspirat [23] als Screeningmethoden.

### 2.2.5 Therapie und Prognose

Ein DCIS, als präinvasive Läsion, führt in der Regel nicht selbst zum Tod. Eine Therapiebedürftigkeit ergibt sich jedoch aus folgenden Gründen: zum Ausschluss eines invasiven Karzinoms, zur Prävention einer eventuellen Weiterentwicklung des DCIS in ein invasives Mammakarzinom sowie ggf. als symptomatische Therapie. Dabei steht die chirurgische Intervention an vorderster Stelle.

Lange Zeit galt die Mastektomie mit axillärer Dissektion als Therapie der Wahl. In Anbetracht dessen, dass nur ein geringer Teil der DCIS in ein invasives Karzinom übergeht, und auf Grund besserer kosmetischer Ergebnisse, steht heute die brusterhaltende Therapie mit anschließender Bestrahlung im Vordergrund. Ein allgemein anerkanntes und gültiges Therapiekonzept existiert jedoch nicht.

Viele Tumorzentren richten sich in der Wahl der Therapie nach dem von Silverstein et al. 1995 eingeführten „*Van Nuys Prognostic Index*“ (VNPI). Dieser stützt sich auf Tumorgröße, Abstand zum Resektionsrand und Kerngrad und wurde 2003 um das Alter des Patienten erweitert. Entsprechend einem dadurch erhaltenen Score besteht die Therapie in alleiniger Exzision, Exzision mit postoperativer Bestrahlung oder Mastektomie [8, 24].

Eine Axilladissektion ist bei einem reinen DCIS in der Regel nicht erforderlich [25], sollte aber bei Verdacht auf (Mikro-) Invasion in Erwägung gezogen werden.

Vor allem bei jungen Patientinnen mit positivem Hormonrezeptor-Status kann eine Therapie mit Tamoxifen das Rezidivrisiko zusätzlich senken [26].

Die Angaben des Rezidivrisikos schwanken je nach Studie. Eine Meta-Analyse ergab mittlere Rezidivraten von 1,4 % nach Mastektomie, 8,9 % nach brusterhaltender Therapie mit anschließender Bestrahlung und 22,5 % nach brusterhaltender Therapie ohne nachfolgende Bestrahlung [27].

Insgesamt ist die brustkrebspezifische Mortalität für DCIS sehr gering. Laut Silverstein [28] beträgt sie über einen Beobachtungszeitraum von acht Jahren im Mittel etwa 1,4 %, davon 0 % nach Mastektomie bzw. 2,1 % nach brusterhaltender Therapie. Weitere Studien bestätigen ähnlich niedrige Mortalitätsraten [29-32].

### 2.3 Mamma-Karzinogenese

Die Mamma-Karzinogenese ist bis heute noch nicht geklärt und somit immer noch Gegenstand vieler Untersuchungen. Heutzutage existieren vor allem zwei Brustkrebsmodelle: die Theorie der linearen Progression auf der einen und die Theorie der parallelen Entstehung auf der anderen Seite.

Viele Jahre galt die Mamma-Karzinogenese als ein linearer vielschrittiger Prozess, in dessen (jahre- und teilweise jahrzehntelangem) Verlauf normale Epithelzellen transformieren und Carcinomata in situ bilden, die wiederum unter bestimmten Umständen in invasive Karzinome übergehen und letztlich zu Metastasen und Tod führen können. Breite Anerkennung fand dabei vor allem das Konzept von Wellings [33], wonach Mammakarzinome in den TDLE entstehen und sich dann durch Anhäufung genetischer Mutationen schrittweise über die Vorläuferläsionen *atypische ductale Hyperplasie* → *low-grade DCIS* → *high-grade DCIS* im Gangsystem ausbreiten, um schließlich als invasive Karzinome die Basalmembran zu durchbrechen. Diese Theorie wird durch mehrere Tatsachen gestützt. So sind zum einen in vielen invasiven Mammakarzinomen DCIS-Anteile nachweisbar und zum anderen stellen Vorläuferläsionen wie das DCIS Risikofaktoren für die Entwicklung eines invasiven Mammakarzinoms dar. Außerdem finden sich zwischen Vorläufern und invasiven DCIS ähnliche genetische Muster und auch ähnliche Veränderungen, insbesondere wenn sie in der gleichen Brust auftreten [34-36].

Neuere Studien jedoch stellen dieses Konzept in Frage und lassen vermuten, dass an Stelle der linearen progressiven Dedifferenzierung mehrere verschiedene und zum Teil auch parallele Karzinogenese-Wege existieren. Unterschiedliche Tumor-Subtypen könnten demnach von unterschiedlichen, mutierten Stammzellen abstammen, die dann wiederum auch unterschiedliche Folgemutationen durchlaufen können. Diese Vermutungen beruhen auf dem Nachweis molekulargenetischer Unterschiede zwischen low- und high-grade DCIS sowie low- und high-grade IDC [37, 38] als auch zwischen reinen DCIS, DCIS mit IDC-Komponente und reinen IDC [39-44]. Somit ist es denkbar, dass bestimmte DCIS-Subtypen genetisch als reine DCIS definiert sind und nicht in invasive Karzinome übergehen. Allerdings schließen diese Ergebnisse auch nicht aus, dass reine DCIS Vorläufer der DCIS mit invasiver Komponente sind, die noch nicht alle zur Invasion benötigten genetischen Veränderungen besitzen. Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass low-grade DCIS die Grundlage für low-grade IDC und high-grade DCIS die Grundlage für high-grade IDC bilden [45].

## 2.4 Benigne Veränderungen der Mamma

Benigne Läsionen der Mamma sind häufig und treten vor allem bei jüngeren Frauen auf.

Das Fibroadenom ist der häufigste benigne Tumor der Mamma und somit die wichtigste Differentialdiagnose zum invasiven Mammakarzinom. Es ist meist scharf begrenzt, gut verschieblich und besteht aus proliferierenden Drüsen und Bindegewebe.

(Intraductale) Papillome sind blumenkohlartige Auswucherungen des Gangepithels um einen fibrovaskulären Kern. Sie sind keine eigenständigen Tumoren sondern gehören (wie auch die Adenosen) zum Formenkreis der Mastopathie.

Adenosen entstehen durch fibrös-zystische Umbauprozesse der Mamma mit einer Vermehrung der Drüsenläppchen und daraus resultierendem Überwiegen des Drüsenparenchyms gegenüber dem Bindegewebe.

## 2.5 Tumorangiogenese

### 2.5.1 Einführung

(Neo-)Angiogenese, die (Neu-)Bildung neuer Blutgefäße aus dem bestehenden Gefäßbett, ist essentiell für Tumorwachstum und Metastasierung [46-48]. Durch sie werden die Bereitstellung von Nährstoffen und Sauerstoff sowie der Abtransport von Abfallprodukten gewährleistet. Zwar können sich Tumoren zunächst durch Inkorporation bereits vorhandener Gefäße ernähren, um aber über eine Größe von 1-2 mm<sup>3</sup> hinauswachsen zu können, müssen sie selbst ein ausreichendes Gefäßwachstum induzieren [49, 50].

Die Tumorangiogenese ist Inhalt vieler Forschungsarbeiten, da sie Ansätze für Diagnostik, Prognostik und auch Therapie von Tumoren bildet.

Die Angiogenese wird durch angiogene Faktoren (u. a. VEGF, TNF- $\alpha$ ) reguliert [51, 52]. Diese können von Endothel-, Stroma- und Tumorzellen sowie aus dem Blut und der extrazellulären Matrix freigesetzt werden [53]. Pro- und anti-angiogene Faktoren sind unter physiologischen Umständen im Gleichgewicht. Bei einem Überwiegen pro-angiogener Faktoren in Tumoren kommt es zu einem Überwiegen der Angiogenese, dem sogenannten „angiogenic switch“. Dieser kann beispielsweise durch metabolischen Stress (u. a. Hypoxie, Hypoglykämie, Azidose), mechanischen Stress (z. B. erhöhter Gewebedruck durch Zellproliferation), Immun- und Entzündungsreaktionen sowie genetische Mutationen (u. a. Aktivierung von Onkogenen, Deletion von Tumor-Suppressor-Genen) ausgelöst werden [46].

Bei der Neubildung von Blutgefäßen werden zwei unterschiedliche Vorgänge unterschieden: Vaskulogenese und Angiogenese. Als Vaskulogenese wird die embryonale Entwicklung von Gefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen bezeichnet. Diese ist jedoch zum Teil auch in Tumoren nachweisbar [46]. Die Angiogenese oder auch Neoangiogenese bezeichnet hingegen die Bildung von Blutgefäßen aus dem bereits bestehenden Gefäßbett. Dies geschieht entweder durch Sprossung von Endothelzellen aus einem bestehenden Gefäß oder durch Intussuszeption, der Teilung eines bereits vorhandenen Gefäßlumens durch einwachsende Säulen des interstitiellen Gewebes.

Wichtig ist, dass sich die neugebildeten Gefäße und die Gefäßarchitektur in soliden Tumoren generell vom Normalgewebe unterscheiden. So sind neugebildete Tumorgefäße in vielerlei Hinsicht strukturell und funktionell anormal. Es treten z. B. gehäuft blind endende Kapillarsprossen und arterio-venöse Shunts auf, die Basalmembran kann irregulär und die Gefäße können undicht sein [54]. Diese Abnormitäten können zu irregulärem Blutfluss und damit zu interstitiellem Hochdruck, Hypoxie und Störungen des Metabolismus führen.

In verschiedensten Neoplasien konnte ein Zusammenhang zwischen Tumorangiogenese unter Berücksichtigung von morphologischen (MVD, Gefäßmuster) wie auch biologischen (Expression von angiogenen Faktoren) Aspekten und der Prognose von Patienten dargestellt werden [47, 55-59].

### **2.5.2 Quantitative Erfassung der Angiogenese**

Zur Quantifizierung der Angiogenese wurden verschiedene Verfahren entwickelt, darunter die Mikrogefäßdichte (Microvessel-Density = MVD), die „total vascular area“ (TVA) sowie unterschiedlichste größen- und formabhängige Parameter zur Ausmessung von Gefäßen (Längs- und Querdurchmesser, Umfang etc.).

Die Bestimmung der MVD, als zur Zeit am weitesten verbreiteter Methode, erfasst die Anzahl vorhandener bzw. gefärbter Mikrogefäße in einem Gewebeausschnitt von definierter Größe. Allerdings gibt es noch keinen einheitlichen Standard zur Erfassung der MVD. Meist werden mehrere Areale ausgezählt und der Mittelwert der MVD für weitere Berechnungen verwendet. Verschiedene Marker wurden zur Darstellung der Mikrogefäße verwendet, darunter sogenannte panendotheliale Marker wie Faktor VIII, von Willebrandt Faktor (vWF), CD31 und CD34, neuerdings aber auch angiogenese-assoziierte Marker wie CD105. Dabei zeigen die einzelnen Marker zum Teil große Unterschiede im Färbeverhalten.

In einer Pilotstudie zeigten Weidner et al. 1991, dass die Tumor-MVD in invasiven Mammakarzinomen ein unabhängiger prognostischer Marker für aggressives Verhalten ist [47]. Viele Studien mit ähnlichen Ergebnissen in unterschiedlichsten Tumoren folgten, sodass die MVD heutzutage als (teilweise sogar unabhängiger prognostischer) Indikator für aggressives Tumorstadium und Metastasierung und somit das Überleben des Patienten gilt [60]. Allerdings gibt es auch Brustkrebs-Studien, in denen multivariate Analysen keine oder sogar negative Korrelationen zwischen MVD und Prognose ergeben haben [61, 62].

### **2.5.3 Anti-angiogene Strategien, „vascular targeting“ und „molecular imaging“**

1971 postulierte Folkman die These, dass das Wachstum solider Tumoren von der Bildung neuer Blutgefäße abhängig und somit durch eine anti-angiogene Therapie hemmbar sei [48].

Seitdem gelten anti-angiogene Therapien und „vascular targeting“ als attraktive und vielversprechende Therapieansätze und sind deshalb Gegenstand vieler Forschungsarbeiten.

Anti-angiogene Therapien sollen die Bildung neuer Gefäße verhindern. Dies kann einerseits über die Inhibition pro-angiogener Faktoren (z. B. VEGF) oder andererseits über den Einsatz endogener anti-angiogener Faktoren (z. B. Endostatin, Angiostatin) geschehen [63]. Verschiedene Inhibitoren der Angiogenese werden bereits in klinischen Studien getestet [64, 65].

Von dem anti-angiogenen Therapieansatz abgegrenzt werden sollte das „vascular targeting“, das Zerstören bereits vorhandener Gefäßstrukturen in Tumoren mittels konjugierter, gegen Tumor-endothelien gerichteter AK [66]. Verschiedene Marker für ruhende, aktivierte und/oder proliferierende Endothelien sind zurzeit bezüglich ihres Einsatzes in der antikörper-basierten Therapie Gegenstand der Forschung [67, 68].

Zusätzlich zur Therapie kann der gleiche Ansatz natürlich auch zur Diagnostik, z. B. durch den Einsatz radio- oder fluoreszenz-markierter Antikörper, genutzt werden. Die Einsatzmöglichkeit eines Angiogenesemarkers, hier CD105, zur Frühdiagnostik des DCIS soll in dieser Arbeit überprüft werden. Die Notwendigkeit dafür ergibt sich aus der Dunkelziffer okkulten bzw. zu spät detektierter DCIS und den sich daraus ergebenden Komplikationen.



#### 2.5.4 DCIS und Angiogenese

Im DCIS werden zwei verschiedene Gefäßmuster beschrieben. Das erste umfasst die kleinen Gefäße im Stroma zwischen betroffenen Gangabschnitten, das zweite einen Ring kleinster Gefäße, die der Basalmembran betroffener Gangabschnitte direkt anliegen („necklace phenomenon“, „cuffing phenomenon“ oder „vascular rim“ = Ring-Phänomen) [69-71]. Das Vorhandensein dieser zwei Muster ruft die Vermutung hervor, dass die Angiogenese in Mammakarzinomen von zwei verschiedenen Wegen mit jeweils unterschiedlichen angiogenen Faktoren kontrolliert wird. So könnte das erste Muster durch Freisetzung angiogener Faktoren von akzessorischen Zellen entstehen, während das zweite Muster direkt durch Freisetzung angiogener Faktoren aus Tumorzellen entsteht [71].

Beide Gefäßmuster können durch Bestimmung der Gefäßdichte quantifiziert werden. Dabei wird die Gefäßdichte im Stroma (erstes Muster) in dieser Arbeit durchgängig als MVD bezeichnet, während das Ring-Phänomen (zweites Muster) durch die Necklace-Vessel-Density (Necklace-VD) quantifiziert wird.

Bis jetzt konnten im DCIS verschiedene angiogeneseassoziierte molekulare Veränderungen nachgewiesen werden. Dazu zählen unter anderem der Nachweis einer Erhöhung der VEGF-Expression in Tumorzellen sowie der endothelialen Expression der VEGF-Rezeptoren kombiniert mit erhöhten TSP-1-Leveln im umgebenden Stroma [72]. Der Verlust des Angiogenese-Inhibitors TSP-1 im DCIS-Stroma ist mit dem comedo-type DCIS assoziiert, während beim DCIS mit nur minimaler Nekrose noch TSP-1 im Stroma nachweisbar ist [73]. Außerdem korreliert eine Hochregulation der COX-2 mit einem aggressiverem Phänotyp [74]. Untersuchungen zur CD105-Expression im DCIS liegen noch nicht vor.

## 2.6 CD105

### 2.6.1 Struktur und Expression

Synonym: Endoglin

CD105 ist ein homodimeres 180 kDa Transmembran-Glykoprotein, das hauptsächlich auf proliferierenden, „aktivierten“ Endothelzellen in angiogenen Geweben, wie Entzündungsherden, Wundheilungsprozessen und Neoplasien, exprimiert wird, während es in Gefäßen des Normalgewebes kaum nachweisbar ist [75-79]. Es besteht aus zwei 95-kDa-Untereinheiten, die über Disulfidbrücken verbunden sind [80].

Hohe CD105-Level sind außer in angiogenen Blutgefäßen auch im Synzytiotrophoblasten der Plazenta nachweisbar [81]. Des Weiteren findet sich eine schwache CD105-Expression auf verschiedensten Zellen nicht epithelialen Ursprungs, unter anderem auf hämatopoetischen Progenitorzellen [82-85], Melanozyten [86], Fibroblasten [80, 84], Stromazellen [83], glatten Muskelzellen der Gefäße [87], Makrophagen [82, 88] sowie Mesangiumzellen [89]. CD105 ist nicht bzw. kaum auf lymphatischen Endothelzellen nachweisbar [90].

In soliden Tumoren wird CD105 fast ausschließlich auf Blutgefäßendothelien im Tumorzentrum bzw. angrenzendem Gewebe exprimiert [76, 77]. Gelegentlich färben mAK gegen CD105 auch in schwacher Intensität das Zytoplasma von neoplastischen Zellen in Sarkomen [91], Ovarial- [92] und Mammakarzinomen [93].

In hämatopoetischen Tumoren wird CD105 vor allem auf stammzellabhängigen Tumoren exprimiert [94].

### 2.6.2 Funktion und Modulation

Viele Untersuchungsergebnisse deuten daraufhin, dass CD105 eine wichtige Rolle in der Regulation der Angiogenese spielt. So sterben z. B. CD105-knockout-Mäuse bereits während der frühen Gestationsphase an einer defekten Gefäßentwicklung [95]. In CD105-haploinsuffizienten Mäusen, in denen stark vaskularisierte Tumoren induziert wurden, zeigte sich im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe unter anderem eine signifikante Reduktion von Tumormasse, MVD und Hämoglobin [96]. Außerdem sind Mutationen im CD105-Gen mit der Hereditären Hämorrhagischen Teleangiektasie Typ 1 assoziiert, einer autosomal-dominant vererbten Gefäßerkrankung, die mit arterio-venösen Fehlbildungen und häufigen Blutungen einhergeht [97, 98].

Zusammen mit der Erkenntnis, dass die CD105-Expression in vielen Tumorgeweben und Entzündungsgeweben im Vergleich zu Normalgeweben erhöht ist, lassen diese Ergebnisse eine wichtige Rolle von CD105 für die Angiogenese vermuten. Die genauen Funktionen von CD105 sind dabei jedoch noch unklar.

CD105 ist Bestandteil des TGF- $\beta$ -Rezeptor-Komplexes [99, 100], einem pleiotropen Zytokin, das verschiedenste Zellfunktionen einschließlich Proliferation, Differentiation, Migration, Synthese von extrazellulärer Matrix und Hämatopoese moduliert und auch in Angiogenese und Wundheilung involviert ist [101-103]. Dabei bindet CD105 TGF- $\beta$ 1 und - $\beta$ 3 (nicht jedoch TGF- $\beta$ 2) [99, 100, 104]. Interessanterweise binden nur etwa 1 % der nachweisbaren CD105-Moleküle auf Endothelzellen TGF- $\beta$  [99].

Dabei bleibt die genaue Rolle von CD105 in der TGF- $\beta$ -Signalkette unklar, jedoch scheint eine Überexpression verschiedene zelluläre Antworten auf TGF- $\beta$  zu modulieren. So antagonisiert die Überexpression von CD105 verschiedenste zelluläre Antworten auf TGF- $\beta$ 1, wie z. B. dessen anti-proliferative und pro-apoptotische Wirkung, während seine Herabregulierung die Wirkung von TGF- $\beta$ 1 potenziert [89, 104-107].

Vermutlich dient CD105 auch als Ligand für weitere Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie [100] sowie für Integrine [82, 108]. Neuere Untersuchungen lassen zusätzliche Funktionen von CD105, u. a. in der Zellmigration [89, 109, 110] und der NO-abhängigen Vasodilatation [111], vermuten.

Verschiedenste Umweltfaktoren und Zytokine, die in die Angiogenese involviert sind, modulieren die CD105-Expression. Die Level von Protein, mRNA und Promoteraktivität werden unter Hypoxie durch den HIF-1-Komplex [112] und durch TGF- $\beta$ 1 [105, 112-114] herauf reguliert, wobei beide Faktoren bei der Induktion der CD105-Expression auf der Transkriptionsebene kooperieren.

### **2.6.3 Einsatz von CD105 in Diagnostik, Prognostik und Therapie**

CD105 hat ein großes diagnostisches, prognostisches und therapeutisches Potential.

In verschiedensten Untersuchungen hat sich gezeigt, dass die immunhistochemisch bestimmte CD105-MVD in verschiedensten soliden und hämatopoetischen Neoplasien mit Tumorstadium, Metastasierung und auch Prognose korreliert. So konnte z. B. für Mammakarzinome eine negative Korrelation zwischen der CD105-MVD und dem „disease free survival“ bzw. dem „overall survival“ gezeigt werden [55, 115-117].

In Mammakarzinomen stellte sich die CD105-MVD als unabhängiger prognostischer Parameter dar [116, 117]. Für das Kolonkarzinom konnte eine Erhöhung der CD105-MVD während der Tumor-Progression in der Adenom-Karzinom-Sequenz gezeigt werden [118]. Auch für Prostata- (Korrelation mit Gleason-Score) [119], Zervix- [120] und das Nicht-kleinzellige-Bronchialkarzinom [121] sowie für das Multiple Myelom [122], die Haarzell-Leukämie [123], Glioblastome [124] und Astrozytome [125] wurde die überragende Bedeutung der CD105-MVD-Bestimmung und ihre Assoziation mit der Prognose bestätigt. In einer Studie an Mammakarzinom-Patientinnen zeigte sich außerdem eine Korrelation zwischen der CD105-MVD vor Therapiebeginn und dem Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie, wobei eine niedrigere CD105-MVD mit einem höheren Therapieerfolg assoziiert war [126].

In verschiedensten Studien konnte inzwischen auch die prognostische Überlegenheit von CD105 gegenüber Panendothelmarkern wie CD34, CD31, von Willebrandt Faktor etc. gezeigt werden [55, 75, 78, 81, 120, 121, 127, 128].

Sowohl in gesunden Individuen als auch in Krebspatienten ist eine lösliche Form von CD105, das sogenannte sCD105 („soluble CD105“) nachweisbar. Erhöhte Plasma- bzw. Serumlevel von sCD105 sind in Patienten mit soliden [129, 130] und hämatopoetischen [131] Neoplasien nachgewiesen worden. Hohe Mengen an sCD105 wurden außerdem in Patienten mit metastasierten Mamma- und Kolonkarzinomen (im Vergleich zu nicht metastasierten Karzinomen) und in Patienten, die keine Chemotherapie erhielten, nachgewiesen [130]. Somit besteht die Möglichkeit, den sCD105-Spiegel zur Überwachung von Tumorpatienten einzusetzen.

Die Identifikation von CD105 als angiogenesespezifischen Endothelzellmarker zog Untersuchungen hinsichtlich des möglichen Einsatzes als diagnostisches und therapeutisches Werkzeug nach sich. So wurden bereits radio-markierte mAK gegen CD105 effektiv und sicher zur Darstellung von soliden Neoplasien in verschiedenen Tiermodellen verwendet [93, 132].

Erste Erfolge gibt es auch beim Einsatz von (radio- oder immunotoxin-markierten bzw. unkonjugierten) mAK gegen CD105 zur Proliferationshemmung von Endothelzellen *in vitro* [128, 133, 134] sowie zur Therapie von soliden Tumoren. So konnte in verschiedenen *in-vitro*- und auch *in-vivo*-Modellen eine Reduktion des Tumorwachstums erreicht werden [135-141].

Ein weiterer Therapieansatz ist die Nutzung von CD105 als „Transporter“ u. a. für den therapeutischen Gen-Transfer [142].

## 2.7 CD31

### 2.7.1 Struktur und Expression

Synonym: „platelet endothelial cell adhesion molecule 1“ (PECAM-1)

CD31 ist ein Einketten-Transmembranprotein vom Typ I mit einer relativen Molekülmasse von 135 kDa. Es gehört zur Superfamilie der Immunglobuline und enthält sechs immunglobulin-ähnliche Domänen, eine kurze transmembranöse Domäne und einen langen zytoplasmatischen Schwanz, welcher über Phosphorylierung mit Phosphatasen und Kinasen interagieren kann. CD31 geht sowohl homophile (CD31-CD31) als auch heterophile (CD31-X) Bindungen mit anderen Oberflächen- und Matrixproteinen ein [143]. CD31 wird vor allem auf kontinuierlichen Endothelien von großen und kleinen Blutgefäßen exprimiert, wobei es hauptsächlich an den Verbindungsstellen (Junctionen) zwischen den Endothelzellen nachweisbar ist. Zusätzlich wird es diffus auf den Oberflächen von Thrombozyten, Monozyten und vielen Leukozyten sowie in einigen Tumorzelllinien exprimiert [143-146]. Dagegen scheint CD31 nicht in Lymphgefäßen exprimiert zu werden [147].

CD31 gilt als einer der besten Marker für benigne und maligne vaskuläre Tumoren. Auch in vielen soliden Tumoren wird CD31 als sogenannter Panendothelmarker zur immunhistochemischen Quantifizierung der Angiogenese mittels MVD-Bestimmung eingesetzt. Beispielsweise konnte in Mammakarzinomen in vielen Studien ein Zusammenhang zwischen hoher CD31-MVD und schlechter Prognose nachgewiesen werden [47, 148-154]. Allerdings gibt es auch einige Studien, die keinen Zusammenhang feststellen konnten [155-157].

### 2.7.2 Funktion und Modulation

CD31 spielt eine wichtige Rolle bei interaktiven Adhäsionen zwischen benachbarten Endothelzellen sowie zwischen Endothelzellen und Leukozyten.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass CD31 allerdings nicht nur als Adhäsionsmolekül von Bedeutung ist, sondern auch in verschiedenste andere Signalwege eingreift und so z. B. als Signalrezeptor auf Leukozyten agiert.

So reguliert CD31 insgesamt eine Vielzahl von Funktionen einschließlich der Rekrutierung von Leukozyten in entzündliches Gewebe [158], der Vaskulogenese [159], der Angiogenese [160] sowie der Regulierung von Monozyten, polymorphkernigen Neutrophilen und der T-Zell-Aktivierung [161, 162]. Außerdem kann es den Erhalt der Adhärens-Junctions-Integrität und -Permeabilität sowie die Organisation des Zytoskeletts regulieren und die Transkription von Molekülen beeinflussen.

Im Gegensatz zur Leukozytenmigration bleibt die Funktion von CD31 in Tumorzellen noch unklar. Bereits in mehreren Untersuchungen wurde in Zellkulturen eine CD31-Expression auf der Oberfläche von Tumorzellen nachgewiesen [145, 146, 163]. Auch in einigen Fällen von high-grade DCIS mit invasiver Komponente sowie einigen reinen invasiv ductalen Karzinomen (IDC) Grad 3 wurde CD31 in den Tumorzellen nachgewiesen [164]. Es wird vermutet, dass CD31 in Tumorzellen nicht nur an der Zelladhäsion sondern auch an verschiedenen Signalwegen zur Modulation von Tumorzell-Proliferation und -Apoptose beteiligt ist [145, 146, 165, 166].

Es wurden einige Faktoren beschrieben, die die CD31-Expression auf Endothelzellen modulieren können. Dazu zählen unter anderem Hypoxie, Thrombospondin-1, Zytokine ( u. a. TNF- $\alpha$ ) sowie Bestrahlung [143, 167].

## 2.8 Anforderungen an diagnostische Tests

Die Güte eines diagnostischen Tests wird von mehreren Kriterien bestimmt. Dabei beschreibt die Validität (Richtigkeit) das Ausmaß der Übereinstimmung der Testergebnisse mit dem tatsächlich gegebenen Sachverhalt. Diese wird insbesondere durch die zwei Parameter Sensitivität und Spezifität beschrieben. Dabei bezeichnet die **Sensitivität** (Richtigpositivrate) eines statistischen Tests die Wahrscheinlichkeit, einen tatsächlich positiven Sachverhalt, auch durch ein positives Testergebnis zu erkennen. Bezogen auf einen diagnostischen Test gibt sie den Anteil der mit dem fraglichen Test richtig als krank erkannten Kranken an der Gesamtzahl Kranker an. Die **Spezifität** (Richtignegativrate) hingegen gibt die Wahrscheinlichkeit an, einen tatsächlich negativen Sachverhalt auch durch ein negatives Testergebnis zu erkennen, d. h. Gesunde durch ein negatives Testergebnis auch als solche zu erkennen. In der Praxis erreichen in der Regel niemals beide Validitätsmaße gleichzeitig 100 %, sondern die Zunahme des einen Maßes zieht die Abnahme des anderen Maßes nach sich, d. h. sie zeigen ein gegenläufiges Verhalten. Die Beziehung zwischen Sensitivität und Spezifität wird durch die sogenannte ROC-Kurve wiedergegeben (Ordinate: Sensitivität; Abszisse: 1-Spezifität). Unterschiedliche Punkte auf der ROC-Kurve kennzeichnen eine bestimmte Relation beider Maße, entsprechend verschiedener sogenannter Cut-Off-Punkte. Der Cut-Off-Punkt sollte so gewählt werden, dass er einen bestmöglichen Kompromiss zwischen beiden Werten darstellt und an die jeweiligen Anforderungen des Tests angepasst ist. So sollte z. B. ein Screeningtest eine hohe Sensitivität aufweisen, um möglichst wenige Erkrankte zu übersehen. Daran sollten sich dann Tests mit möglichst hoher Spezifität anschließen, um gesunden Patienten unnötige Therapien zu ersparen.

In dieser Arbeit soll eine erste Einschätzung von Sensitivität und Spezifität von CD105 zur DCIS-Detektion vorgenommen werden, um die Grundlage für den Einsatz von CD105 zur molekularen Bildgebung des DCIS zu schaffen. Dabei soll die Sensitivität durch Bestimmung des Anteils der CD105-positiven DCIS an der Gesamt-DCIS-Anzahl und die Spezifität durch die Einbeziehung häufiger Differentialdiagnosen des DCIS (benigne Mamma-Läsionen und invasive Mammakarzinome) abgeschätzt werden und dadurch u. a. erste Hinweise auf die Höhe der Falschpositivrate erhalten werden.

### 3 HERLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG

Das Mammakarzinom ist die häufigste bösartige Krebserkrankung der Frau. Wichtigster prognostischer Faktor ist die Früherkennung, diese ist jedoch nur begrenzt effektiv. So muss zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schon häufig von einer generalisierten Erkrankung ausgegangen werden. Einen neueren Ansatz zur Verbesserung der Prognose bietet nicht die Früherkennung des Mammakarzinoms selbst, sondern die seiner präinvasiven Vorstufen. Das Ductale Carcinoma In Situ (DCIS) der Mamma gilt als solch eine Vorläuferläsion. Die *in-vivo*-Immunfluoreszenz ist eine Methode zur Diagnostik maligner Tumoren, deren Einsatz u. a. auch beim DCIS einen vielversprechenden neuen Ansatz bietet. Dafür sind jedoch geeignete Marker notwendig. CD105 als angiogenese-assoziiertes Endothelmarker ist ein potentieller Marker. Insbesondere in invasiven Mammakarzinomen ist dieses Molekül sehr genau untersucht und u. a. als unabhängiger prognostischer Faktor bestätigt worden. Ergebnisse bezüglich der CD105-Expression im DCIS existieren jedoch nicht.

Ziel der hier vorgelegten Arbeit ist daher die immunhistochemische Darstellung von CD105 im DCIS, um die Basis für eine immunfluoreszenzbasierte *in-vivo*-Detektionsmethode des DCIS zu schaffen. Die wichtigste Fragestellung hierbei ist, ob CD105 im DCIS immunhistochemisch nachweisbar ist. Durch den Vergleich der CD105-Expression im DCIS mit der in anderen Mammageweben, wie Normalgeweben, benignen Mamma-Läsionen (Adenosen, Fibroadenome, Papillome) und invasiv ductalen Mammakarzinomen (IDC) soll anschließend überprüft werden, ob sich die CD105-Expression im DCIS signifikant von der in den anderen Mammageweben unterscheidet und somit eine differenzierte Darstellung des DCIS in der Immunfluoreszenz mittels CD105 möglich ist.

Zusätzlich soll eine differenzierte Untersuchung auf Unterschiede der CD105-Expression in den einzelnen DCIS-Kerngraden (Nuclear Grade 1-3) sowie in den Subtypen comedo und non-comedo DCIS erfolgen, um eventuell Schlussfolgerungen hinsichtlich der Mamma-Karzinogenese zu ziehen.



Ein weiterer Schwerpunkt liegt in dem Vergleich der CD105-Expression im DCIS mit der Expression im invasiv ductalen Karzinom (IDC). Unter der Annahme, dass die Mamma-Karzinogenese möglicherweise ausgehend vom Normalgewebe über DCIS zum IDC verläuft, soll hier überprüft werden, ob auch die CD105-Expression, also die angiogene Aktivität, innerhalb der hier angenommenen Karzinogenese-Sequenz

*Normalgewebe → DCIS → intraductale IDC-Komponente → invasive IDC-Komponente*  
signifikant ansteigt.

Ein zusätzliches Ziel ist die Bewertung des Einsatzes eines Tissue-Microarrays (TMA) zur immunhistochemischen Quantifizierung der Angiogenese im DCIS, da dadurch der Aufwand immunhistochemischer Färbungen erheblich reduziert werden könnte.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es somit, CD105 an humanen DCIS-Gewebeschnitten immunhistochemisch nachzuweisen, durch Bestimmung der Microvessel-Density (MVD; Stromagefäßdichte), der Necklace-Vessel-Density (Necklace-VD; Ringgefäßdichte) sowie der Färbeintensität (FI) zu quantifizieren und diese Ergebnisse mit zusätzlich untersuchten Mammageweben (Normalgewebe, benigne Mamma-Läsionen, invasive Mammakarzinome) zu vergleichen. Zusätzlich sollen zum Vergleich an allen untersuchten Geweben parallel auch immunhistochemische Färbungen von CD31, einem Panendothelmarker, über den bereits viele Untersuchungen am DCIS vorliegen, durchgeführt werden.

## **4 MATERIAL UND METHODEN**

### **4.1 Grundlagen der Immunhistochemie**

#### **4.1.1 Prinzip**

Aufgabe der Immunhistochemie ist die Darstellung molekularer Strukturen in histologischen Gewebeschnitten. Dies wird mit Hilfe von gegen diese Strukturen (Antigene) gerichteten Antikörpern erreicht. Diese können entweder direkt mit einem Farbstoff markiert sein oder an Enzyme gekoppelt sein, die eine zuerst farblose Substrat-Chromogen-Lösung in farbige Produkte aufspalten. Es wurden inzwischen verschiedenste Methoden mit unterschiedlich hoher Anzahl von Zwischenschritten (Sekundär-, Tertiärantikörper etc.) entwickelt. Auch die In-Situ-Hybridisierung, bei der Nukleinsäuren als Sonden zur Untersuchung von biologischen Materialien eingesetzt werden, zählt zur Immunhistochemie.

Es existiert eine Vielzahl von unterschiedlichen Detektionssystemen, die auch je nach Hersteller variieren. Dazu gehören u. a. Avidin-Biotin-Methoden, CSA-Methodik, LSAB-Methodik und die Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Methodik. Im Folgenden soll nur kurz auf die beiden Methoden, die in den letztendlichen Färbeprotokollen zur Anwendung gekommen sind, eingegangen werden.

#### **4.1.2 Avidin-Biotin-Methode**

Diese sogenannte ABC-Methode ist eine der am häufigsten benutzten Verfahren der Immunhistochemie und basiert auf der hohen Spezifität und Bindungsaffinität von Avidin (Hühner-eiweiß) für das Vitamin Biotin. Die Verwendung von Biotin bietet den Vorteil, dass fast alle Proteine (Antikörper sowie Enzyme) mit Biotin-Molekülen konjugiert werden können. Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt in der hohen Sensitivität. Die grundsätzliche Abfolge der Reagenzien lautet: unkonjugierter Primärantikörper, biotinmarkierter (biotinylierter) Sekundärantikörper, Avidin-Biotin-Enzymkomplex. Die Färbung schließt mit einer Substrat-Chromogen-Lösung ab.

### **4.1.3 ABC-Methode mit Tyramid-Signalverstärkung (CSA)**

Die sogenannte CSA-Methode („catalysed signal amplification“) basiert auf der ABC-Methode, wobei nach der Inkubation mit dem Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex ein spezielles Amplifikationsreagenz zwischengeschaltet wird. Dieses Reagenz enthält ein biotinhaltiges Substrat (Biotinyl-Tyramid), das durch die gebundene Peroxidase katalytisch in eine reaktive und schließlich unlösliche Form überführt wird („Präzipitation“ bzw. Ablagerung von Biotin). Das abgelagerte Biotin vermittelt im folgenden Schritt die Bindung von peroxidase markiertem Streptavidin (Streptavidin-HRP-Konjugat), wodurch zusätzliche Enzymmoleküle abgelagert werden. Diese Methode ist noch einmal deutlich sensitiver als herkömmliche ABC-Methoden.

### **4.1.4 Antigen-Demaskierungs-Methoden**

In Formalin fixiertes und Paraffin eingebettetes (FFPE-) Gewebe zeichnet sich zwar durch eine gute Haltbarkeit und guten Erhalt der morphologischen Strukturen aus, jedoch kommt es während der Fixierung an formalinsensitiven Epitopen zu einer Bildung von sogenannten „crosslinks“ (Konformationsänderungen), die zu einer „Maskierung“ des entsprechenden Antigens bzw. Epitops führen. Verfahren zur Demaskierung der Epitope umfassen die proteolytische Andauung mit Enzymen (z. B. Trypsin, Chymotrypsin, Pronase, Pepsin) sowie das Erhitzen des Gewebes in speziellen Pufferlösungen (sogenannte „retrieval-solutions“). Der tatsächliche Wirkmechanismus ist dabei weitgehend ungeklärt.

## 4.2 Histologisches Material

Das Gewebe für die immunhistochemischen Untersuchungen stammt aus dem Archiv der Robert-Rössle-Klinik der Charité Berlin, Campus Buch. Über die Tumorbank der Klinik wurden alle reinen DCIS aus den Jahren 1984 bis 2004 ermittelt, insgesamt 51 Fälle. Die Vergleichsgewebe stammen aus den Jahren 1995 bis 2003. Es wurden ausschließlich in Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE-) Gewebe verwendet.

Zunächst wurden von allen Geweben mittels eines Automaten Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbungen) angefertigt. Diese wurden anschließend von einem Pathologen begutachtet und gegebenenfalls reevaluiert. Von den 51 ermittelten DCIS-Fällen konnten letztendlich 38 DCIS in die Untersuchung eingeschlossen werden. In den restlichen Fällen war entweder kein DCIS mehr in den Gewebelöcken nachweisbar oder es handelte sich um andere Gewebe, wie z. B. invasive Karzinome. Für alle ermittelten DCIS erfolgte anschließend die Bestimmung repräsentativer Gewebelöcke und eine Einteilung in die Kerngrade NG1 bis NG3 sowie in die Subtypen comedo und non-comedo DCIS. Dabei ergab sich, dass alle comedo-DCIS dem Kerngrad 3 entsprachen, während alle non-comedo DCIS den Kerngrad 1 oder 2 aufwiesen. In einem DCIS-Präparat war kein korrespondierendes Normalgewebe nachweisbar, sodass den 38 DCIS 37 Normalgewebe gegenüberstanden. Eine Übersicht über verwendete Gewebe und Anzahl der Präparate zeigt die folgende Tabelle.

Tabelle 2: Übersicht über Art und Anzahl der verwendeten Gewebepräparate

Gewebe	Anzahl (Anteil %)
Normalgewebe	37
Reine DCIS	38
davon: NG1	5 (13 %)
NG2	11 (29 %)
NG3	22 (58 %)
Non-comedo	16 (42 %)
Comedo	22 (58 %)
IDC mit DCIS-Komponente	25
Adenosen	10
Fibroadenome	19
Papillome	8

Zusätzlich wurde ein Tissue Microarray (TMA) mit Stanzproben von 28 der 38 untersuchten DCIS in die Untersuchungen mit eingeschlossen.

### 4.3 Immunhistochemie

#### 4.3.1 Verwendete Antikörper

Für die Darstellung von **CD105** wurde ein monoklonaler, aus der Maus stammender und gegen humanes Gewebe gerichteter Antikörper gegen CD105 (Klon SN6h) von DakoCytomation in einer Verdünnung von 1:1000 (entsprechend 0,292 µg/ml) verwendet.

Für die Darstellung von **CD31** wurde ein monoklonaler, aus der Maus stammender und gegen humane Endothelzellen gerichteter anti-CD31-Antikörper (Klon JC70A) ebenfalls von DakoCytomation in einer Antikörper-Verdünnung von 1:50 verwendet.

#### 4.3.2 Vorbereitung des histologischen Materials

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an FFPE-Material vorgenommen, das am Mikrotom in 1 µm dünne Schichten geschnitten, auf Objektträger aufgebracht und anschließend 10 min bei 60 °C getrocknet wurde. Vor Beginn der eigentlichen Färbungen wurden die Gewebeschnitte 3 x 10 min in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (je 2 x 2 min in Isopropanol, 96 %igem und 70 %igem Ethanol) sowie 2 x 2 min in Aqua dest. und 2 min in TBS (CD105) bzw. PBS (CD31) rehydriert. Um ein Austrocknen der Gewebeschnitte zu verhindern, erfolgten alle folgenden Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer.

#### 4.3.3 Herstellung der verwendeten Lösungen

Citratpuffer: 3,782 g Zitronensäure + 24,11 g Natriumcitrat auf 10 l Aqua dest. (pH 6,0)

PBS: 80,0 g NaCl + 2,0 g KCl + 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
auf 10 l Aqua dest., Einstellung mit HCl auf pH 7,4

TBS: 9,0 g Tris Base + 68,5 g Tris-HCl + 87,8 g NaCl auf 10 l Aqua dest.  
(pH 7,4 - 7,6)

TBS/Tween: 6 g NaCl + 1 ml Tween 20 auf 1 l TBS

#### 4.3.4 Erarbeitung der Färbeprotokolle

Zur Austestung wurden Paraffinschnitte von invasiven Mammakarzinomen benutzt, da sie sowohl bei der Darstellung von CD105 als auch von CD31 eine stark positive Reaktion erwarten ließen. Zur Bestimmung der besten Färbemethode wurde bei beiden Antikörpern nach der gleichen Methode vorgegangen. Jeder Antikörper wurde erstens in verschiedenen Färbemethoden (Immunfluoreszenz, ABC-Methodik, Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Methodik, CSA-Methodik, LSAB-Methodik), zweitens mit verschiedenen Antigen-Demaskierungs-Methoden (keine Antigen-Demaskierung, proteolytische Andauung mit Pronase bzw. Trypsin, hitzeinduzierte Demaskierung durch Erhitzen der Schnitte in Citratpuffer, pH=6) sowie drittens in verschiedenen Konzentrationen (Antikörper-Verdünnung 1:10, 1:100, 1:200 bzw. 1:500 und 1:1000 in CSA-Methodik) getestet. Dabei wurden bei jeder Färbung Negativkontrollen durch Auslassen des Primärantikörpers mitgeführt, um unspezifische Anfärbungen sowie Hintergrundfärbungen zu erkennen bzw. auszuschließen.

Das beste Färbeergebnis für CD105 wurde im DAKO-CSA-System ohne vorherige Antigen-Demaskierung mit einer Verdünnung des Primär-Antikörpers von 1:1000 erreicht. Für CD31 erwies sich die Anfärbung mit Hilfe des Elite-ABC-Kits von DAKO (Avidin-Biotin-Methode) und einer Primärantikörper-Verdünnung von 1:50 nach vorherigem Erhitzen des Gewebes in Citratpuffer als beste Methode.

#### 4.3.5 Färbeprotokoll CD105

Für die Darstellung von CD105 wurde ein monoklonaler, aus der Maus stammender und gegen humanes Gewebe gerichteter, AK gegen CD105 (Klon SN6h) von DakoCytomation in einer Verdünnung von 1:1000 (entsprechend 0,292 µg/ml) verwendet. Die Färbung erfolgte mit Hilfe des CSA-Systems (ebenfalls DakoCytomation). Eine Antigen-Demaskierung war nicht notwendig.

Bei jeder Färbung wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

Vor Beginn der eigentlichen Färbungen wurden die Gewebeschnitte 3 x 10 min in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (je 2 x 2 min in Isopropanol, 96 %igem und 70 %igem Ethanol) sowie 2 x 2 min in Aqua dest. und 2 min in TBS rehydriert. Um ein Austrocknen der Gewebeschnitte zu verhindern, erfolgten alle folgenden Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer.

Um Hintergrundfärbungen zu verringern, wurden im Anschluss an die Rehydrierung ein Avidin- und Biotin-Block (2 x 10 min Inkubation, danach Waschschrift 2 x 3 min TBS), ein Peroxidase-Block (5 min Inkubation, anschließendes Abspülen unter Leitungswasser und 5 min Waschen in TBS) und ein Protein-Block (5 min Inkubation, kein Waschschrift nur Abschlagen) durchgeführt.

Darauf folgten die eigentlichen Färbeschritte, zwischen denen jeweils ein Waschschrift (Spülen mit TBS/Tween, 2 x 3 min Waschen in TBS und 2 min Waschen in TBS/Tween) durchgeführt wurde: 30 min Inkubation mit dem Primärantikörper 1:1000 in Antibody-Diluent, 15 min Inkubation mit dem Brücken-Antikörper, 15 min Inkubation mit dem Streptavidin-Biotin-Komplexes, 15 min Inkubation mit dem Amplifikationsreagenz, 15 min Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase, 5 min Inkubation mit Substrat-Chromogen-Lösung, Spülen mit Leitungswasser. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit saurer Hämalanlösung und die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Roticlear. Zum Schluss erfolgte das Eindecken der Gewebeschnitte.

#### 4.3.6 Färbeprotokoll CD31

Für die Darstellung von CD31 wurde ein aus der Maus stammender und gegen humane Endothelzellen gerichteter anti-CD31-Antikörper, Klon JC70A von DakoCytomation verwendet. Die Färbung erfolgte mit Hilfe des Vectastain Elite-ABC-Kits in einer Antikörper-Verdünnung von 1:50.

Bei jeder Färbung wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

Vor Beginn der eigentlichen Färbungen wurden die Gewebeschnitte 3 x 10 min in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (je 2 x 2 min in Isopropanol, 96 %igem und 70 %igem Ethanol) sowie 2 x 2 min in Aqua dest. und 2 min in PBS rehydriert.

Zur Antigen-Demaskierung wurden die Gewebeschnitte in Citratpuffer (pH 6,0) für 5 min im Schnellkochtopf gekocht und nach 15 min Abkühlzeit bei Raumtemperatur 3 x 2 min in PBS gewaschen.

Um ein Austrocknen der Gewebeschnitte zu verhindern, erfolgten alle folgenden Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer.

Zur Reduzierung der Hintergrundfärbung erfolgten ein Peroxidase-Block (5 min Inkubation mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, anschließend Spülen mit Leitungswasser, 5 min Waschen in PBS), ein Avidin- und Biotin-Block (2 x 10 min Inkubation, anschließend 5 min Waschen in PBS) sowie ein Block mit Normalserum (20 min Inkubation, kein Waschschrift nur Abschlagen).

Anschließend folgten die eigentlichen Färbeschritte, dazwischen wurde jeweils ein Waschschrift (Abspülen mit PBS, 5 min Waschen in PBS) durchgeführt: 60 min Inkubation mit dem Primärantikörper 1:50 in Antibody Diluent, 30 min Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, 30 min Inkubation mit ABC-Reagenz, 10 min Inkubation mit der Peroxidase-Substrat-Lösung (DAB-Lösung = Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid), Spülen mit Leitungswasser. Abschließend erfolgten die Gegenfärbung mit saurer Hämalaunlösung, die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Roticlear sowie das Eindecken der Gewebeschnitte.

Färbungen, bei denen durch das Kochen im Citratpuffer starke Zerstörungen der Präparate auftraten, wurden gegebenenfalls wiederholt.



#### 4.4 Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung erfolgte unter Anleitung eines erfahrenen Pathologen. Um eine Beeinflussung der Auswertung zu vermeiden, erfolgte diese ohne Kenntnis des genauen DCIS-Gradings. Zunächst wurde das qualitative Färbeergebnis beurteilt, wobei auch unspezifische Färbungen und Hintergrundfärbungen analysiert wurden. Anschließend erfolgte die Auswertung von Färbeintensität (FI), Microvessel-Density (MVD) und Necklace-Vessel-Density (Necklace-VD).

Für die **Färbeintensität** wurden die Werte 0 bis 3 vergeben, entsprechend 0 - keine Färbung, 1 - schwache Färbung, 2 - mittelstarke Färbung und 3 - starke Färbung.

Für die **Bestimmung der MVD** wurden analog zu dem von Weidner et al. 1991 [47] eingeführten Verfahren unter dem Mikroskop in der 100fachen Vergrößerung die Gewebeauschnitte mit der höchsten gefärbten Gefäßanzahl („hot spots“) ausgesucht und anschließend in der 400fachen Vergrößerung mindestens in drei Gesichtsfeldern („high-power-fields“, HPF) die Anzahl der positiv-gefärbten Mikrogefäße ausgezählt. Zur besseren Genauigkeit wurde dann der Mittelwert aus den 3 HPFs für weitere Berechnungen herangezogen. Im DCIS-Gewebe wurden nur HPFs ausgezählt, die dem DCIS-Rand direkt anlagen. Jede gefärbte Endothelzelle, einzeln oder im Verbund, die eindeutig von anderen umgebenden Mikrogefäßen, Tumorzellen oder Stromazellen abgrenzbar war, wurde als einzelnes Mikrogefäß in die Auszählung eingeschlossen. Die Definition eines eigenständigen Mikrogefäßes wurde also nicht an das Vorhandensein eines Lumens und/oder von Erythrozyten gebunden. Außerdem wurden keine Größenrestriktionen gesetzt. Um die spätere Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten zu gewährleisten wurde in dieser Arbeit die MVD nicht einfach nur als Anzahl positiver Gefäße pro HPF angegeben, sondern auf die wahre Größe eines HPF (hier: 22,051 mm<sup>2</sup>) bezogen. Somit ergibt sich für die MVD die Einheit „positive Gefäße pro mm<sup>2</sup> Fläche“.

Bisherige Methoden zur **Quantifizierung des Ring-Phänomens** (einem Ring kleinster, der Basalmembran betroffener Gangabschnitte direkt anliegender Gefäße; s. Seite 17) um DCIS und intraductale IDC-Komponenten waren uneinheitlich und für die Fragestellung der Arbeit unzureichend. Deswegen wurde im Verlauf dieser Arbeit eine neue und einfache Methode entwickelt, mit deren Hilfe das Ring-Phänomen als sogenannte Necklace-VD metrisch erfasst werden kann.

Analog zur Bestimmung der MVD wurden dazu in 100facher Vergrößerung die tumorgefüllten Gangabschnitte aufgesucht, die am ausgeprägtesten von gefärbten Ringgefäßen umgeben waren. Anschließend wurde in 400facher Vergrößerung die Anzahl der positiv gefärbten Gefäße, die der Basalmembran tumorgefüllter Gangabschnitte direkt anlagen, bestimmt und in Relation zum Umfang des entsprechenden Gangabschnittes gesetzt.

Der dadurch erhaltenen Quotient „Anzahl positive Gefäße pro mm Umfang“ ergibt als sogenannte Necklace-Vessel-Density (Necklace-VD) eine metrische Größe, die (ähnlich der MVD) für statistische Untersuchungen herangezogen werden kann. Zur Bestimmung des Umfanges wurden die entsprechenden Gangabschnitte photographiert und anschließend mit Hilfe der Software analySIS 5 (Soft Imaging Systems) ausgemessen.

#### **4.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS Version 12. Zunächst wurden eine explorative Datenanalyse und eine deskriptive Statistik durchgeführt um eine Übersicht über Mittelwerte, Standardabweichungen und Mediane der MVD, Necklace-VD, FI sowie der Quotienten CD105/CD31-MVD und CD105/CD31-Necklace-VD in den einzelnen Geweben zu erhalten.

Auf Grund des zum Teil geringen Stichprobenumfanges und der fehlenden Normalverteilung der ermittelten Messwerte wurde bei der weiteren Auswertung auf nichtparametrische Tests zurückgegriffen. Für den Vergleich metrischer Daten, wie etwa der MVD und der Necklace-VD wurde bei zwei unabhängigen Stichproben (Vergleich zwei verschiedener Gewebearten) der Mann-Whitney-Test und bei  $k > 2$  unabhängigen Stichproben (Vergleich von mehr als zwei verschiedenen Gewebearten) der Kruskal-Wallis-Test zur Auswertung herangezogen. Für den Vergleich qualitativer Variablen wie etwa der ordinal skalierten FI, wurden Kreuztabellen und der  $\chi^2$ -Test benutzt. P-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant angesehen. Für Korrelationsanalysen wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman bestimmt. Dabei entsprachen die Werte  $r = 1$  bzw.  $r = -1$  jeweils einer 100 %igen Korrelation.

Ein Schwerpunkt der Auswertung wurde auf die mögliche Karzinogenese-Sequenz *Normalgewebe* → *DCIS* → *intraductale IDC-Komponente* → *invasive IDC-Komponente* gelegt. Aber auch die benignen Mamma-Läsionen Adenose, Fibroadenom und Papillom sowie die DCIS-Grade NG1, NG2 und NG3 sowie comedo und non-comedo DCIS wurden einzeln ausgewertet. Es wurde untersucht, ob zwischen diesen einzelnen Geweben (signifikante) Unterschiede bezüglich MVD, Necklace-VD und FI nachweisbar sind. Unter der Annahme, dass CD31 auf allen Endothelzellen, CD105 jedoch nur auf „aktivierten“ Endothelien exprimiert wird, erfolgte außerdem die Analyse der Quotienten CD105/CD31-MVD und CD105/CD31-Necklace-VD, um den Anteil der aktivierten Gefäße an der Gesamtgefäßzahl zu bestimmen. Die CD105- und CD31-Färbeergebnisse wurden zunächst getrennt ausgewertet. Zusätzlich wurden Korrelationsanalysen zwischen CD105 und CD31 durchgeführt, um zu untersuchen, ob z. B. eine hohe CD105-MVD auch mit einer hohen CD31-MVD einhergeht. Außerdem wurde untersucht, ob sich Korrelationen zwischen MVD und Necklace-VD (jeweils für CD105 und CD31) nachweisen lassen, d. h. ob z. B. eine hohe CD105-MVD im DCIS auch mit einer hohen CD105-Necklace-VD einhergeht. Alle Korrelationsanalysen wurden zunächst am Gesamtgewebe, d. h. an allen untersuchten Fällen, durchgeführt und anschließend nach Gewebearten aufgetrennt.

#### 4.6 Liste der verwendeten Materialien

Tabelle 3: Verwendete Materialien unter Angabe der Hersteller

Material	Hersteller
Antibody Diluent with background reducing components	DakoCytomation, Hamburg
Anti-CD105-AK, monoklonal, Klon SN6h, Isotyp IgG1, Spezies Maus	DakoCytomation, Hamburg
Anti-CD31-AK, monoklonal, Klon JC70A, Isotyp IgG1, Spezies Maus	DakoCytomation, Hamburg
Automat für HE-Färbung, Model Varistain 24-3	Shandon GmbH, Frankfurt am Main
DAB-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Deckgläschen, 24 mm x 50 mm, Dicke 1	Marienfild GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Digitaluhr	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Eindeckautomat, Promounter RCM 2000	MEDITE GmbH, Burgdorf
Eindeckmittel, pertex®	MEDITE GmbH, Burgdorf
Eppendorfgefäß 1,5 ml und 2 ml	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Ethanol	Herbeta Arzneimittel, Berlin
Feinwaage, Typ 840-13	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Hämalaunlösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HCl	Merck KGaA, Darmstadt
Inkubationskammer	Eigenbau
Kälteplatte, Model Tissue-Tek Cryo Console	Miles Scientific, Naperville, USA
Kamera, Color View II	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg
KCl	Merck KGaA, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
Kochplatte	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern
Lichtmikroskop, Model BX50F (Area 40x= 22,051 mm <sup>2</sup> ; Area 100x= 3,462 mm <sup>2</sup> ; Area 200x= 0,94985 mm <sup>2</sup> ; Area 400x= 0,229 mm <sup>2</sup> )	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg
Messbecher	DURAN Group GmbH, Mainz
Mikrotom, Model SM2000R	Leica Instruments GmbH, Nussloch / Jung
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
Objektträger „Histobond“, adhäsiv	Marienfild GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Paraffin, DDM-Gewebeeinbettmittel	MDS GmbH, Buseck
pH-Meter, Typ MP220	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Pipetten 0,5 - 10 µl	Biohit Deutschland GmbH, Rosbach v. d. Höhe
Pipetten 10 - 100 µl, 20 - 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Schnellkochtopf	Tefal Deutschland
Tris Base	Merck KGaA, Darmstadt
Tris-HCl	Merck KGaA, Darmstadt
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Vectastain Elite ABC Kit	VECTOR Laboratories, Burlingame, USA
Wärmebad, Model Histobath	Leica Instruments GmbH, Nussloch / Jung
Wärmeschrank, Typ 54010	Medax Nagel GmbH, Kiel
Wasserstoffperoxid 30 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Zitronensäure	Merck KGaA, Darmstadt

---

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Qualitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

#### 5.1.1 Übersicht

Eine Übersicht der Färberegebnisse zeigt Abbildung 1. Das Färbeprodukt der CD105- und CD31-Färbungen stellt sich braun dar. Zusätzlich wurden HE-Färbungen angefertigt. Hier findet sich keine spezifische Anfärbung von Gefäßendothelien.

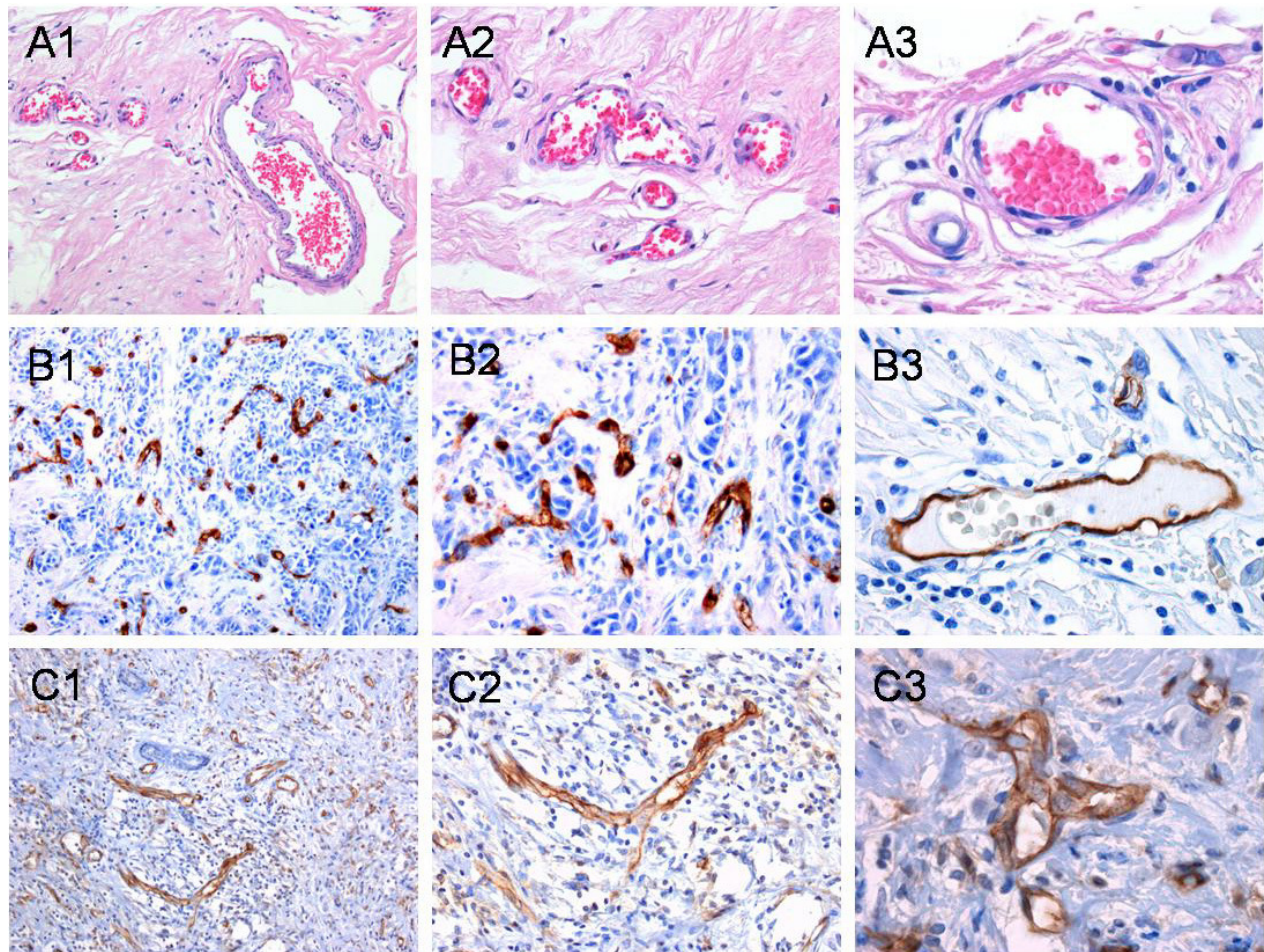


Abbildung 1: Immunhistochemische Gefäßdarstellung im Mammagewebe. Jeweils in 100x (A1, B1, C1), 200x (A2, B2, C2) und 400x (A3, B3, C3) Vergrößerung.

A1-A3: Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Die Gefäßendothelien sind nicht spezifisch angefärbt.

B1-B3: Immunhistochemische Anfärbung von Gefäßendothelien mit einem Antikörper gegen CD105. Aktivierte Endothelzellen färben sich braun.

C1-C3: Immunhistochemische Anfärbung der Gefäßendothelien mit einem Antikörper gegen CD31. Auch hier sind die Endothelzellen braun angefärbt.

### 5.1.2 CD105

Im Färbeergebnis zeigt sich vor allem eine zytoplasmatische Anfärbung von Endothelzellen der Gefäße (Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venulen und Venen). Jedoch werden bei Weitem nicht alle Gefäßendothelien angefärbt, ein Hinweis auf die funktionelle Abhängigkeit der CD105-Expression. Sowohl in malignen Geweben als auch in entzündlich verändertem Gewebe findet sich eine erhöhte Anzahl CD105-positiver Gefäße. Zusätzlich zu Endothelzellen sind gelegentlich Anfärbungen von Fibroblasten, Kollagenfasern oder auch intrazellulären Granula in Makrophagen nachweisbar. Zum Teil findet sich eine leichte unspezifische Hintergrundfärbung, die aber die Auswertung nicht negativ beeinflusst.

Abbildung 2 zeigt das Färbeergebnis im Normalgewebe der Mamma. Dort lassen sich nur wenige, meist schwach gefärbte CD105-positive Gefäße nachweisen. Lediglich in entzündlich veränderten Abschnitten mit entsprechenden Infiltrationen von Lymphozyten, Makrophagen etc. findet sich eine erhöhte Anzahl CD105-positiver Gefäße.

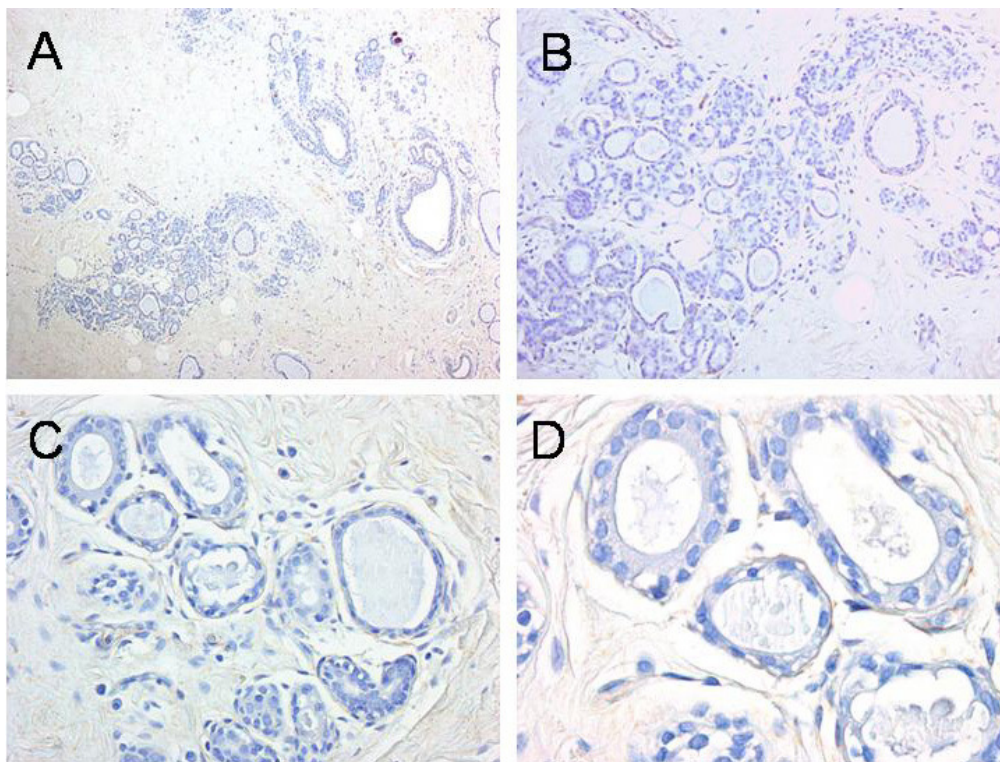


Abbildung 2: Immunhistochemische Anfärbung CD105-positiver Gefäßendothelien im Normalgewebe der Mamma in 40x (A), 100x (B), 200x (C) und 400x (D) Vergrößerung. Es sind kaum spezifisch gefärbte Gefäße nachweisbar.

Im DCIS sind im Vergleich zum Normalgewebe der Mamma bereits subjektiv wesentlich mehr Gefäße angefärbt. Um fast jeden betroffenen Gangabschnitt ist das sogenannte Ring-Phänomen nachweisbar (s. Abb. 3).

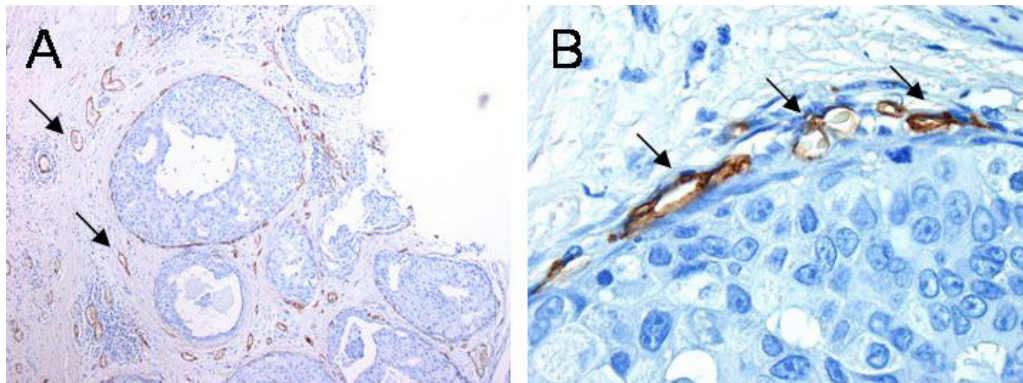


Abbildung 3: Immunhistochemische Darstellung CD105-positiver Gefäße im Ductalen Carcinoma In Situ (DCIS) der Mamma. Die entsprechenden Gefäßendothelien stellen sich braun dar (s. Pfeile). In B deutliche Darstellung des Ring-Phänomens, einem Ring CD105-positiver Gefäße, der der Basalmembran der mit Tumorzellen gefüllten Gangabschnitte direkt anliegt. 40x (A) und 400x (B) Vergrößerung.

Die Färbegergebnisse im DCIS-Tissue-Microarray sind zwar ähnlich gut wie in den normalen DCIS-Schnitten, jedoch sind die DCIS-Areale bei der Färbung teilweise verloren gegangen. Außerdem sind die DCIS-Ausschnitte allgemein sehr klein, was das Aufsuchen von „hot spots“ unmöglich macht. Da zusätzlich auch viele Gangabschnitte nur teilweise erhalten sind, bzw. die DCIS-Ränder gar nicht in der Stanze enthalten waren, ist auch die Bestimmung des Ring-Phänomens nur bedingt möglich. Deshalb wurde auf eine weitere Auswertung des DCIS-TMA verzichtet.

In den invasiven Karzinomen findet sich eine nochmals deutlich erhöhte Anzahl CD105-positiver Gefäße (s. Abb. 4). An den intraductalen Komponenten ist analog zum reinen DCIS das Ring-Phänomen oft deutlich nachweisbar.

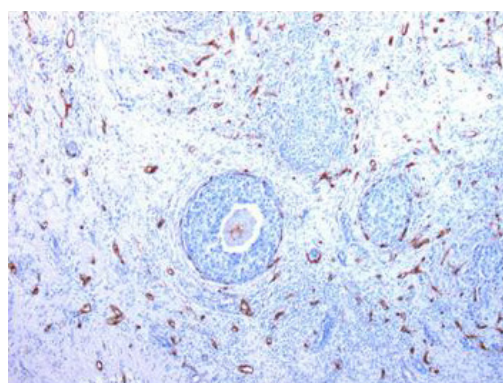


Abbildung 4: Immunhistochemische Darstellung CD105-positiver Gefäßendothelien im Invasiv Ductalen Karzinom (IDC) der Mamma, 40x Vergrößerung.



Auch in den untersuchten benignen Mamma-Läsionen lassen sich CD105-positive Gefäße nachweisen, subjektiv sogar oft mehr als im DCIS. Dabei ist interessanterweise auch in Papillomen gelegentlich ein Ring-Phänomen nachweisbar (s. Abb. 5).

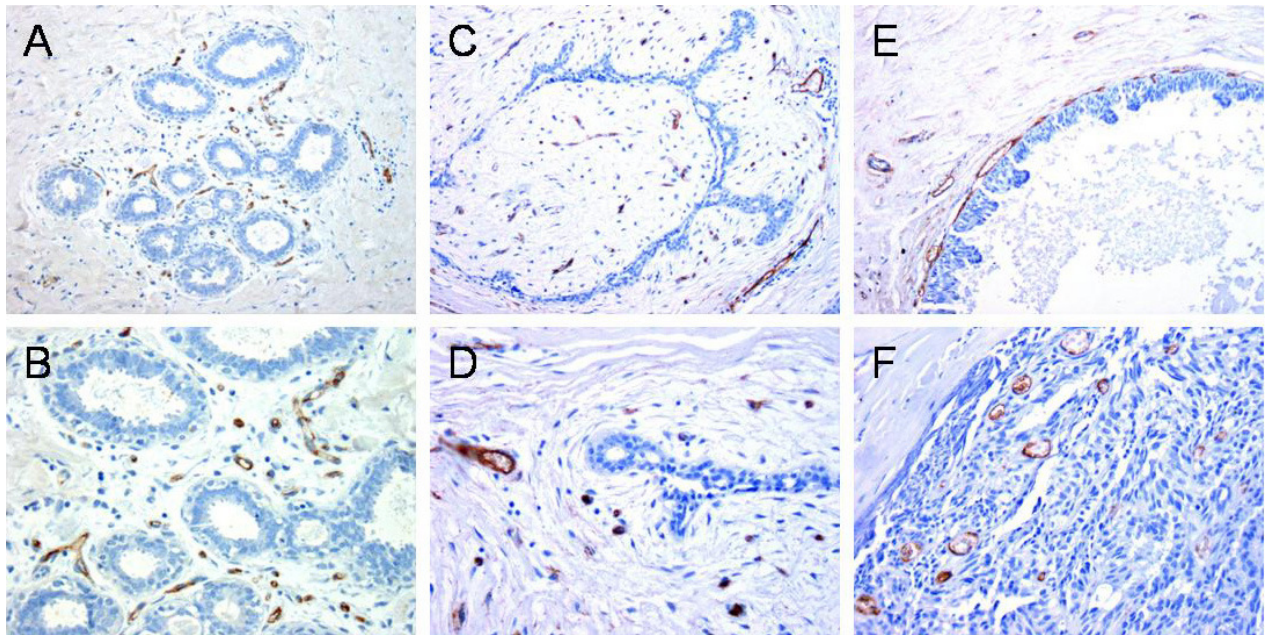


Abbildung 5: Immunhistochemische Darstellung CD105-positiver Gefäße in benignen Tumoren der Mamma.

Die entsprechenden Gefäßendothelien sind braun gefärbt. Abgebildet sind jeweils 100x (obere Reihe) und 200x Vergrößerungen (untere Reihe) von Adenose (A, B), Fibroadenom (C, D) und Papillom (E, F). Im Papillom ist auch ein Ring-Phänomen nachweisbar (E).

### 5.1.3 CD31

CD31 ist ein Marker für kontinuierliche Endothelien. Bei der immunhistochemischen Darstellung von CD31 färben sich vor allem Blutgefäßendothelien, wobei auch kleinere Blutgefäße gefärbt werden. Dabei überwiegt die zytoplasmatisch diffuse gegenüber nucleärer und membranöser Anfärbung. Neben Endothelzellen findet sich gelegentlich auch eine Anfärbung von Tumorepithelzellen. Selten sind auch Bindegewebszellen sowie lymphatische Zellen und schaumzellige Makrophagen diffus gefärbt. Durch das Antigen-Retrieval sind die Präparate z. T. stark zerkocht, was die Auswertung in diesen Fällen erschwert. Das gilt insbesondere für den DCIS-TMA, von dem sich durch das Erhitzen viele DCIS-Stanzen gelöst haben, und der dadurch nicht für weitere Auswertungen genutzt werden konnte. Die Färbeintensität ist bei der Färbung von CD31 insgesamt etwas schwächer als bei der Färbung von CD105. Dies ist auf eine geringere Antikörperkonzentration zurückzuführen und beeinträchtigt die Auswertung nicht.

Im Normalgewebe der Mamma finden sich im Gegensatz zu CD105 sehr viele CD31-positive Gefäße (s. Abb. 6). Es gibt kaum bzw. keine Gefäße, die nicht angefärbt sind.

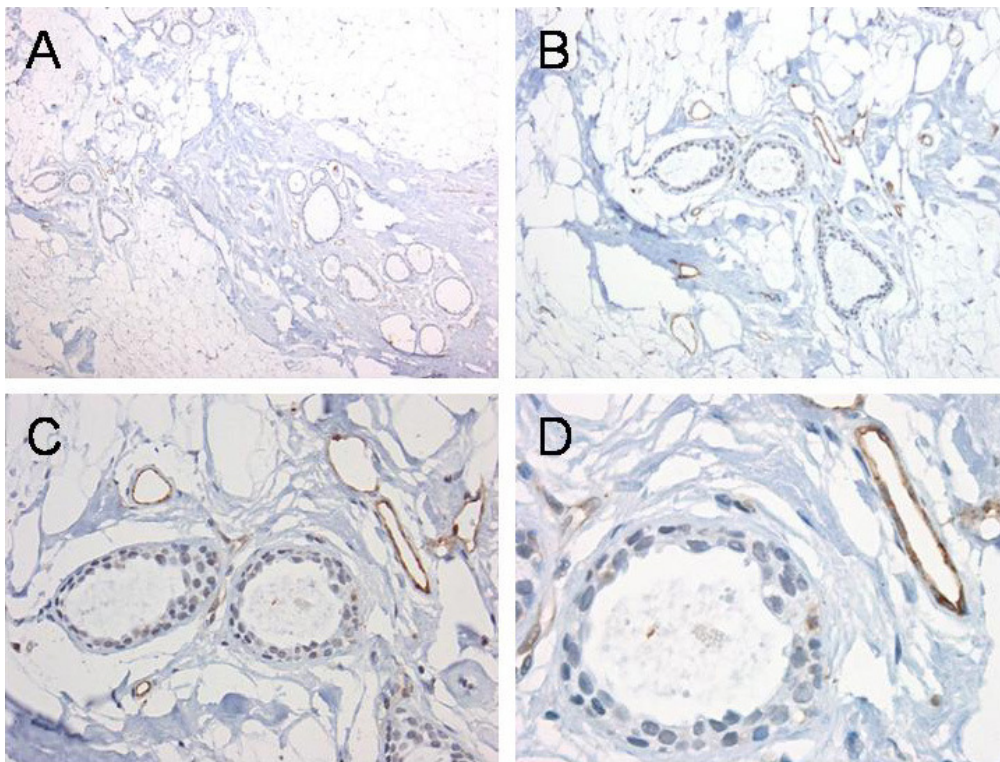


Abbildung 6: Immunhistochemische Darstellung CD31-positiver Gefäßendothelien im Normalgewebe der Mamma. 40x (A), 100x (B), 200x (C), 400x (D) Vergrößerung. Gefärbte Gefäße stellen sich braun dar.

Auch im DCIS lassen sich viele Gefäße mit einem anti-CD31-mAK anfärben. Das Ring-Phänomen ist ebenso wie bei der CD105-Färbung nachweisbar.

Innerhalb der invasiven Mammakarzinome findet sich teilweise eine extreme Anfärbung von Gefäßen als Zeichen einer sehr starken Vaskularisierung.

Auch in den benignen Mamma-Läsionen lassen sich viele Gefäße anfärben (s. Abb 7). Auch hier ist im Papillom ein Ring-Phänomen nachweisbar, dessen Auswertung durch das vorangehende Antigen-Retrieval jedoch nur stark eingeschränkt möglich ist.

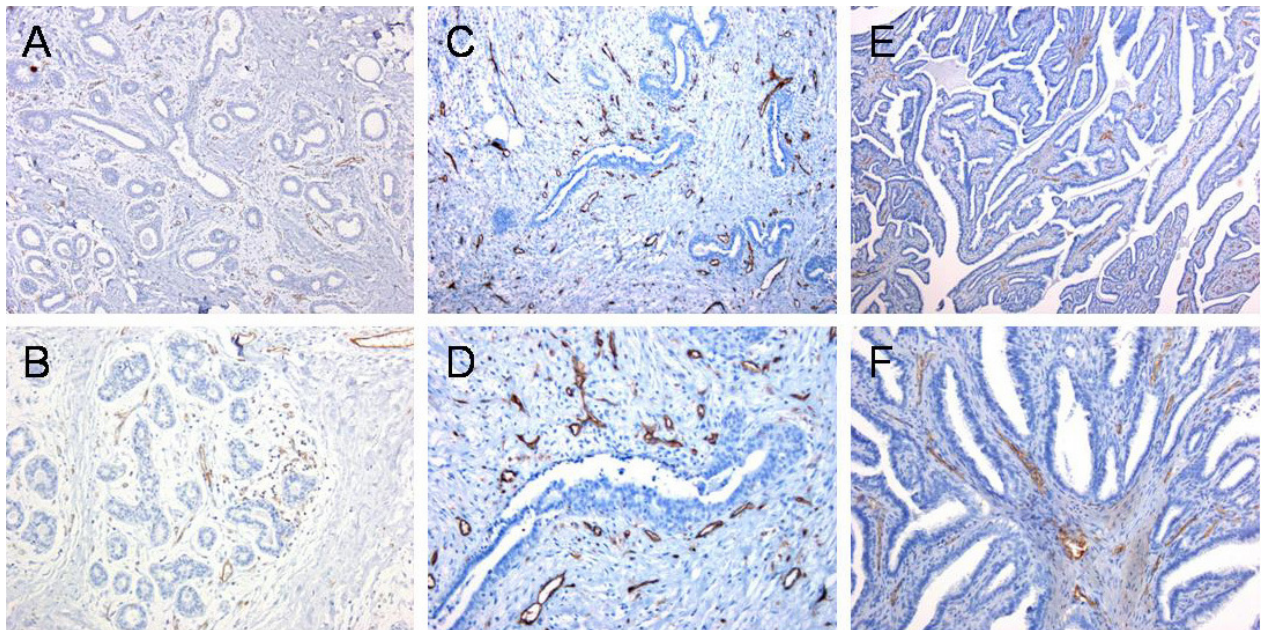


Abbildung 7: CD31-Darstellung in benignen Tumoren der Mamma. Adenose (A, B), Fibroadenom (C, D) und Papillom (E, F). Jeweils 40x (obere Reihe) und 100x Vergrößerung (untere Reihe). CD31 wird braun angefärbt.

## 5.2 Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CD105

### 5.2.1 Übersicht

Die Tabellen 4 und 5 geben einen Überblick über Fallzahlen (n), Mediane sowie Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung der CD105-MVD, der CD105-Necklace-VD und der CD105-Färbeintensität in den einzelnen Mammageweben. Hierbei wird bereits an den z. T. sehr hohen Standardabweichungen vom Mittelwert deutlich, dass die ermittelten Werte oft nicht normalverteilt bzw. durch Ausreißer verzerrt sind. Dies wurde in der statistischen Auswertung berücksichtigt, indem nicht-parametrische Tests eingesetzt wurden.

Tabelle 4: Fallzahlen (n), Mediane, Mittelwerte und Standardabweichungen (s) von CD105-MVD, CD105-Necklace-VD und CD105-FI in den einzelnen Geweben

Gewebe Fallzahl n	Wert	CD105-MVD	CD105-Necklace- VD	CD105-FI
Normalgewebe n=37	Mittelwert±s	8,3±16,0	-	0,9±0,7
	Median	2,9	-	1,0
DCIS n=38	Mittelwert±s	45,4±35,8	16,1±10,9	1,9±1,0
	Median	40,0	14,4	2,0
intraductale IDC-Komponente n=25	Mittelwert±s	89,3±40,3	28,5±15,1	2,4±0,7
	Median	91,7	27,2	3,0
invasive IDC-Komponente n=23	Mittelwert±s	170,3±77,2	-	2,7±0,5
	Median	151,4	-	3,0
Adenose n=10	Mittelwert±s	61,0±71,5	-	1,8±1,0
	Median	28,4	-	1,0
Fibroadenom n=19	Mittelwert±s	141,3±128,3	-	2,7±0,6
	Median	88,8	-	3,0
Papillom n=8	Mittelwert±s	130,3±60,9	-	2,6±0,7
	Median	129,5	-	3,0
Insgesamt n=160	Mittelwert±s	78,2±83,7	-	2,0±1,0
	Median	57,5	-	2,0

Tabelle 5: Fallzahlen (n), Mediane, Mittelwerte und Standardabweichungen (s) von CD105-MVD, CD105-Necklace-VD und CD105-FI in DCIS NG1-3 sowie comedo und non-comedo DCIS

Gewebe Fallzahl n	Wert	CD105-MVD	CD105-Necklace- VD	CD105-FI
DCIS NG1 n=5	Mittelwert±s	18,6±29,3	6,5±8,1	1,2±0,8
	Median	1,5	2,3	1,0
DCIS NG2 n=11	Mittelwert±s	50,9±46,2	17,1±9,8	2,0±1,1
	Median	24,7	18,7	2,0
DCIS NG3 n=22	Mittelwert±s	49,2±31,3	18,0±11,3	2,1±0,9
	Median	53,9	16,9	2,0
non-comedo DCIS n=16	Mittelwert±s	40,0±41,7	13,6±10,0	1,7±1,0
	Median	22,6	12,7	1,0
comedo DCIS n=22	Mittelwert±s	49,2±31,3	18,0±11,3	2,1±0,9
	Median	53,9	16,9	2,0

Die Färbung des DCIS-TMA ergab zwar qualitativ gute Ergebnisse, konnte aber für die quantitative Auswertung auf Grund zu kleiner Gewebeausschnitte nicht verwendet werden.

### 5.2.2 Auswertung der CD105-MVD

Im Normalgewebe sind wie schon erwähnt kaum CD105-positive Gefäße nachweisbar, die CD105-MVD ist demzufolge sehr gering. Innerhalb der angenommenen Karzinogenese-Sequenz

*Normalgewebe → DCIS → intraductale IDC-Komponente → invasive IDC-Komponente*

ist jedoch ein signifikanter Anstieg der CD105-MVD (alle  $p < 0,001$ ) nachweisbar. Eine anschauliche Darstellung dieses Verhaltens mit Angabe der Signifikanzen zeigt der Boxplot in Abbildung 8. Die korrespondierenden histologischen Bilder dazu sind in Abbildung 9 dargestellt.

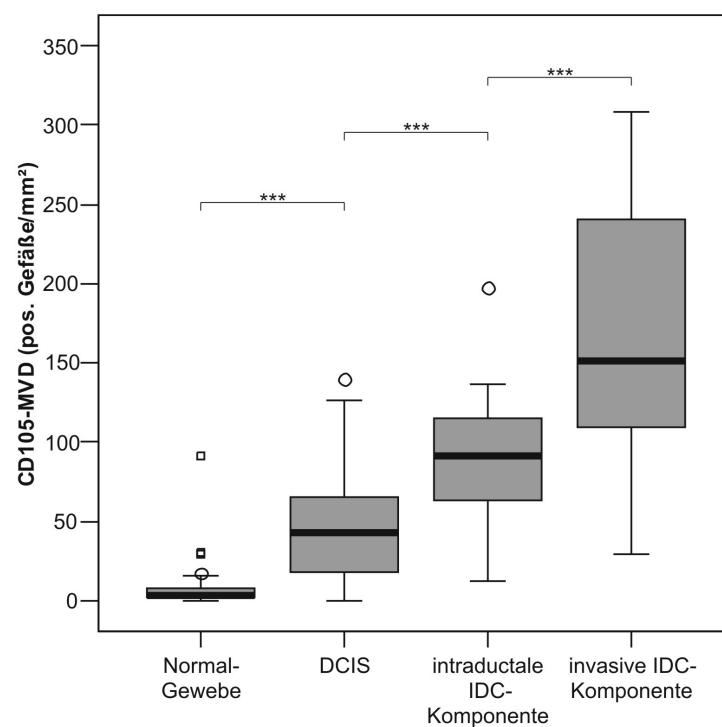


Abbildung 8: Boxplot zur Darstellung der CD105-Microvessel-Density (MVD) in Normalgewebe, Ductalem Carcinoma In Situ (DCIS) sowie intraductaler und invasiver Komponente Invasiv Ductaler Karzinome (IDC).

Ausgehend vom Normalgewebe jeweils signifikanter Anstieg der CD105-MVD innerhalb der proklamierten Karzinogenese-Sequenz.

\*\*\*  $p < 0,001$ ; ○ = Ausreißer außerhalb; □ = Ausreißer weit außerhalb

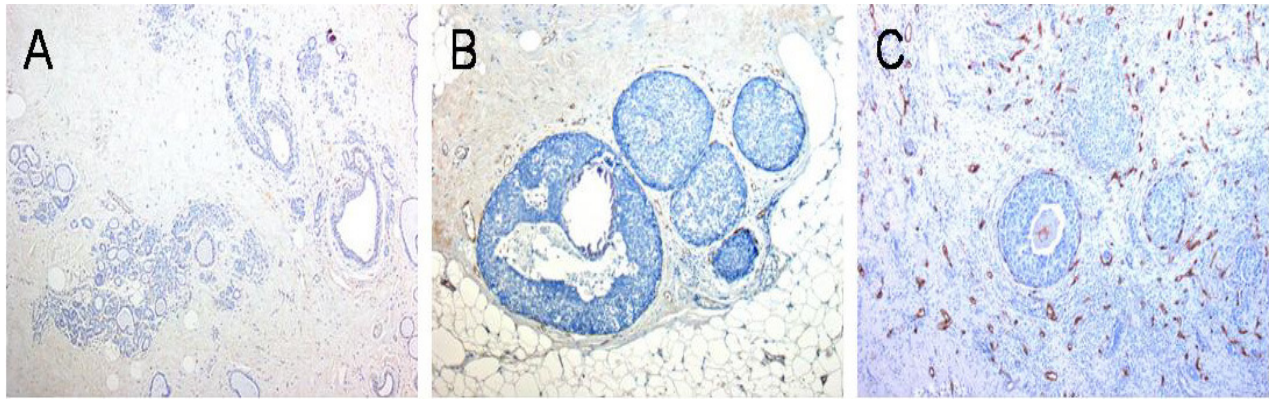


Abbildung 9: Vergleich der CD105-Expression im Normalgewebe (A), Ductalem Carcinoma In Situ (DCIS; B) und Invasivem Ductalem Karzinom (IDC; C) der Mamma. Jeweils 40x Vergrößerung.

Innerhalb der DCIS-Kerngrade lässt sich von NG1 zu NG2 bzw. NG3 zwar eine tendenzielle Zunahme der CD105-MVD erkennen, jedoch ist dieser Anstieg knapp nicht signifikant ( $p=0,075$  bzw.  $p=0,053$ ). NG2 und NG3 DCIS weisen ähnlich hohe CD105-MVD auf ( $p=0,951$ ). Ähnliches gilt für die CD105-MVD in non-comedo und comedo DCIS. Auch hier lässt sich kein signifikanter Unterschied der CD105-MVD zwischen beiden DCIS-Subtypen nachweisen ( $p=0,314$ ; s. Abb. 10).

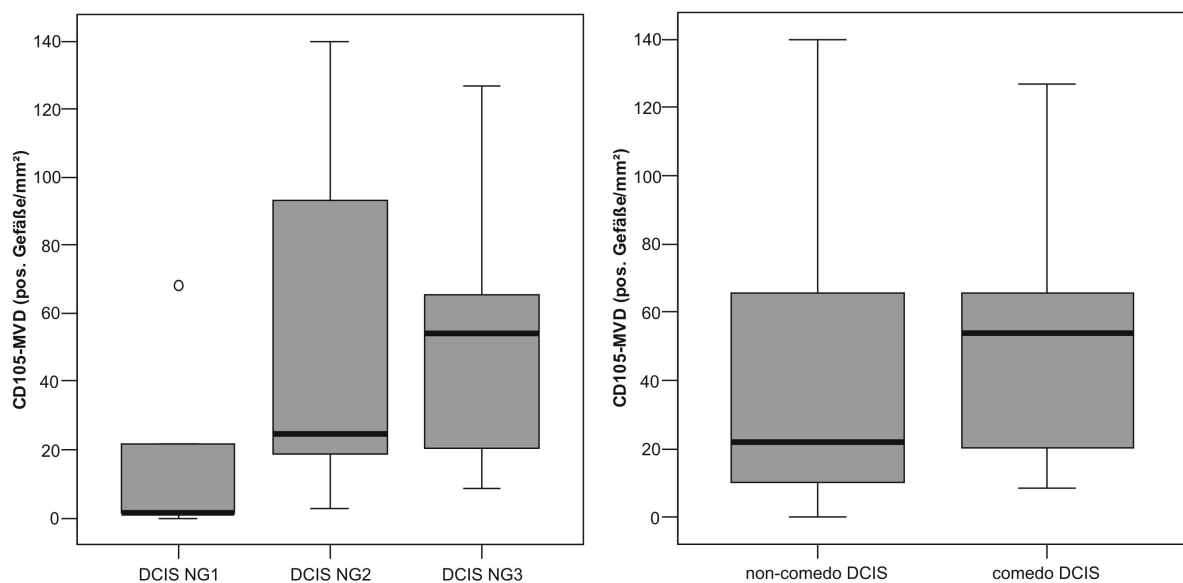


Abbildung 10: Boxplots zur Darstellung der CD105-Microvessel-Density (MVD) in den Subtypen des Ductalen Carcinoma In Situ (DCIS) Nuclear Grade (NG) 1-3 sowie non-comedo und comedo DCIS.

Es ist zwar eine Tendenz zu höheren CD105-MVDs in höherem Kerngrad erkennbar, jedoch ist dieser Anstieg nicht signifikant.

○ = Ausreißer außerhalb

Abbildung 11 zeigt die synoptische Darstellung der CD105-MVD in Normalgewebe, DCIS, Adenose, Fibroadenom und Papillom der Mamma als Boxplot. Daraus geht hervor, dass die CD105-MVD in allen untersuchten benignen Läsionen (sowie im DCIS) signifikant höher ist als im Normalgewebe (alle  $p < 0,001$ ). Interessanterweise ist die CD105-MVD in Fibroadenomen ( $p < 0,001$ ) und Papillomen ( $p = 0,001$ ) auch signifikant höher als im DCIS. Signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe der benignen Läsionen sind nur für Fibroadenome ( $p = 0,012$ ) und Papillome ( $p = 0,023$ ) nachweisbar, deren CD105-MVD jeweils signifikant höher ist als die der Adenosen.

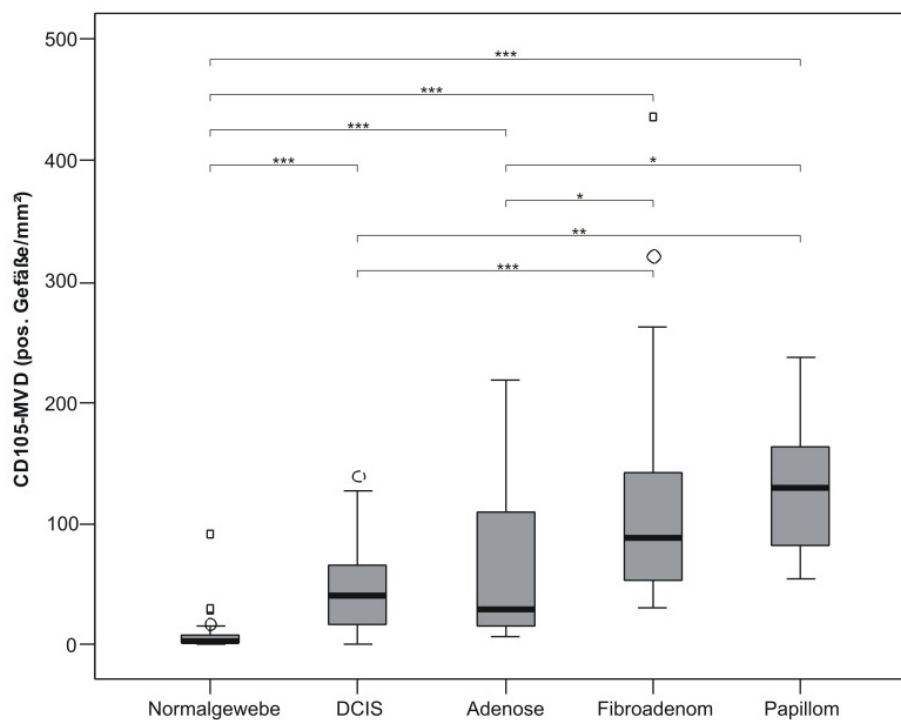


Abbildung 11: Boxplot zum Vergleich der CD105-Microvessel-Density (MVD) im Normalgewebe, Ductalem Carcinoma In Situ (DCIS) und den benignen Läsionen Adenose, Fibroadenom und Papillom der Mamma.

In allen benignen Läsionen und im DCIS ist die CD105-MVD jeweils signifikant höher als im Normalgewebe. Im DCIS ist die CD105-MVD signifikant niedriger als in Papillomen und Fibroadenomen. Zwischen der CD105-MVD in DCIS und in Adenosen gibt es keine signifikanten Unterschiede.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; ○ = Ausreißer außerhalb; □ = Ausreißer weit außerhalb

### 5.2.3 Auswertung der CD105-Necklace-VD

Der Vergleich der CD105-Necklace-VD in reinen DCIS und intraductalen IDC-Komponenten zeigt einen signifikanten Anstieg der CD105-Necklace-VD zum invasiven Karzinom hin ( $p < 0,001$ ; s. Abb. 12). Einen anschaulichen histologischen Vergleich dieses Sachverhalts zeigen die Aufnahmen in Abbildung 13.

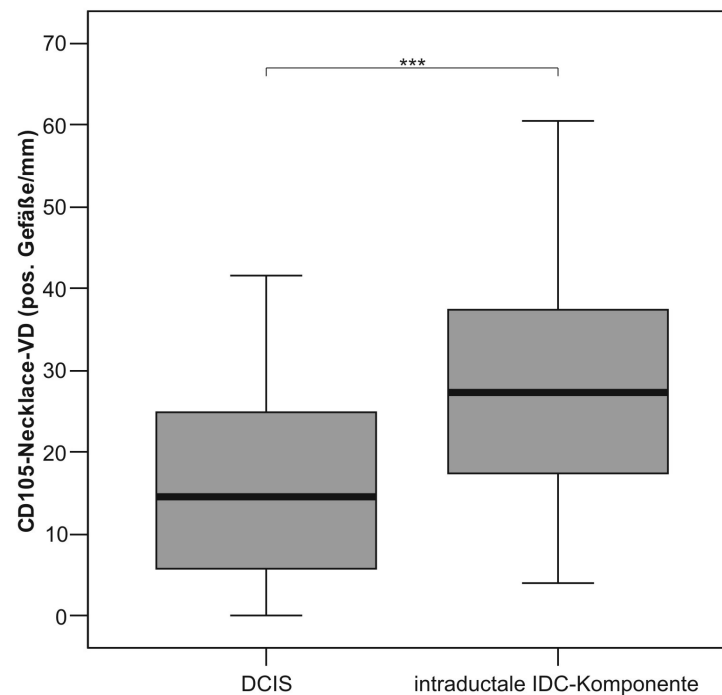


Abbildung 12: Boxplot zum Vergleich der CD105-Necklace-Vessel-Density (Necklace-VD) im Ductalen Carcinoma In Situ (DCIS) und intraductaler Komponente eines Invasiv Ductalen Karzinoms (IDC) der Mamma.

Die CD105-Necklace-VD ist im DCIS mit IDC-Komponente signifikant höher als im reinen DCIS (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ).

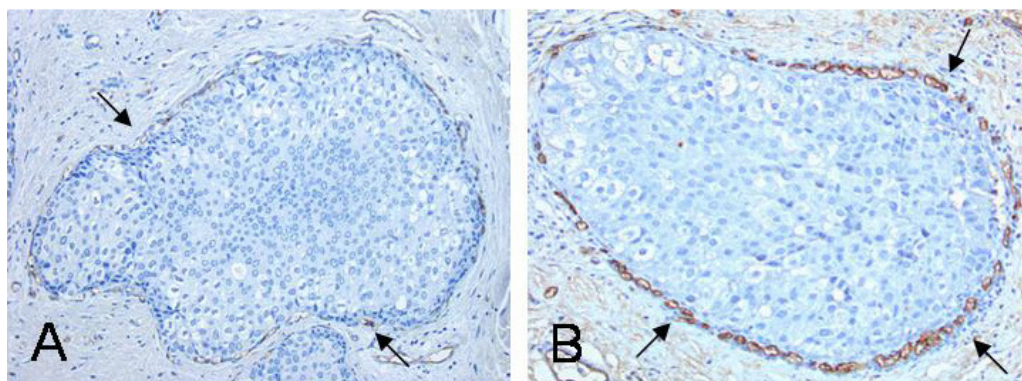


Abbildung 13: Immunhistochemische Darstellung von CD105. Vergleich des Ring-Phänomens im Ductalen Carcinoma in situ (DCIS; A) und intraductaler Komponente eines Invasiv Ductalen Karzinoms (IDC; B) der Mamma. CD105-positive Ringgefäße stellen sich braun dar (Pfeile). Im Gegensatz zum IDC findet sich im DCIS oft nur eine schwächere Ausprägung des Phänomens mit nur einzelnen gefärbten Gefäßen. Jeweils 100x Vergrößerung.



Innerhalb der DCIS-Grade NG1 bis NG3 zeigt sich ein signifikanter Anstieg der CD105-Necklace-VD vom NG1 zu NG3 ( $p=0,029$ ). Der Anstieg der CD105-Necklace-VD von NG1 zu NG2 ist nach eigener Definition nicht signifikant ( $p=0,05$ ). Zwischen den DCIS Subtypen NG2 und NG3 bzw. auch zwischen non-comedo und comedo DCIS finden sich keine signifikanten Unterschiede der CD105-Necklace-VD (s. Abb. 14).

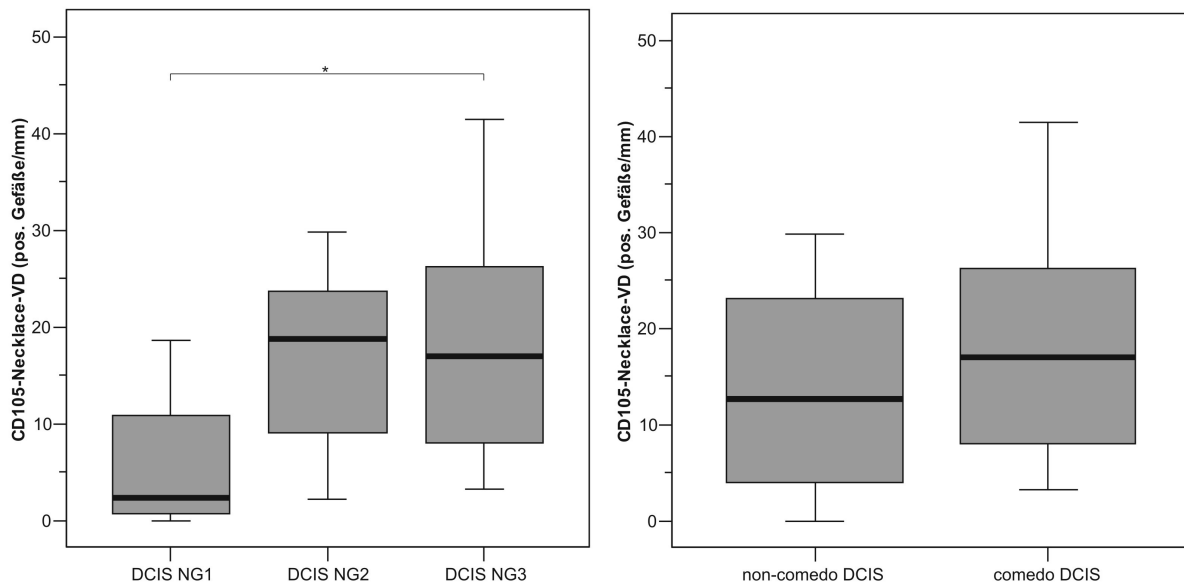


Abbildung 14: Boxplots zum Vergleich der CD105-Necklace-Vessel-Density (CD105-Necklace-VD) in den Subtypen des Ductalen Carcinoma In Situ (DCIS) Nuclear Grade (NG) 1-3 sowie in non-comedo und comedo DCIS. Lediglich zwischen DCIS NG1 und NG3 konnte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

\*  $p<0,05$

#### 5.2.4 Auswertung der CD105-FI

Die Färbeintensitäten von DCIS sowie intraductaler und invasiver IDC-Komponente sind jeweils signifikant höher ( $p<0,001$ ) als die im Mamma-Normalgewebe. Zusätzlich kommt es zu einem signifikanten Anstieg der CD105-FI vom DCIS zur invasiven Komponente der IDC ( $p=0,014$ ). Die Färbeintensitäten in intraductaler und invasiver IDC-Komponente sowie in DCIS und intraductaler IDC-Komponente unterscheiden sich nicht signifikant.

Im DCIS NG1 ist die CD105-FI signifikant geringer als im NG2, jedoch besteht kein signifikanter Unterschied zu NG3. Auch NG2 und NG3 DCIS sowie non-comedo und comedo DCIS unterscheiden sich in der CD105-FI nicht signifikant.

Innerhalb der benignen Läsionen unterscheiden sich nur die CD105-FI von Adenose und Fibroadenom signifikant ( $p=0,03$ ), wobei die CD105-FI im Fibroadenom höher liegt.

### 5.2.5 Korrelationen zwischen CD105-MVD und CD105-Necklace-VD

CD105-MVD und CD105-Necklace-VD korrelieren sowohl im DCIS als auch im invasiven Karzinom miteinander (s. Tabelle 6). Das bedeutet, dass ein hohe CD105-MVD in der Regel auch mit einer hohen CD105-Necklace-VD einhergeht. Dieser Zusammenhang verdeutlicht sich in einem Streudiagramm (s. Abb. 15).

Tabelle 6: Korrelationen zwischen CD105-MVD und CD105-Necklace-VD

Gewebe	Korrelationskoeffizient nach Spearman	Signifikanz (2-seitig)
DCIS	0,727	<0,001 ***
intraductale IDC-Komponente	0,657	<0,001 ***

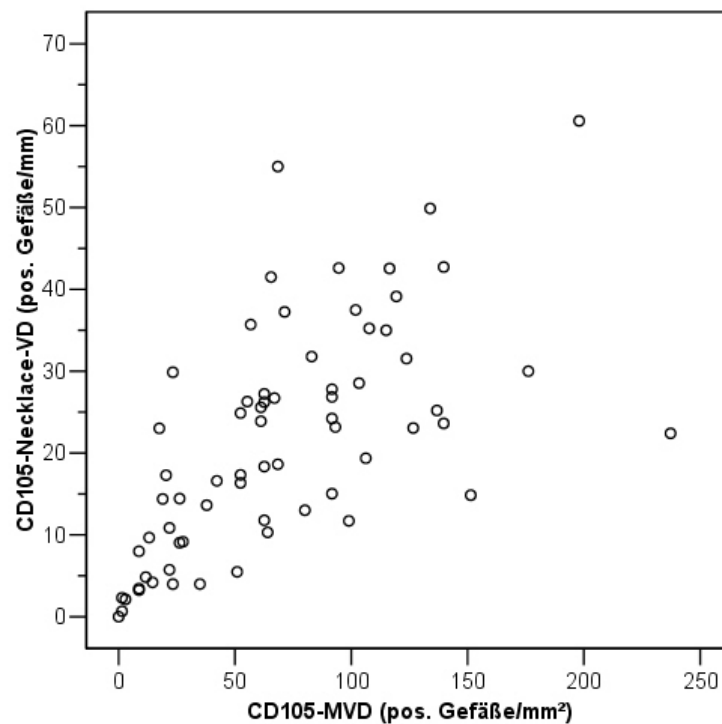


Abbildung 15: Streudiagramm zur Darstellung der positiven Korrelation zwischen CD105-Microvessel-Density (MVD) und CD105-Necklace-Vessel-Density (Necklace-VD) im Ductalen Carcinoma In Situ (DCIS) und intraductaler Komponente Invasiv Ductaler Karzinome (IDC) der Mamma.

### 5.3 Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CD31

#### 5.3.1 Übersicht

Einen Überblick über CD31-MVD, CD31-Necklace-VD und CD31-FI in den einzelnen Geweben geben die Tabellen 7 und 8. Analog zu CD105 sind auch hier die Standardabweichungen der Mittelwerte bedingt durch Ausreißer und geringe Fallzahlen teilweise sehr hoch.

Tabelle 7: Fallzahlen (n), Mediane, Mittelwerte und Standardabweichungen (s) von CD31-MVD, CD31-Necklace-VD und CD31-FI in den einzelnen Geweben

Gewebe Fallzahl n	Wert	CD31-MVD	CD31-Necklace- VD	CD31-FI
Normalgewebe n=37	Mittelwert±s Median	114,5±66,8 94,6		1,7±0,8 2,0
DCIS n=38	Mittelwert±s Median	113,5±51,9 118,6	22,0±9,8 21,2	2,1±0,7 2,0
intraductale IDC-Komponente n=25	Mittelwert±s Median	185,6±64,5 183,4	29,7±9,6 29,7	2,6±0,6 3,0
invasive IDC-Komponente n=23	Mittelwert±s Median	217,0±71,9 214,0		2,9±0,4 3,0
Adenose n=10	Mittelwert±s Median	188,2±78,5 172,5		2,7±0,5 3,0
Fibroadenom n=19	Mittelwert±s Median	130,4±50,0 120,8		2,8±0,4 3,0
Papillom n=8	Mittelwert±s Median	225,3±82,4 230,0		2,8±0,7 3,0
Insgesamt n=160	Mittelwert±s Median	152,1±76,1 151,4		2,4±0,8 3,0

Tabelle 8: Fallzahlen (n), Mediane, Mittelwerte und Standardabweichungen (s) von CD31-MVD, CD31-Necklace-VD und CD31-FI in DCIS NG1-3 sowie non-comedo und comedo DCIS

Gewebe Fallzahl n	Wert	CD31-MVD	CD31-Necklace- VD	CD31-FI
DCIS NG1 n=5	Mittelwert±s Median	94,0±23,3 84,4	17,4±10,0 19,4	2,2±0,8 2,0
DCIS NG2 n=11	Mittelwert±s Median	119,4±40,7 132,5	25,4±13,6 22,2	2,2±0,6 2,0
DCIS NG3 n=22	Mittelwert±s Median	111,6±59,3 109,9	20,8±7,0 20,8	2,0±0,8 2,0
non-comedo DCIS n=16	Mittelwert±s Median	116,1±41,3 124,5	23,6±12,8 22,2	2,3±0,7 2,0
comedo DCIS n=22	Mittelwert±s Median	111,6±59,3 109,9	20,8±7,0 20,8	2,0±0,8 2,0

### 5.3.2 Auswertung der CD31-MVD

Schon anhand der Mittelwerte und Mediane aus Tabelle 7 lässt sich erkennen, dass sich die CD31-MVD im Normalgewebe der Mamma nur unwesentlich von der im DCIS unterscheidet. Der Mann-Whitney-Test ergibt auch keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Geweben. Allerdings ist die CD31-MVD sowohl in intraductalen als auch in invasiven IDC-Komponenten jeweils signifikant höher als im Normalgewebe und im DCIS (jeweils  $p < 0,001$ ). Für die invasive IDC-Komponente ergeben sich zwar höhere Mittelwerte und Mediane, allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant. Diese Ergebnisse sind zusammenfassend in einem Boxplot in Abbildung 16 dargestellt. Die entsprechenden histologischen Bilder aus Normalgewebe, DCIS, invasiver und intraductaler IDC-Komponente sind in Abbildung 17 dargestellt.

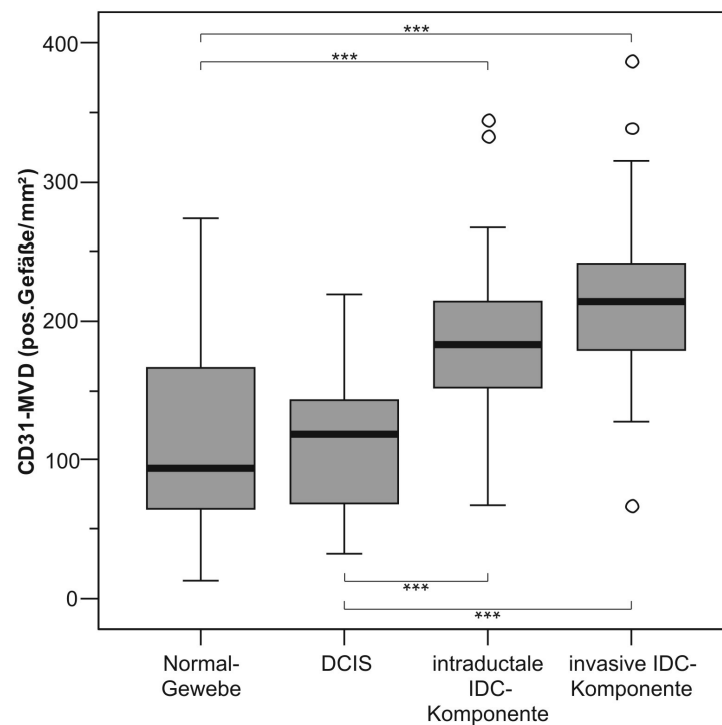


Abbildung 16: Boxplot zur Darstellung der CD31-Microvessel-Density (MVD) in Normalgewebe, Ductalem Carcinoma In Situ (DCIS) sowie intraductaler und invasiver Komponente Invasiv Ductaler Karzinome (IDC) der Mamma.

Im Gegensatz zur CD105-MVD gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen der CD31-MVD im Normalgewebe und der im DCIS. Die CD31-MVD ist in beiden Geweben aber jeweils signifikant niedriger als in intraductalen und invasiven IDC-Komponenten. Zwischen der CD31-MVD in intraductalen und invasiven IDC-Komponenten gibt es keinen signifikanten Unterschied.

\*\*\*  $p < 0,001$ ; ○ = Ausreißer außerhalb

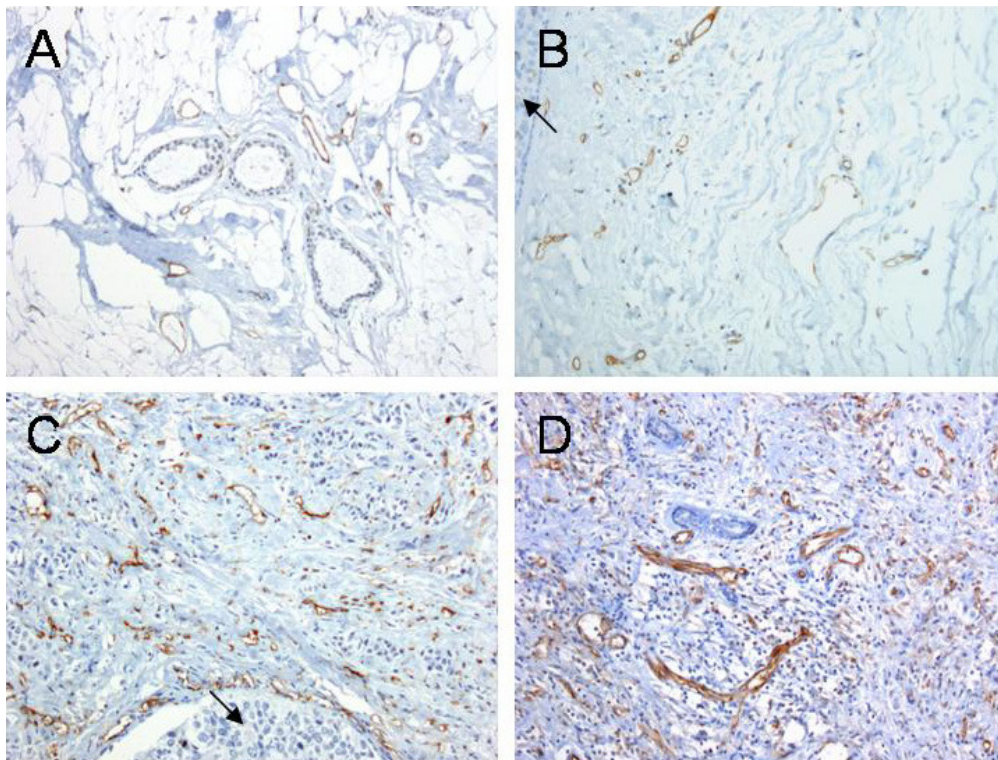


Abbildung 17: Immunhistochemische Darstellung von CD31. Vergleich der CD31-Microvessel-Density (MVD) im Normalgewebe (A), Ductalen Carcinoma In Situ (DCIS; B), intraductaler (C) und invasiver (D) Komponente eines Invasiv Ductalen Karzinoms (IDC) der Mamma. Jeweils 100x Vergrößerung. Dabei sind in B und C entsprechend der histologischen Auswertung jeweils Areale direkt am DCIS-Rand dargestellt, wobei die Pfeile die Tumorepithelien markieren.

Innerhalb der DCIS-Grade NG1 bis NG3 bzw. in den Subtypen non-comedo und comedo DCIS ergeben sich bezüglich der CD31-MVD keinerlei signifikante Unterschiede (s. Abb. 18).

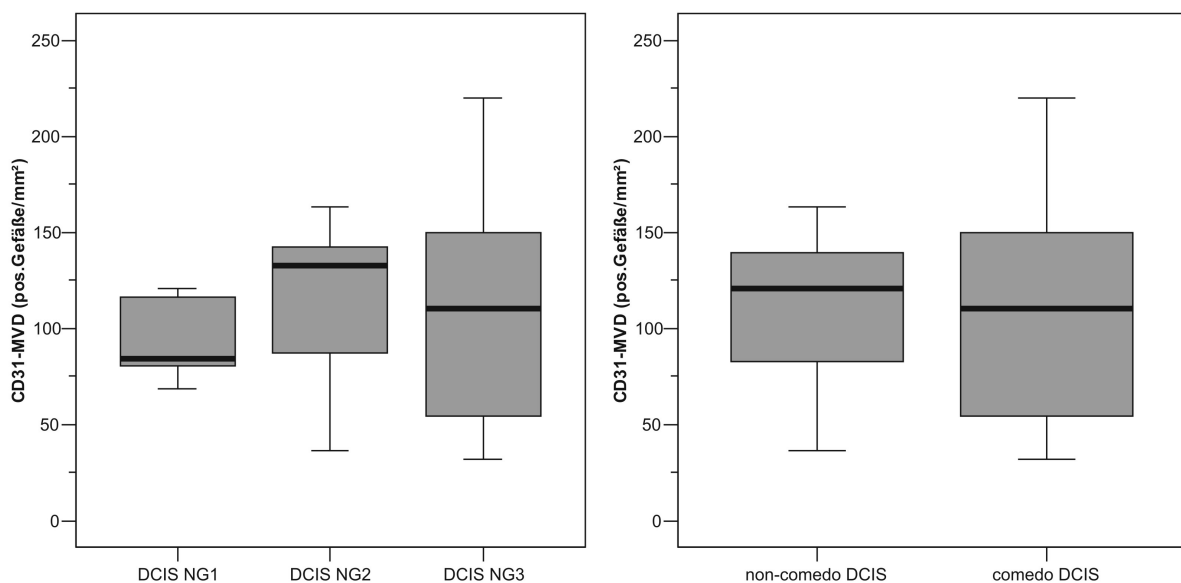


Abbildung 18: Boxplot zur Darstellung der CD31-Microvessel-Density (MVD) in den Subtypen des Ductalen Carcinoma In Situ (DCIS) der Mamma Nuclear Grade (NG) 1-3 sowie non-comedo und comedo DCIS. Innerhalb dieser Unterteilung der DCIS finden sich keine signifikanten Unterschiede der CD31-MVD.

Das Verhältnis der CD31-MVD in Adenose, Fibroadenom und Papillom zu der im DCIS ist im Boxplot der Abbildung 19 dargestellt. Sowohl in Adenosen ( $p=0,003$ ) als auch in Papillomen ( $p=0,001$ ) ist die CD31-MVD signifikant höher als im DCIS. Innerhalb der Gruppe der benignen Läsionen liegt die CD31-MVD in Fibroadenomen signifikant unter der in Adenosen ( $p=0,041$ ) und Papillomen ( $p=0,009$ ). Zwischen den CD31-MVDs in Adenosen und Papillomen besteht ein nachweisbarer Unterschied bezüglich Mittelwert und Median (s. Tabelle 7, Seite 51), jedoch ist dieser nicht signifikant. Adenosen ( $p=0,008$ ) und Papillome ( $p=0,002$ ) weisen eine signifikant höhere CD31-MVD auf als das Normalgewebe der Mamma. Dieser Unterschied ist zwischen Fibroadenomen und Normalgewebe der Mamma nicht nachweisbar.

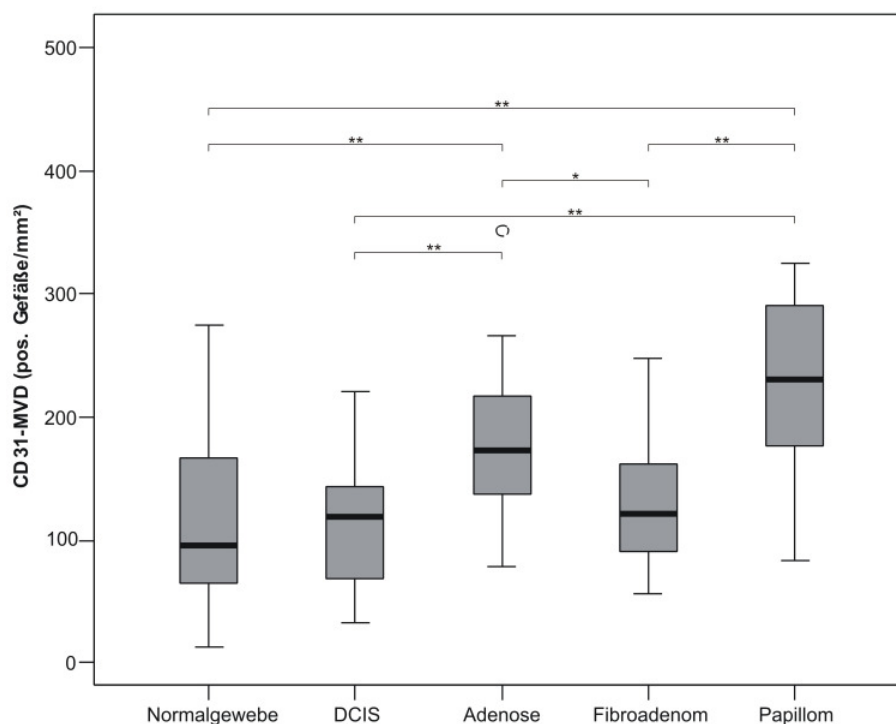


Abbildung 19: Boxplot zur Darstellung der CD31-Microvessel-Density (MVD) im Normalgewebe und Ductalem Carcinoma In Situ (DCIS) der Mamma und den benignen Mamma-Läsionen Adenose, Fibroadenom und Papillom.

Die CD31-MVD ist im Normalgewebe und im DCIS signifikant niedriger als in Adenosen und Papillomen, es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied zu der CD31-MVD in Fibroadenomen. Innerhalb der Gruppe der benignen Mamma-Läsionen ist die CD31-MVD in Fibroadenomen signifikant geringer als in Adenosen und Papillomen. Die CD31-MVD ist in Papillomen zwar tendenziell höher als in Adenosen, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant.

\*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; o = Ausreißer außerhalb

### 5.3.3 Auswertung der CD31-Necklace-VD

Im Vergleich mit dem DCIS liegt die CD31-Necklace-VD in intraductalen IDC-Komponenten signifikant höher ( $p=0,001$ , s. Abb. 20). Die vergleichenden histologischen Bilder dazu zeigt die Abbildung 21.

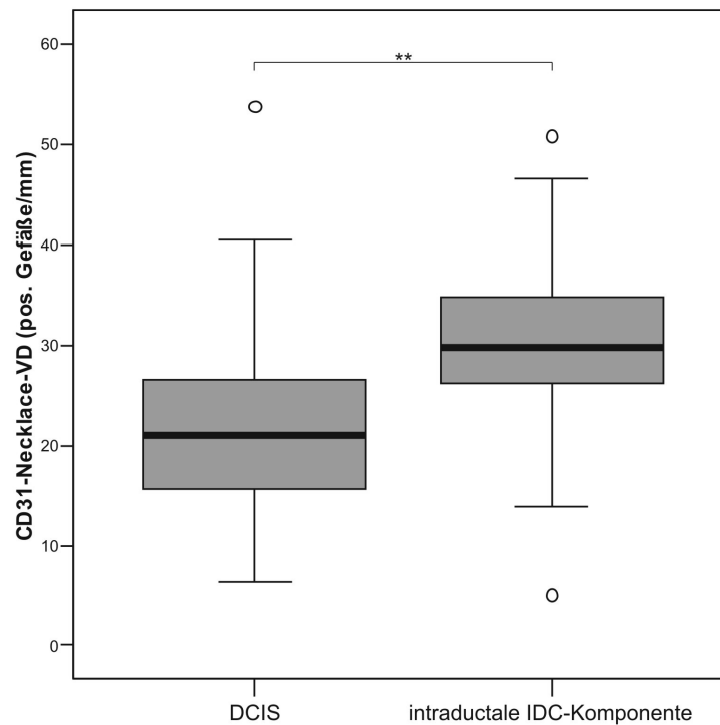


Abbildung 20: Boxplot zum Vergleich der CD31-Necklace-Vessel-Density (Necklace-VD) von Ductalem Carcinoma In Situ (DCIS) und intraductaler Komponente eines Invasiv Ductalen Karzinoms (IDC) der Mamma.

In der intraductalen IDC-Komponente ist die CD31-Necklace-VD signifikant höher als im reinen DCIS.

\*\*  $p < 0,01$ ; ○ = Ausreißer außerhalb

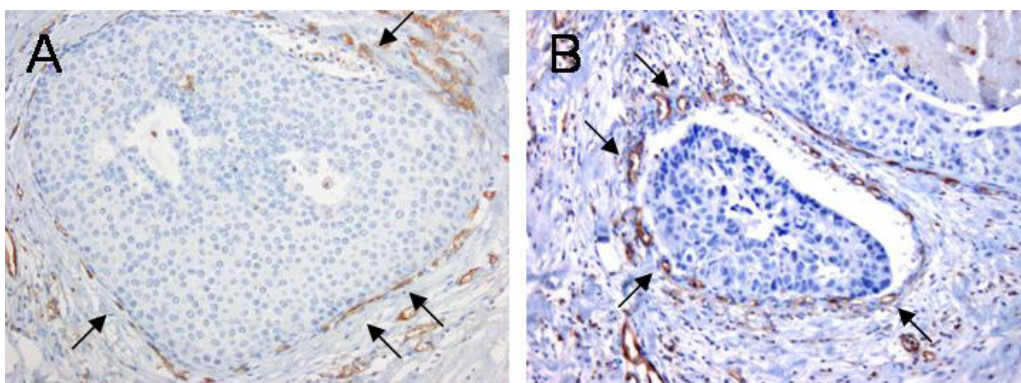


Abbildung 21: Immunhistochemische Darstellung von CD31. Vergleich des Ring-Phänomens von Ductalem Carcinoma In Situ (A) und intraductaler Komponente eines Invasiv Ductalen Karzinoms (B). Jeweils 100x Vergrößerung.

Zwischen den einzelnen DCIS-Subtypen bestehen bezüglich der CD31-Necklace-VD keine signifikanten Unterschiede (s. Abb. 22).

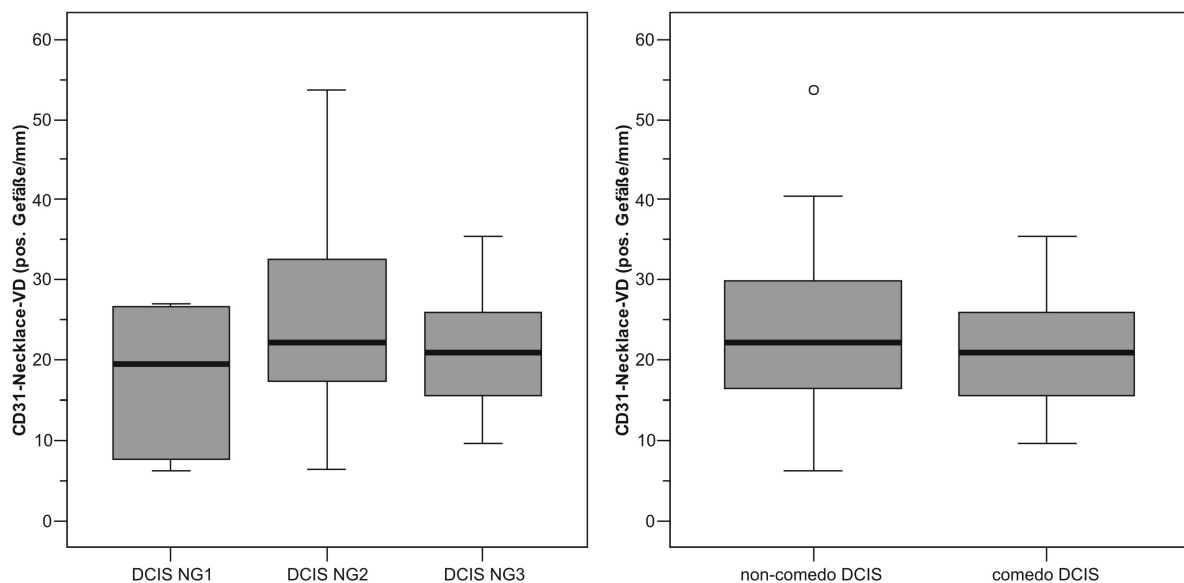


Abbildung 22: Boxplots zur Darstellung der CD31-Necklace-Vessel-Density (Necklace-VD) in den Subtypen des Ductalen Carcinoma In Situ (DCIS) Nuclear Grade (NG) 1-3 sowie non-comedo und comedo.

Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Subtypen bezüglich der CD31-Necklace-VD.

○ = Ausreißer außerhalb

### 5.3.4 Auswertung der CD31-FI

Im Gegensatz zur CD105-Färbeintensität steigt die CD31-Färbeintensität vom Normalgewebe zum DCIS nicht signifikant an ( $p=0,063$ ). Ansonsten kommt es aber innerhalb der proklamierten Karzinogenese-Sequenz zu einem jeweils signifikanten Anstieg der CD31-Färbeintensität.

Innerhalb der DCIS-Grade NG1 bis NG3 bzw. non-comedo und comedo DCIS finden sich keine signifikanten Unterschiede der CD31-FI.

Zwischen den benignen Mamma-Läsionen Adenose, Fibroadenom und Papillom bestehen ebenfalls keine signifikanten CD31-FI-Unterschiede. Jedoch ist die CD31-FI in allen drei Gewebearten signifikant höher als im DCIS (Adenose  $p=0,047$ ; Fibroadenom  $p<0,001$ ; Papillom  $p=0,008$ ).



### 5.3.5 Korrelationen zwischen CD31-MVD und CD31-Necklace-VD

Für die CD31-MVD und die CD31-Necklace-VD gilt, dass sie sowohl im DCIS als auch im IDC positiv miteinander korrelieren. Das bedeutet, dass ein hohe CD31-MVD in der Regel auch mit einer hohen CD31-Necklace-VD einhergeht (s. Tab. 9). Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 23 das entsprechende Streudiagramm.

Tabelle 9: Korrelationen zwischen CD31-MVD und CD31-Necklace-VD

Gewebe	Korrelationskoeffizient nach Spearman	Signifikanz (2-seitig)
DCIS	0,429	<0,001 ***
intraductale IDC-Komponente	0,654	<0,001 ***

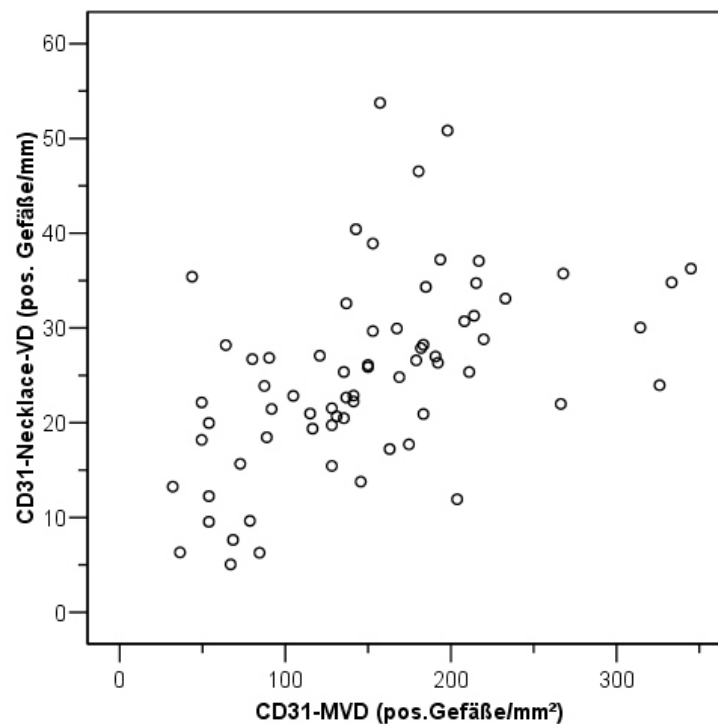


Abbildung 23: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen CD31-Microvessel-Density (MVD) und CD31-Necklace-Vessel-Density (Necklace-VD) im Ductalen Carcinoma In Situ (DCIS) und invasiver Komponente eines Invasiv Ductalen Karzinoms (IDC) der Mamma.

#### 5.4 Analyse des Quotienten CD105/CD31-MVD

Der Quotient CD105/CD31-MVD spiegelt den Anteil der aktivierten Gefäße (repräsentiert durch CD105) an der Gesamtgefäßzahl (repräsentiert durch CD31) wieder. Eine Übersicht über Mediane, Mittelwerte und Standardabweichungen des Quotienten CD105/CD31-MVD in den einzelnen Geweben geben die Tabellen 10 und 11. Aus ihnen ist u. a. bereits ersichtlich, dass der CD105/CD31-MVD-Quotient innerhalb der proklamierten Tumorgenese-Sequenz tendenziell ansteigt. Zur anschaulichen Darstellung wurden Boxplots gewählt.

Tabelle 10: Darstellung der Mediane, Mittelwerte und Standardabweichungen (s) des Quotienten CD105/CD31-MVD aufgeteilt nach den einzelnen Gewebearten

<b>Gewebe Fallzahl n</b>	<b>Maß</b>	<b>CD105/CD31-MVD</b>
Normalgewebe n=37	Mittelwert±s	0,09±0,17
	Median	0,03
DCIS n=38	Mittelwert±s	0,44±0,33
	Median	0,37
intraductale IDC-Komponente n=25	Mittelwert±s	0,51±0,22
	Median	0,54
invasive IDC-Komponente n=23	Mittelwert±s	0,80±0,32
	Median	0,80
Adenose n=10	Mittelwert±s	0,36±0,42
	Median	0,18
Fibroadenom n=19	Mittelwert±s	1,24±1,43
	Median	0,72
Papillom n=8	Mittelwert±s	0,63±0,27
	Median	0,60
Insgesamt n=160	Mittelwert±s	0,52±0,65
	Median	0,44

Tabelle 11: Darstellung der Mediane, Mittelwerte und Standardabweichungen (s) des Quotienten CD105/CD31-MVD in DCIS NG1 bis NG3 sowie in non-comedo und comedo DCIS

<b>Gewebe Fallzahl n</b>	<b>Maß</b>	<b>CD105/CD31-MVD</b>
DCIS NG1 n=5	Mittelwert±s	0,18±0,26
	Median	0,02
DCIS NG2 n=11	Mittelwert±s	0,44±0,34
	Median	0,37
DCIS NG3 n=22	Mittelwert±s	0,51±0,33
	Median	0,43
non-comedo DCIS n=16	Mittelwert±s	0,34±0,32
	Median	0,24
comedo DCIS n=22	Mittelwert±s	0,51±0,33
	Median	0,43

Innerhalb der angenommenen Karzinogenese-Sequenz findet sich ein signifikanter Anstieg (alle  $p < 0,001$ ) des Anteils CD105-positiver Gefäße an der Gesamtgefäßzahl (repräsentiert durch CD31). Lediglich der Übergang vom reinen DCIS zur intraductalen IDC-Komponente zeigt nur einen tendenziellen, jedoch keinen signifikanten Anstieg des CD105-MVD/CD31-MVD-Quotienten ( $p = 0,206$ ; s. Abb. 24).

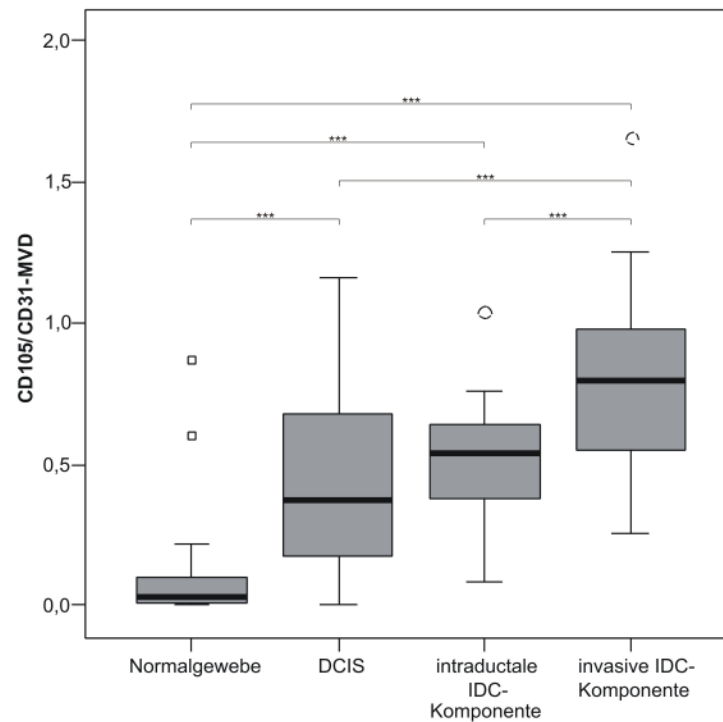


Abbildung 24: Boxplot zur Darstellung des Quotienten CD105/CD31-MVD.

Der Anteil der CD105-positiven Gefäße an der Gesamtgefäßzahl nimmt mit Ausnahme des Übergangs vom Ductalen Carcinoma In Situ (DCIS) zu intraductaler Komponente Invasiv Ductaler Karzinome (IDC) innerhalb der proklamierten Karzinogenese-Sequenz signifikant zu.

\*\*\*  $p < 0,001$ ; ○ = Ausreißer außerhalb; □ = Ausreißer weit außerhalb

Innerhalb der DCIS findet sich im NG3 ein signifikant höherer CD105/CD31-MVD-Quotient als im NG1 ( $p=0,031$ ). Von DCIS NG1 zu DCIS NG2 ist zwar auch ein Anstieg des Quotienten zu vermerken, jedoch ist dieser nicht signifikant ( $p=0,066$ ). Zwischen DCIS NG2 und NG3 sowie zwischen non-comedo und comedo DCIS finden sich zwar tendenzielle (s. Tab. 11), jedoch keine signifikanten Unterschiede der CD105/CD31-MVD-Quotienten (s. Abb. 25).

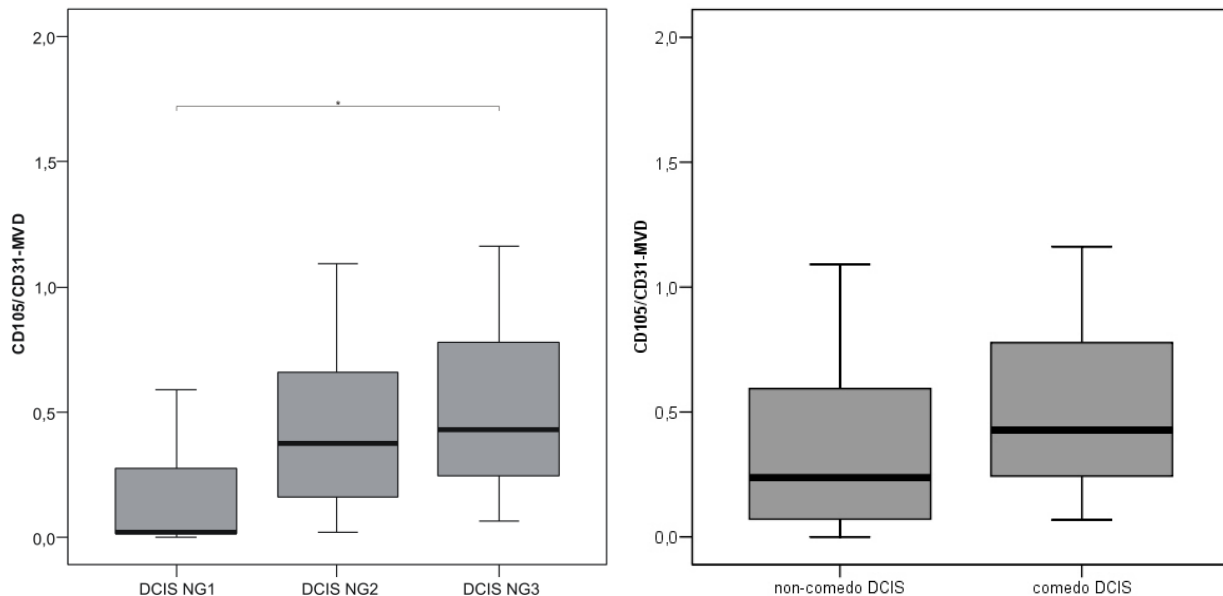


Abbildung 25: Boxplot zur Darstellung des jeweiligen Anteils der CD105-Microvessel-Density (MVD) an der CD31-MVD in Nuclear Grade (NG) 1-3 sowie in non-comedo und comedo Ductalen Carcinomata In Situ (DCIS) der Mamma.

Der Quotient CD105/CD31-MVD ist in DCIS NG3 signifikant höher als in DCIS NG1 (\*  $p<0,05$ ). Weitere signifikante Unterschiede lassen sich nicht nachweisen.

Innerhalb der Gruppe der benignen Mamma-Läsionen ist der Anteil CD105-positiver Gefäße an der Gesamtgefäßzahl in Fibroadenomen signifikant höher als in Adenosen ( $p=0,005$ ) und in DCIS ( $p=0,002$ ). Weitere signifikante Unterschiede bestehen nicht.

## 5.5 Analyse des Quotienten CD105/CD31-Necklace-VD

Der Quotient CD105/CD31-Necklace-VD spiegelt den Anteil der angiogenen Gefäße (dargestellt durch CD105) an der Gesamtzahl der Ringgefäße (dargestellt durch CD31) wieder. Eine Übersicht über Mediane, Mittelwerte und Standardabweichungen des Quotienten CD105/CD31-Necklace-VD in den einzelnen Geweben geben die Tabellen 12 und 13.

Tabelle 12: Darstellung der Mediane, Mittelwerte und Standardabweichungen (s) des Quotienten CD105/CD31-Necklace-VD in DCIS und intraductalen IDC-Komponenten

<b>Gewebe Fallzahl n</b>	<b>Maß</b>	<b>CD105/CD31-Necklace-VD</b>
DCIS n=38	Mittelwert $\pm$ s	0,85 $\pm$ 0,72
	Median	0,64
intraductale IDC-Komponente n=25	Mittelwert $\pm$ s	0,99 $\pm$ 0,46
	Median	1,00

Tabelle 13: Darstellung der Mediane, Mittelwerte und Standardabweichungen (s) des Quotienten CD105/CD31-Necklace-VD in DCIS NG1-3 sowie in non-comedo und comedo DCIS

<b>Gewebe Fallzahl n</b>	<b>Maß</b>	<b>CD105/CD31-Necklace-VD</b>
DCIS NG1 n=5	Mittelwert $\pm$ s	0,35 $\pm$ 0,39
	Median	0,37
DCIS NG2 n=11	Mittelwert $\pm$ s	0,78 $\pm$ 0,41
	Median	0,82
DCIS NG3 n=22	Mittelwert $\pm$ s	1,02 $\pm$ 0,85
	Median	0,68
non-comedo DCIS n=16	Mittelwert $\pm$ s	0,62 $\pm$ 0,43
	Median	0,63
comedo DCIS n=22	Mittelwert $\pm$ s	1,02 $\pm$ 0,85
	Median	0,68

Es gibt nur einen tendenziellen, jedoch keinen signifikanten Anstieg des CD105/CD31-Necklace-VD-Quotienten vom DCIS zur intraductalen IDC-Komponente ( $p=0,074$ ; s. Abb. 26).

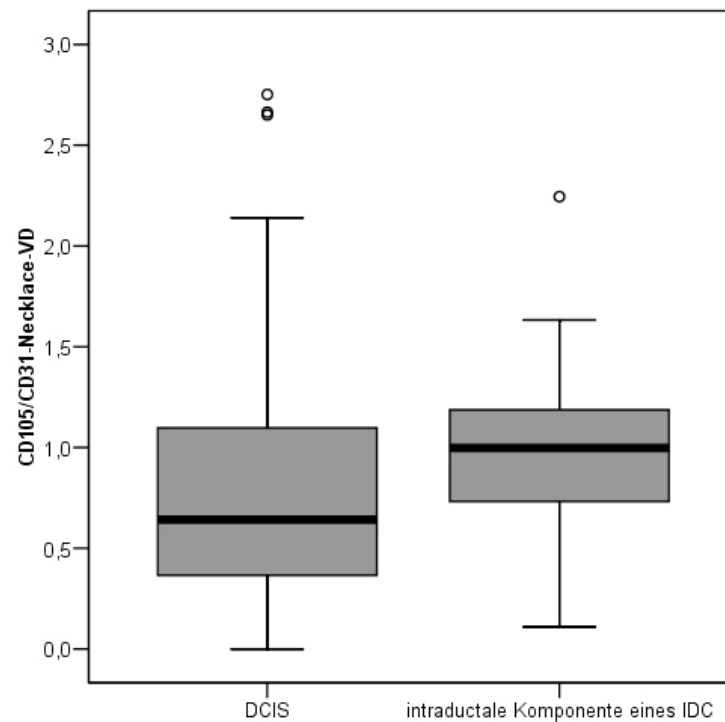


Abbildung 26: Boxplot zur Darstellung des Quotienten CD105/CD31-Necklace-Vessel-Density (Necklace-VD) im Ductalen Carcinoma In Situ (DCIS) und intraductaler Komponente Invasiv Ductaler Karzinome (IDC) der Mamma.

Es ist kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

○ = Ausreißer außerhalb

Der Anstieg des CD105/CD31-Necklace-VD-Quotienten vom NG1 zu NG 2 ( $p=0,066$ ) bzw. NG3 ( $p=0,053$ ) ist jeweils knapp nicht signifikant. Auch zwischen NG2 und NG3 sowie zwischen non-comedo und comedo DCIS sind keine signifikanten Unterschiede nachweisbar (s. Abb. 27).

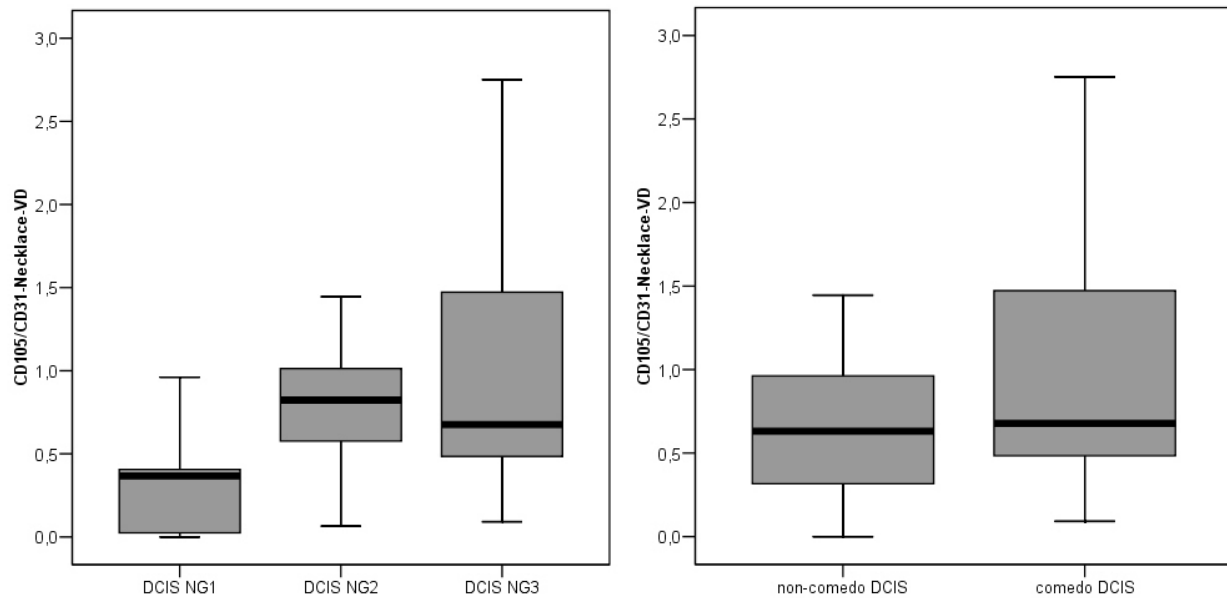


Abbildung 27: Boxplot zur Darstellung des Quotienten CD105/CD31-Necklace-Vessel-Density (Necklace-VD) in den Subtypen des Ductalen Carcinoma In Situ (DCIS) der Mamma Nuclear Grade (NG) 1-3 sowie in non-comedo und comedo DCIS.

Es sind keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

## 5.6 Korrelationen zwischen CD105 und CD31

### 5.6.1 Überblick

In diesem Abschnitt soll untersucht werden, ob MVD, Necklace-VD und Färbeintensität von CD31 und CD105 jeweils miteinander korrelieren, d. h. ob z. B. eine hohe CD105-MVD auch mit einer hohen CD31-MVD einhergeht. Einen histologischen Vergleich zeigt die Abbildung 28.

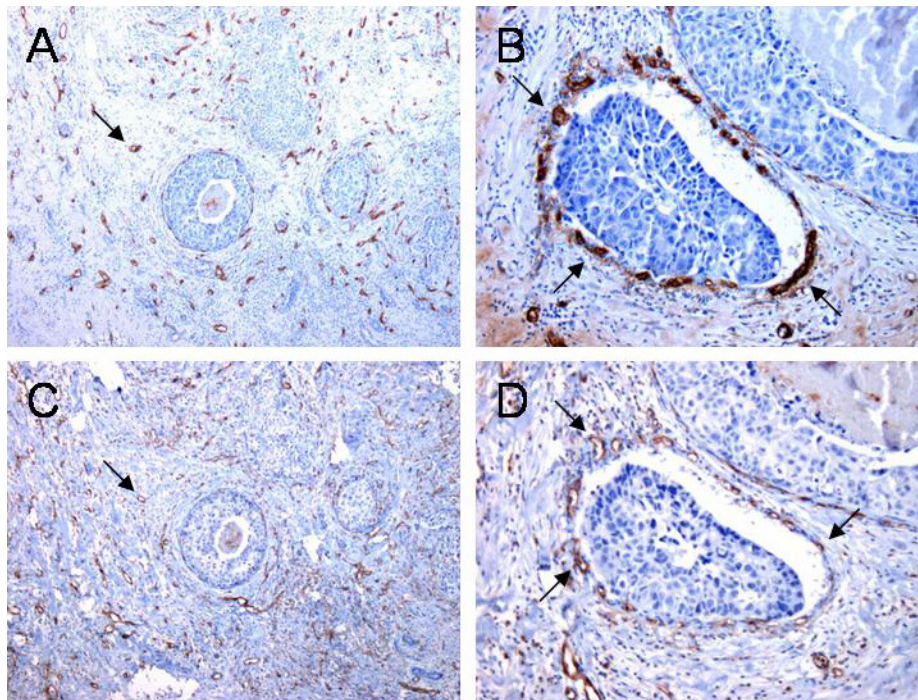


Abbildung 28: Vergleich CD105 (A, B) und CD31 (C, D) im gleichen Fall eines Invasiv Ductalen Karzinoms der Mamma. Die Pfeile markieren die braun gefärbten Gefäße. Jeweils 40x (A, C) und 100x (B, D) Vergrößerung.

### 5.6.2 Korrelationen zwischen CD105- und CD31-MVD

Zieht man alle 160 Fälle in die Untersuchung auf Korrelationen zwischen der CD105-MVD und der CD31-MVD mit ein, so ergibt sich eine positive Korrelation (s. Tab. 14). Trennt man die Fälle allerdings nach Gewebeart auf, so ergibt sich eine positive Korrelation zwischen der CD105-MVD und der CD31-MVD nur in DCIS.

Tabelle 14: Korrelationen von CD105- und CD31-Microvessel-Density

Gewebe	Korrelationskoeffizient nach Spearman	Signifikanz (2-seitig)
Gesamt	0,476	<0,001 ***
Normalgewebe	0,265	0,113
DCIS	0,330	0,046 *
intraductale IDC-Komponente	0,202	0,332
invasive IDC-Komponente	0,342	0,110
benigne Mamma-Läsionen	0,091	0,593



### 5.6.3 Korrelationen zwischen CD105- und CD31-Necklace-VD

Tabelle 15 zeigt, dass die CD105- und die CD31-Necklace-VD positiv miteinander korrelieren, wenn sowohl die reinen DCIS als auch die intraductalen IDC-Komponenten in die Untersuchung mit eingezogen werden. Trennt man die Fälle aber in die beiden Gewebearten auf, so ergibt sich keine Korrelation.

Tabelle 15: Korrelationen zwischen CD105- und CD31-Necklace-Vessel-Density

Gewebe	Korrelationskoeffizient nach Spearman	Signifikanz (2-seitig)
Gesamt	0,352	0,005 **
DCIS	0,112	0,508
intraductale IDC-Komponente	0,305	0,138

## 5.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 16: Übersicht über die Gesamtergebnisse

Untersuchte Größe	Ergebnis
CD105-MVD	<ul style="list-style-type: none"> <li>Die CD105-MVD ist im Normalgewebe sehr gering.</li> <li><b>Es konnte ein signifikanter Anstieg der CD105-MVD ausgehend vom Normalgewebe über DCIS, intraductale IDC-Komponente mit höchster CD105-MVD in der invasiven IDC-Komponente (alle <math>p &lt; 0,001</math>) nachgewiesen werden.</b></li> <li><b>Es konnten keine signifikanten Unterschiede der CD105-MVD zwischen den einzelnen DCIS-Kerngraden und Subtypen nachgewiesen werden.</b></li> <li><b>Die CD105-MVD ist in Adenosen, Fibroadenomen und Papillomen jeweils signifikant höher als im Normalgewebe (alle <math>p &lt; 0,001</math>).</b></li> <li><b>Die CD105-MVD in Fibroadenomen (<math>p &lt; 0,001</math>) und Papillomen (<math>p = 0,001</math>) ist jeweils signifikant höher als in DCIS.</b></li> <li>Die CD105-MVD in Fibroadenomen (<math>p = 0,012</math>) und Papillomen (<math>p = 0,023</math>) ist jeweils signifikant höher als in Adenosen.</li> </ul>
CD105-Necklace-VD	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Die CD105-Necklace-VD in der intraductalen IDC-Komponente ist signifikant höher als im reinen DCIS (<math>p &lt; 0,001</math>).</b></li> <li><b>Die CD105-Necklace-VD in DCIS NG3 ist signifikant höher als in DCIS NG1 (<math>p = 0,029</math>).</b></li> <li><b>Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen comedo und non-comedo DCIS nachgewiesen werden.</b></li> </ul>
CD105-FI	<ul style="list-style-type: none"> <li>Die CD105-FI im Normalgewebe ist signifikant geringer als in DCIS und IDC (alle <math>p &lt; 0,001</math>).</li> <li>Die CD105-FI ist in invasiven IDC-Komponenten signifikant höher als in DCIS (<math>p = 0,03</math>).</li> <li>Die CD105-FI im DCIS NG2 ist signifikant höher als im NG1.</li> <li>Signifikante Unterschiede in der CD105-FI zwischen DCIS NG1 und NG3 bzw. NG2 und NG3 sowie zwischen comedo und non-comedo DCIS konnten nicht nachgewiesen werden.</li> <li>Die CD105-FI in Fibroadenomen ist signifikant höher als in Adenosen (<math>p = 0,03</math>).</li> </ul>
Korrelationen zwischen CD105-MVD und CD105-Necklace-VD	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Es besteht eine positive Korrelation zwischen CD105-MVD und CD105-Necklace-VD sowohl in DCIS (Korrelationskoeffizient nach Spearman=<math>0,727</math>; <math>p &lt; 0,001</math>) als auch in intraductaler IDC-Komponente (Korrelationskoeffizient nach Spearman=<math>0,627</math>; <math>p &lt; 0,001</math>).</b></li> </ul>

Untersuchte Größe	Ergebnis
CD31-MVD	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Bezüglich der CD31-MVD konnte kein signifikanter Unterschied zwischen DCIS und Normalgewebe nachgewiesen werden.</b></li> <li>• Die CD31-MVD in intraductalen und invasiven IDC-Komponenten ist jeweils signifikant höher als im Normalgewebe und im DCIS (alle <math>p &lt; 0,001</math>).</li> <li>• Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der CD31-MVD zwischen den einzelnen DCIS-Kerngraden und -Subtypen nachweisen.</li> <li>• Die CD31-MVD in Adenosen (<math>p=0,03</math>) und Papillomen (<math>p=0,001</math>) ist jeweils signifikant höher als im DCIS.</li> <li>• Die CD31-MVD in Adenosen (<math>p=0,041</math>) und Fibroadenomen (<math>p=0,009</math>) ist signifikant höher als in Fibroadenomen.</li> </ul>
CD31-Necklace-VD	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Die CD31-Necklace-VD in intraductalen IDC-Komponenten ist signifikant höher als in reinen DCIS (<math>p=0,001</math>).</li> <li>• Innerhalb der DCIS-Kerngrade und -Subtypen waren keine signifikanten Unterschiede in der CD31-Necklace-VD nachweisbar.</li> </ul>
CD31-FI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es war kein signifikanter Unterschied der CD31-FI zwischen DCIS und Normalgewebe nachweisbar.</li> <li>• Die CD31-FI in intraductaler und invasiver IDC-Komponente und in benignen Läsionen ist jeweils signifikant höher als im Normalgewebe (alle <math>p &lt; 0,001</math>).</li> <li>• Die CD31-FI in intraductaler (<math>p=0,017</math>) und invasiver (<math>p &lt; 0,001</math>) IDC-Komponente ist jeweils signifikant höher als im DCIS.</li> <li>• Die CD31-FI ist in invasiven IDC-Komponenten signifikant höher als in intraductalen IDC-Komponenten (<math>p=0,01</math>).</li> <li>• Die CD31-FI in Adenosen (<math>p=0,047</math>), Fibroadenomen (<math>p &lt; 0,001</math>) und Papillomen (<math>p=0,008</math>) ist jeweils signifikant höher als in DCIS.</li> </ul>
Korrelationen zwischen CD31-MVD und CD31-Necklace-VD	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Die CD31-MVD und CD31-Necklace-VD korrelieren sowohl in DCIS (Korrelationskoeffizient nach Spearman=<math>0,429</math>; <math>p &lt; 0,001</math>) als auch in intraductalen IDC-Komponenten (Korrelationskoeffizient nach Spearman=<math>0,654</math>; <math>p &lt; 0,001</math>) positiv miteinander.</li> </ul>
Quotient CD105/CD31-MVD	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Innerhalb der angenommenen Karzinogenese-Sequenz ist ein signifikanter Anstieg des CD105/CD31-MVD-Quotienten (alle <math>p &lt; 0,001</math>), mit Ausnahme des Übergangs vom reinen DCIS zur intraductalen IDC-Komponente (<math>p=0,206</math>) nachweisbar.</b></li> <li>• <b>Innerhalb der DCIS-Kerngrade und -Subtypen ist lediglich zwischen DCIS NG1 und NG3 (<math>p=0,031</math>) ein signifikanter Unterschied nachweisbar.</b></li> <li>• Der Quotient CD105/CD31-MVD ist in Fibroadenomen signifikant höher als in Adenosen (<math>p=0,005</math>) und DCIS (<math>p=0,002</math>).</li> </ul>
Quotient CD105/CD31-Necklace-VD	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Signifikante Unterschiede des CD105/CD31-Necklace-VD-Quotienten zwischen den einzelnen DCIS-Kerngraden und Subtypen konnten nicht nachgewiesen werden.</b></li> </ul>

---

<b>Untersuchte Größe</b>	<b>Ergebnis</b>
Korrelationen zwischen CD105- und CD31-MVD	– Eine positive Korrelation von CD105-MVD und CD31-MVD konnte in DCIS (Korrelationskoeffizient nach Spearman=0,330; p=0,046) sowie unter Einbeziehung aller 160 Fälle (Korrelationskoeffizient nach Spearman=0,476; p<0,001) nachgewiesen werden.
Korrelationen zwischen CD105- und CD31-Necklace-VD	– Eine positive Korrelation von CD105- und CD31-Necklace-VD ist nur unter Zusammenfassung von DCIS und intraductaler IDC-Komponente zu einer Gesamtgruppe (p<0,001) nachweisbar, nicht jedoch bei einzelner Untersuchung beider Gewebe.
DCIS-TMA	– <b>Die DCIS- und auch die Stroma-Ausschnitte sind sehr klein, dadurch ist eine „hot spot“-Bestimmung kaum möglich.</b> – <b>Oft fehlt die Darstellung des Tumorrandes und somit des Ring-Phänomens.</b>

---

## 6 DISKUSSION

### 6.1 Beurteilung der Methodik

#### 6.1.1 Beurteilung des Materials

Alle Untersuchungen wurden an FFPE-Gewebe vorgenommen. Dieses zeichnet sich zwar durch einen guten Erhalt der morphologischen Strukturen aus, jedoch ist die Reaktivität mit Antikörpern bei immunhistochemischen Färbungen im Vergleich zu Kryo-Gewebe oft vermindert. Somit wird in Kryo-Geweben oft eine höhere MVD bestimmt als in FFPE-Geweben. Da bisher aber kaum Gefrierschnitte von DCIS verfügbar sind, musste in dieser Arbeit auf FFPE-Gewebe zurückgegriffen werden.

Das als Vergleichsgewebe untersuchte Normalgewebe stammt aus den gleichen Präparaten wie das DCIS. Zwar wurden nur sicher vom DCIS abgrenzbare Bereiche in die Auswertung mit einbezogen, trotzdem ist nicht auszuschließen, dass an DCIS angrenzendes Normalgewebe bereits morphologisch nicht sichtbare Veränderungen aufweist. Somit können sich unter Umständen verfälschte Werte ergeben.

Das Grading der DCIS-Fälle in NG1 bis NG3 sowie die Einteilung in comedo und non-comedo DCIS wurden zwar von einem erfahrenen Pathologen vorgenommen, jedoch haben Studien gezeigt, dass diese Einteilung einer teilweise erheblichen Beobachter-Variabilität unterliegen.

#### 6.1.2 Beurteilung der qualitativen Färbeergebnisse

Die immunhistochemischen Färbungen sowohl von CD105 als auch von CD31 waren sehr spezifisch und ermöglichten dadurch eine gute quantitative Auswertung. Allerdings sind die Gewebeschnitte bei der Färbung von CD31 durch die thermische Vorbehandlung zum Teil stark zerstört worden. Dies betraf hauptsächlich DCIS-Präparate, da sich deren großer Fett- und Bindegewebs-Anteil beim Kochen leichter von den Objektträgern löste als beispielsweise die Tumorepithelien der invasiven Mammakarzinome. Deshalb mussten einige Färbungen wiederholt werden. Es bleibt festzuhalten, dass eine thermische Vorbehandlung im Überdrucktopf bei immunhistochemischen Färbungen von DCIS möglichst vermieden werden sollte.

Die Färbung des DCIS-TMA ergab kaum verwertbare Ergebnisse, da die Ausschnitte aus dem Gewebe zu klein waren. So waren die entscheidenden Gangabschnitte teilweise gar nicht oder nur unvollständig vorhanden. Auch das umliegende Stromagewebe fehlte oft, sodass keine Bestimmung von „hot spots“ erfolgen konnte. Somit ist die Verwendung von TMAs für die Evaluation der MVD und der Necklace-VD in DCIS eher ungeeignet.

### 6.1.3 Beurteilung der quantitativen Auswertung

Die Bestimmung der MVD erfolgte in Anlehnung an die von Weidner et. al. 1991 entwickelte Methodik [47]. Da es aber keinen einheitlichen Standard zur Bestimmung der MVD gibt, können sich Unterschiede zu den Ergebnissen anderer Arbeiten auch durch Unterschiede in der Methodik ergeben. Diese Unterschiede betreffen u. a. die Wahl des Messfeldes („hot spots“ versus zufällig gewählte Areale), die Größe des Messfeldes, die Anzahl der ausgewerteten Messfelder sowie die prinzipielle Art der Auswertung (manuelle Auszählung versus computer-gestützte Auswertung). Auch dazu, welche Strukturen eindeutig als Mikrogefäße zu identifizieren sind, gibt es keine eindeutigen Definitionen. Gerade bei der Untersuchung von DCIS, die oft nur sehr kleine Läsionen darstellen, ist zudem nicht genau definiert, in welchen Arealen genau die MVD bestimmt werden sollte. In der hier vorgelegten Arbeit wurden nur den betroffenen Gangabschnitten direkt anliegende Hot-Spot-Areale in 400facher Vergrößerung ausgewertet, um eine Abgrenzung vom umgebenden Normalgewebe zu ermöglichen. Andere Forscher hingegen haben beliebige Areale zwischen betroffenen Gangabschnitten oder bestimmte Zirkumferenzen (z. B. 100 µm oder 500 µm) von befallenen Gangabschnitten untersucht.

Auch zur Quantifizierung des Ring-Phänomens existieren unterschiedlichste Methoden. Manche Arbeitsgruppen werten nur die direkt an der Basalmembran betroffener Gangabschnitte angrenzenden Gefäße als Necklace-Vessels, während andere einen definierten (je nach Beobachter unterschiedlichen) Bereich um das DCIS herum in die Auswertung mit einbeziehen. Dabei wird oft nur angegeben, ob das Ring-Phänomen nachweisbar ist oder nicht (in Abhängigkeit davon, wie hoch der von Ringgefäßen umgebene Anteil des betroffenen Ganges ist) [45, 69, 168]. In dieser Arbeit wurde eine einfache Methodik entwickelt, mit deren Hilfe die Quantifizierung des Ring-Phänomens objektiviert wird. Dazu wurde die Anzahl der direkt an die Basalmembran angrenzenden Ringgefäße auf den Umfang des entsprechenden Gangabschnittes bezogen. Die Bestimmung dieser sogenannten Necklace-VD hat sich in dieser Arbeit gut bewährt und ihr Einsatz kann für folgende Arbeiten empfohlen werden. Die allgemeine Formel hierfür lautet:

Necklace-VD = Anzahl gefärbter Ringgefäße/Umfang des ausgezählten Gangabschnittes [mm].

Einen wichtigen Einfluss auf die Bestimmung der MVD und der Necklace-VD hat auch die Wahl des Gefäßmarkers. Insbesondere zwischen den einzelnen Panendothelmarkern gibt es zum Teil erhebliche Unterschiede im Färbeverhalten.

Ein entscheidender Unterschied zwischen Panendothelmarkern und CD105 besteht darin, dass Panendothelmarker auch die vom Tumor inkorporierten Gefäße und somit fast alle Gefäße färben, während CD105 als Marker für Neoangiogenese nur „aktivierte“ Endothelzellen und damit wesentlich weniger Blutgefäße färbt. Das erklärt auch, warum mit Panendothelmarkern in der Regel (und auch in dieser Arbeit) eine höhere MVD bestimmt wird, als mit CD105. Weitere wichtige Unterschiede bestehen darin, dass Panendothelmarker wahrscheinlich mit Tumorgefäßen nicht so gut reagieren wie mit normalen Endothelien und außerdem eher größere Gefäße färben [55, 75].

Trotz aller Bemühungen um Objektivität unterliegt die Auswertung immunhistochemischer Färbungen subjektiven Einflüssen und ist deshalb insgesamt als semiquantitativ zu bezeichnen.

#### **6.1.4 Beurteilung der statistischen Auswertung**

Die Fallzahlen der untersuchten DCIS-Gewebe sind relativ gering, das gilt insbesondere bei nochmaliger Unterteilung der DCIS in die einzelnen Kerngrade. Da DCIS bis vor kurzem jedoch nur selten diagnostiziert wurden, sind entsprechende Präparate in den Klinikarchiven noch in nur geringen Mengen vorhanden. Mit steigender Inzidenz sollten aber in Zukunft mehr Präparate für Untersuchungen zur Verfügung stehen, sodass die Ergebnisse der hier exemplarisch untersuchten Fälle durch Untersuchungen mit höheren Fallzahlen untermauert werden können.

Aus den Übersichtstabellen der Mittelwerte, Standardabweichungen und Mediane ist ersichtlich, dass die erhaltenen Messwerte nicht normalverteilt sind. Das wurde in der Auswertung durch die Verwendung nicht-parametrischer Tests berücksichtigt. Trotzdem ist die Fallzahl, gerade in Bezug auf DCIS NG1 sehr gering, sodass die statistischen Berechnungen nur zurückhaltend interpretiert werden sollten. Fehlende Signifikanzen können prinzipiell entweder darauf beruhen, dass tatsächlich keine signifikanten Unterschiede vorhanden sind oder die Fallzahl zum Nachweis vorhandener Signifikanzen zu gering ist. Deshalb sollten der Nachweis bzw. auch das Fehlen von Signifikanzen generell vorsichtig interpretiert werden.

In der Auswertung innerhalb der hier angenommenen Karzinogenese-Sequenz wurden alle 38 DCIS als eine Gruppe betrachtet, ohne Beachtung dessen, dass darin die einzelnen DCIS-Kerngrade in unterschiedlicher Anzahl vertreten sind. So weisen nur 5 Fälle den NG1, aber 22 Fälle den NG3 auf. Das hätte in der statistischen Auswertung berücksichtigt werden können, wurde aber auf Grund der sehr geringen Fallzahlen unterlassen. Außerdem spiegelt die Verteilung der Kerngrade in der Gruppe der DCIS auch in etwa die wirkliche Verteilung der DCIS in der Klinik wieder, was ein Zusammenfassen wiederum rechtfertigt.

## 6.2 Beurteilung der Ergebnisse

Unter den oben genannten Vorbehalten erfolgt nun eine Analyse der erhaltenen statistischen Ergebnisse. Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der immunhistochemischen Analyse der CD105-Expression im DCIS sowie auf deren Vergleich mit anderen Geweben der Mamma.

Die Analyse der **CD105-MVD** innerhalb der hier angenommenen Karzinogenese-Sequenz *Normalgewebe* → *DCIS* → *intraductale IDC-Komponente* → *invasive IDC-Komponente* ergab einen signifikanten Anstieg ausgehend vom Normalgewebe, mit höchster CD105-MVD in invasiven Karzinomen. Dies lässt auf eine gesteigerte angiogene Aktivität mit zunehmender Malignität (bzw. zunehmender Proliferationsrate) von Mammatumoren schließen. Ein statistisch signifikanter Anstieg der CD105-MVD von DCIS NG1 zu NG3 bzw. von non-comedo zu comedo DCIS konnte zwar nicht nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich eine Tendenz zu höheren CD105-MVDs in höhergradigen Läsionen. Diese könnte eventuell durch Untersuchungen mit größeren Fallzahlen validiert werden. Das würde mit den oben genannten Ergebnissen harmonieren. Somit könnte eine verstärkte Angiogenese das Fortschreiten eines DCIS in einen höheren Kerngrad oder auch in ein invasives Mammakarzinom ermöglichen bzw. andererseits höhergradige, schnell-proliferierende Läsionen eine vermehrte Fähigkeit zur Angiogeneseinduktion haben. Andererseits schließen diese Ergebnisse nicht aus, dass die einzelnen DCIS-Kerngrade und auch DCIS verglichen mit IDC völlig unterschiedliche Entitäten mit lediglich unterschiedlichem angiogenen Potential darstellen. Einen Rückschluss auf die Mamma-Karzinogenese lassen diese Ergebnisse allein somit nicht zu. Dafür könnte die Bestimmung der CD105-MVD hilfreich für die Prognostik sein. Für invasive Mammakarzinome wurde CD105 bereits als unabhängiger prognostischer Faktor bestätigt [116, 117]. Eventuell könnte für die CD105-MVD im DCIS eine ähnliche prognostische Relevanz nachgewiesen werden wie für den Kerngrad. So könnten die Ausreißer-Werte der CD105-MVD in den einzelnen Kerngraden Läsionen darstellen, deren Risiko zur Progression in ein invasives Mammakarzinom erhöht ist.

Da die CD105-MVD im DCIS signifikant höher ist als im Normalgewebe der Mamma, bietet sie außerdem einen guten Ansatz für die DCIS-Diagnostik. Für einen DCIS-Screeningtest mittels immunfluoreszenzbasierter *in-vivo*-Detektion ist neben der Abgrenzung des DCIS von weiteren benignen und malignen Mamma-Läsionen vor allem die Abgrenzung zum Normalgewebe wichtig. Dies ist hier gegeben, d. h. CD105 erfüllt diese wichtige Anforderung als Grundvoraussetzung für die Spezifität eines solchen Testverfahrens.



In dieser Untersuchung konnte ein signifikanter Anstieg der **MVD** vom Normalgewebe zum DCIS nur für CD105, nicht aber für **CD31** nachgewiesen werden. Das unterstreicht die Annahme, dass CD105 wesentlich stärker angiogenese-assoziiert ist als der Panendothelmarker CD31. So ist die Gesamtgefäßzahl im DCIS nur mäßig erhöht, der Anteil der aktivierten Gefäße nimmt aber stark zu. Das Gleiche gilt für intraductale und invasive Komponenten von IDC, für die eine signifikante Zunahme der MVD ebenfalls nur für CD105 und nicht für CD31 gezeigt werden konnte. Eine Erklärung für die zwei genannten Ergebnisse könnte sein, dass die Gesamtgefäßzahl sich vor allem zwischen reinen in-situ-Karzinomen und invasiven Karzinomen insgesamt (sowohl intraductale als auch invasive Komponente) sprunghaft erhöht, der Anteil der aktivierten Gefäße jedoch kontinuierlich ansteigt. Damit könnte auch erklärt werden, warum das Verhältnis **CD105/CD31-MVD** zwischen reinen DCIS und DCIS-Komponenten in IDC nicht signifikant ansteigt, denn zwischen beiden Entitäten kommt es zu sowohl zu einem signifikanten Anstieg von CD105-MVD als auch von CD31-MVD, sodass das Verhältnis zwischen beiden insgesamt annähernd gleich bleibt. Der ausbleibende Anstieg der CD31-MVD von intraductaler zu invasiver IDC-Komponente könnte aber auch darauf hinweisen, dass die Tumorgröße schneller zunimmt als die Angiogenese, wodurch die Gesamtgefäßzahl nicht weiter ansteigt, der Anteil angiogener Gefäße aber zum Ausgleich erhöht ist. Des Weiteren zeigt die CD31-MVD keine Assoziation mit dem DCIS-Kerngrad oder der comedo/non-comedo-Subtypisierung. Entgegen den Ergebnissen mit CD105 ergeben sich sogar tendenziell niedrigere Gefäßdichten in comedo und NG3 DCIS als in non-comedo und NG2 DCIS. Die niedrigste Gefäßdichte wurde jedoch im NG1 nachgewiesen. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass, wie bereits schon von Teo et al. [169] vermutet, die Angiogenese in den am schnellsten wachsenden DCIS-Typen nicht mehr mit dem Tumorwachstum mithält, weshalb die Gesamtgefäßzahl sinkt, die Anzahl der aktivierten Gefäße aber zum Ausgleich erhöht ist. Allerdings schreiten selbst höhergradige reine DCIS in der Regel nur relativ langsam fort, sodass die oben genannte Vermutung eher als unwahrscheinlich einzustufen ist. Da die CD105-MVD mit zunehmendem Kerngrad bzw. im comedo Subtyp tendenziell erhöht ist, die CD31-MVD jedoch tendenziell eher niedriger ist, ist auch nicht verwunderlich, dass damit der Quotient CD105/CD31-MVD in höhergradigen Läsionen eine Tendenz zu höheren Werten zeigt. Der Anstieg des Quotienten von NG1 zu NG3 ist dabei sogar signifikant.

Zur Quantifizierung des Ring-Phänomens in DCIS wurde in dieser Arbeit die metrische Größe **Necklace-VD** eingeführt. Dabei wurde die Anzahl der positiv gefärbten Gefäße, die der Basalmembran tumorgefüllter Gangabschnitte direkt anlagen, bestimmt und in Relation zum Umfang des entsprechenden Gangabschnittes gesetzt. Die Necklace-VD ergab sowohl für CD105 als auch für CD31 in reinen DCIS signifikant niedrigere Werte als in DCIS-Komponenten invasiver Karzinome. Auch dieses Ergebnis spricht für eine vermehrte Angiogenese in invasiven Karzinomen. Auch bei Unterteilung der DCIS in die Kerngrade ergab sich eine Tendenz zu einer höheren CD105-Necklace-VD in aggressiveren Läsionen, dabei konnte jedoch nur für NG3 verglichen mit NG1 eine Signifikanz nachgewiesen werden. Der Unterschied zwischen NG2 und NG1 war mit  $p=0,05$  per definitionem nicht signifikant. Bei der Bestimmung der Necklace-VD mit Hilfe von CD31 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen DCIS-Graden und -Subtypen. Auch der Anteil der aktivierten an den gesamten Ringgefäßen, repräsentiert durch die CD105/CD31-Necklace-VD, nimmt innerhalb der DCIS-Kerngrade und -Subtypen sowie auch von reinen DCIS zur DCIS-Komponente in IDC nur tendenziell zu. Dies macht deutlich, dass höhere Fallzahlen zur Analyse notwendig sind. Nichtsdestotrotz zeigen diese Ergebnisse einen Trend zu einer vermehrten Aktivierung der Ringgefäße in aggressiveren Läsionen.

Die positive **Korrelation von MVD und Necklace-VD** sowohl bei Darstellung von CD105 als auch von CD31 weist darauf hin, dass die Angiogenese in DCIS insgesamt gesteigert ist, und nicht, wie zum Beispiel von anderen Autoren vermutet, nur an den Ringgefäßen.

Um die theoretische Anwendbarkeit eines anti-CD105-AK zur DCIS-Diagnostik zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit exemplarisch auch **benigne Mamma-Läsionen** in die Untersuchung eingeschlossen. Interessanterweise ergab sich in Fibroadenomen und Papillomen eine signifikant höhere CD105-MVD als in reinen DCIS. Dies wurde zumindest für die Papillome auch durch eine signifikant erhöhte CD31-MVD unterlegt. Diese signifikant höhere angiogene Aktivität könnte durch ein schnelleres Wachstum bedingt sein. So wurde bereits ein Zusammenhang zwischen hoher CD105-Expression und hohem Proliferationsindex nachgewiesen [78]. Schnell proliferierende Läsionen wie das Fibroadenom oder invasive Mammakarzinome sind in verstärktem Maße auf eine ausreichende Induktion der Angiogenese angewiesen. Im Gegensatz dazu schreiten DCIS relativ langsam fort. Diese Vermutung wird auch dadurch untermauert, dass der Anteil angiogener Gefäße an der Gesamtgefäßzahl, CD105/CD31-MVD, in benignen Läsionen und invasiven Karzinomen signifikant höher ist als im DCIS und im Normalgewebe.

Eine hohe CD105-MVD geht also nicht zwangsläufig mit erhöhter Malignität einher. Damit könnte theoretisch der Einsatz eines anti-CD105-mAK zur Diagnostik des DCIS eingeschränkt werden. Da detektierte Läsionen nicht nur DCIS (oder invasive Mammakarzinome) sondern auch benigne Läsionen bzw. Entzündungsherde darstellen könnten, müsste eine zusätzliche Abgrenzung der verschiedenen Läsionen erfolgen. Diese Abgrenzung ist jedoch durch Standarddiagnosemaßnahmen wie beispielsweise Biopsien, die bei Tumorverdacht routinemäßig durchgeführt werden, relativ genau möglich.

Da bis jetzt noch keine weiteren Untersuchungen über die CD105-MVD in Adenosen, Fibroadenomen und Papillomen vorliegen, bleibt festzuhalten, dass diese benignen Läsionen eine signifikant höhere CD105-MVD aufweisen als das Normalgewebe der Mamma. Gleiches gilt in Bezug auf die CD31-MVD, welche gegenüber dem Normalgewebe auch signifikant erhöht ist. Dass die CD105-MVD und das Verhältnis CD105/CD31-MVD in Fibroadenomen signifikant höher sind als in DCIS, könnte auf dessen höhere Proliferationsrate zurück zu führen sein. Interessant ist weiterhin, dass auch in Papillomen oft ein Ring-Phänomen nachweisbar war, welches jedoch in dieser Arbeit nicht weiter quantifiziert wurde. Es könnte darauf hinweisen, dass in Papillomen die Angiogenese besonders am Rand der Läsionen aktiviert wird.

Mit der **Korrelationsanalyse zwischen CD105 und CD31** sollte untersucht werden, ob z. B. eine hohe CD105-MVD auch gleichzeitig mit einer erhöhten CD31-MVD einhergeht. Zieht man alle 160 Fälle in die Korrelationsanalysen mit ein, so ergibt sich eine positive Korrelation von CD105 und CD31 sowohl in Bezug auf die MVD als auch auf die Necklace-VD. Dieser Zusammenhang ist jedoch in den einzelnen Geweben nicht nachweisbar. Das könnte damit zusammenhängen, dass die Korrelation eher gering und somit nur mit höheren Fallzahlen nachweisbar ist.

Die Analyse der **Färbeintensität** konnte teilweise die für die MVD nachgewiesenen Signifikanzen bestätigen. Jedoch konnten insgesamt wesentlich weniger signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Geweben nachgewiesen werden. Dies ist nicht verwunderlich, wenn man sich vor Augen führt, dass die Färbeintensität eine semiquantitativ bestimmte Größe innerhalb einer selbst als semiquantitativ zu bezeichnenden Methodik wie der Immunhistochemie darstellt. Der Bestimmung objektiverer Größen wie der MVD, ist somit in jedem Fall Vorzug zu geben, wobei dann möglicherweise auf die Bestimmung der Färbeintensität verzichtet werden könnte.

### 6.3 Vergleich mit anderen Arbeiten

Da es, wie bereits erwähnt, weder zur Bestimmung der MVD noch zur Beurteilung des Ring-Phänomens in DCIS einen einheitlichen Standard gibt, ist der Vergleich mit anderen Arbeiten schwierig. Nur eine Arbeitsgruppe hat parallel zu der hier vorgelegten Arbeit die MVD in DCIS mit Hilfe von CD31 und CD105 bestimmt. Mehrere weitere Arbeiten haben die MVD im DCIS mit Hilfe verschiedener Panendothelmarker bestimmt. Die Methodik und die Ergebnisse der Arbeiten differieren zum Teil beträchtlich. Deshalb sollen die wichtigsten Arbeiten an dieser Stelle kurz vorgestellt und ihre Ergebnisse diskutiert werden.

Der Schwerpunkt der hier vorgelegten Arbeit lag auf der Bestimmung der CD105-MVD und der CD105-Necklace-VD in DCIS und deren Vergleich mit anderen Mammageweben. Vogl et al. [168] sind die einzigen, die bisher ebenfalls die immunhistochemische CD105-Expression in DCIS untersucht haben. Auch sie haben den Panendothelmarker CD31 für Vergleichsfärbungen benutzt. In ihrer Arbeit haben sie 46 reine DCIS (26x non-comedo und 20x comedo bzw. 4x NG2 und 42x NG3) untersucht. Ihre Methodik war jedoch grundsätzlich von der hier angewandten verschieden. Die Bestimmung der MVD erfolgte semiquantitativ durch Einteilung in die drei Kategorien „niedrig/normal“, „mittel“ oder „hoch“, verglichen mit der MVD im normalen Stromagewebe. Das Ring-Phänomen definierten sie entweder als „vorhanden“ (ein Gang komplett von Ringgefäßen umgeben, oder zwei bzw. mehrere Gangabschnitte zu mehr als 50 % umgeben) oder „nicht vorhanden“, entsprechend der Methode nach Wörnberg [45]. In ca. 24 % der DCIS-Fälle war keine CD105-Expression nachweisbar. Es zeigte sich außerdem, dass das Ring-Phänomen in comedo DCIS signifikant seltener auftrat als in non-comedo DCIS (35 % versus 46,2 %). Dieser Zusammenhang konnte in der hier vorgelegten Arbeit nicht bestätigt werden. Es zeigten sich eher gegensätzliche Tendenzen mit höherer Necklace-VD in comedo als in non-comedo DCIS, wobei dieser Unterschied nicht signifikant war. Außerdem war das Ring-Phänomen in der Arbeit von Vogl et al. bei der Färbung von CD105 im Vergleich zu CD31 häufiger vorhanden (41,3 % versus 30,0 %). Auch dieses Ergebnis konnte hier nicht bestätigt werden. Die Bestimmung des Verhältnisses CD105/CD31 ergab, dass mit CD105 nur etwa 64 % der Ringgefäße verglichen mit CD31 dargestellt werden. Beide Unterschiede könnten auf der unterschiedlichen Methodik, semiquantitative versus quantitative Erfassung des Ring-Phänomens beruhen. Dabei ist der quantitativen Erfassung der Vorzug zu geben, da durch sie eine wesentlich differenziertere Bestimmung des Ring-Phänomens erfolgt. Weitere Ergebnisse der Arbeit von Vogel et al. können wegen fehlender Angaben in ihrer Veröffentlichung leider nicht mit der hier vorgelegten Arbeit verglichen werden.

Zwei weitere Arbeitsgruppen haben die Angiogenese im DCIS mittels CD31 bestimmt.

Wärnberg et al. [45] bestimmten die CD31-MVD in 194 reinen DCIS und 309 DCIS mit invasiver Komponente. Sie nutzten jedoch eine andere Klassifikation und unterteilten die DCIS nach Elston-Ellis in die Grade I-III. Die histologische Untersuchung erfolgte in 200facher Vergrößerung ohne vorherige Bestimmung von „hot spots“. Auch sie bestimmten die CD31-MVD semiquantitativ durch Unterteilung in „normal“ oder „hoch“ im Vergleich zum Normalgewebe. Auch das Ring-Phänomen wurde nur als „vorhanden“ bzw. „nicht vorhanden“ definiert. Im Ergebnis zeigte sich, dass in DCIS Grad III die CD31-MVD signifikant höher und das Ring-Phänomen signifikant häufiger vorhanden waren als in Grad I und II. Die hier vorgelegten Untersuchungen hingegen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den DCIS-Graden und -Subtypen, wobei, wie bereits erwähnt, ein anderes Gradingsystem benutzt und auch eine deutlich geringere Anzahl von Fällen untersucht wurde. Außerdem muss beachtet werden, dass die Bestimmung der MVD bei Wärnberg et al. nicht in den am stärksten vaskularisierten Arealen erfolgte.

Teo et al. [169] untersuchten 20 reine DCIS und 20 IDC mit DCIS-Komponente (jeweils 7x NG1, 6x NG2 und 7x NG3). Neben CD31 setzten sie CD34, CD141 und vWF zur Bestimmung der MVD ein. Die Erfassung der MVD erfolgte in der Peripherie (100 µm) betroffener Gangabschnitte ohne vorherige Bestimmung von „hot spots“. In reinen DCIS und der DCIS-Komponente in IDC konnten sie eine statistisch signifikant höhere CD31-MVD als im Normalgewebe nachweisen, was zum Teil dem Ergebnis der hier vorgelegten Arbeit entspricht. Hier konnte im Vergleich zum Normalgewebe nur eine signifikant höhere CD31-MVD in der DCIS-Komponente invasiver Karzinome nicht jedoch in reinen DCIS darstellen. In DCIS mit invasiver Komponente ergab sich bei Teo et al. eine geringere CD31-MVD als im reinen DCIS, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die hier vorgelegte Arbeit ergab ein umgekehrtes Ergebnis, es konnte nachgewiesen werden, dass die CD31-MVD in DCIS-Komponenten von IDC signifikant höher ist als in reinen DCIS. Interessanterweise ergab sich bei Teo et al. in reinen intermediate-grade DCIS eine signifikant höhere CD31-MVD als im low-grade und im high-grade DCIS. Die CD31-MVD im high-grade DCIS war sogar signifikant geringer als im low-grade DCIS. Der Autor führt dieses paradox-erscheinende Verhalten darauf zurück, dass die Angiogenese zunächst mit der Wachstumsrate des Tumors ansteigt, dann aber nicht mehr mit den am schnellsten wachsenden Läsionen Schritt halten kann.

Auch in unserer Untersuchung zeigte sich in den NG2 DCIS eine tendenziell höhere CD31-MVD als in NG1 und 3, wobei dieser Unterschied statistisch nicht signifikant war. In der Arbeit von Teo et al. zeigte sich außerdem, dass die CD31-MVD im Vergleich zu CD34-, CD141- und vWF-MVD insgesamt geringer war. Dies führen die Autoren darauf zurück, dass CD31 im Gegensatz zu den anderen Endothelmarkern keine Lymphgefäße färbt [147].

Mehrere Arbeitsgruppen haben die MVD und das Ring-Phänomen in DCIS außerdem durch immunhistochemische Darstellung des vWF bestimmt.

Guidi et al. [69] konnten einen Zusammenhang zwischen hoher vWF-MVD und comedo bzw. NG3 DCIS herstellen. Dieser war jedoch nur bei semiquantitativer und nicht bei quantitativer Bestimmung der MVD signifikant. Cao et al. [170] bestätigten eine signifikant positive Korrelation zwischen vWF-MVD und schlechterem DCIS-Subtyp sowie die signifikante Assoziation mit dem Auftreten von invasiven Rezidiven. Hieken et al. [171] hingegen konnten keine signifikante Korrelation von vWF-MVD und anderen DCIS-Eigenschaften mit Ausnahme von p53- und VEGF-Immunoreaktivität nachweisen. Auch Teo et al. [172] konnten für vWF-MVD keine eindeutigen Assoziationen mit anderen Faktoren herstellen. Zwar konnten sie zeigen, dass die CD34-MVD im DCIS signifikant höher ist als im Normalgewebe, und außerdem auch DCIS mit späterem Rezidiv eine signifikant höhere CD34-MVD aufweisen als DCIS ohne Rezidiv, jedoch zeigte sich für die vWF-MVD ein eher umgekehrter Trend. In Bezug auf das Ring-Phänomen kamen die genannten Autoren ebenfalls zu unterschiedlichen Ergebnissen. Guidi et al. [69] konnten keine Assoziation zwischen Vorhandensein des Ring-Phänomens und dem DCIS-Subtyp sowie der vWF-MVD herstellen. Bose et al. [173] bestimmten den Ring-Status sowohl mit vWF als auch mit CD34. Sie konnten eine Tendenz, jedoch keine Signifikanz, zu verstärktem Auftreten des Ring-Phänomens in comedo verglichen mit non-comedo DCIS nachweisen. Einen Zusammenhang zwischen dem Ring-Phänomen und dem Kerngrad fanden sie jedoch nicht. Claus et al. [174] bestimmten das Ring-Phänomen semiquantitativ durch mehrere Parameter: Ring-Anzahl, Ring-Score und mittleren Ringscore. Eine signifikant erhöhte Ring-Anzahl ergab sich in ihrer Arbeit nur für DCIS größer als 1 cm Durchmesser. Ring-Anzahl und Ring-Score waren zwar in comedo DCIS erhöht, jedoch ohne Signifikanz. Im Vergleich zum NG1 war der Ring-Score in NG2 und NG3 DCIS erhöht, allerdings war auch hier keine Signifikanz nachweisbar.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass bezüglich der Angiogenese in DCIS mit Hilfe unterschiedlichster Methoden unter Einsatz mehrerer endothelialer Marker verschiedenste Ergebnisse erzielt wurden. So ergaben sich bei Bestimmung der MVD in einigen Arbeiten Hinweise auf eine (zum Teil signifikant) zunehmende angiogene Aktivität in höhergradigen DCIS [45, 69, 170], andere Arbeitsgruppen konnte solche Zusammenhänge nicht herstellen [171, 172] bzw. fanden sogar entgegengesetzte Zusammenhänge [169]. Ähnlich differierende Ergebnisse ergaben sich bei der Beurteilung des Ring-Phänomens. Keiner der benutzten panendothelialen Marker konnte bisher als unabhängiger prognostischer Faktor im DCIS bestätigt werden [45, 171, 172]. Der Einsatz eines mAK gegen CD105 scheint spezifischere Hinweise auf eine gesteigerte Angiogenese zu liefern als panendotheliale Marker wie CD31 und der vWF. Umfangreiche Studien unter Einbindung klinischer Parameter sollten deshalb CD105 und Panendothelmarker hinsichtlich ihrer jeweiligen prognostischen Relevanz im DCIS (ähnlich der Studien in invasiven Mammakarzinomen) untersuchen.

Es bleibt festzuhalten, dass sich die Methoden und auch die Ergebnisse verschiedenster Arbeiten zur Bestimmung der MVD in DCIS stark unterscheiden und ein Vergleich der Ergebnisse teilweise unmöglich ist. Das verdeutlicht noch einmal die Wichtigkeit eines einheitlichen Standards zur Quantifizierung der Angiogenese in DCIS und Mamma-Läsionen insgesamt.

#### 6.4 Bewertung der Gesamtergebnisse

In der hier vorgelegten Arbeit konnte erstmals ein klarer Zusammenhang zwischen Differenzierung bzw. Progression von Mamma-Läsionen und Angiogenese, gemessen anhand des Angiogenesemarkers CD105, nachgewiesen werden. Dies bietet vielfältige Ansätze für Diagnostik, Prognostik und auch Therapie sowohl von DCIS, als auch von invasiven Mammakarzinomen.

Die wichtigste Aufgabenstellung dieser Arbeit war die Überprüfung des möglichen Einsatzes eines anti-CD105-Antikörpers zur DCIS-Diagnostik mittels *in-vivo*-Immunfluoreszenz. Im Hinblick auf diese diagnostische Anwendung wurde der Marker CD105 unter den Gesichtspunkten Sensitivität und Spezifität beleuchtet. In allen DCIS-Proben wurden CD105-positive Gefäße nachgewiesen (Sensitivität). Es wurde außerdem gezeigt, dass die Anzahl CD105-positiver Gefäße im DCIS gegenüber dem Normalgewebe der Mamma signifikant erhöht ist. Diese Abgrenzbarkeit (Spezifität) des DCIS vom Normalgewebe der Mamma ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für den Einsatz von CD105 in einem optisch-molekularen Screeningverfahren zur DCIS-Früherkennung. Zwar zeigen neben DCIS auch maligne und sogar einige benigne Mamma-Läsionen eine erhöhte CD105-MVD, jedoch können diese durch ergänzende Diagnostik, wie beispielsweise Biopsien, vom DCIS abgegrenzt werden. Somit erscheint CD105 weiterhin als potentieller Marker für ein solches Diagnoseverfahren und ist durch seine Spezifität für angiogene Gefäße dem Panendothelmarker CD31 deutlich überlegen.

Weiterhin konnte eine signifikante Zunahme der angiogenen Aktivität, bestimmt durch die CD105-MVD, in der hier angenommenen Karzinogenese-Sequenz

*Normalgewebe* → *DCIS* → *intraductale IDC-Komponente* → *invasive IDC-Komponente*

nachgewiesen werden, d. h. es besteht ein Zusammenhang zwischen Angiogenese und Differenzierung bzw. Progression von Mamma-Läsionen. Des Weiteren liefert diese Arbeit Hinweise auf eine gesteigerte Angiogenese in höhergradigen DCIS, verglichen mit niedrigeren DCIS-Graden.

Der Einsatz eines TMA zur Quantifizierung der Angiogenese im DCIS ist nicht zu empfehlen.

Die hier erhaltenen Ergebnisse sowie deren prognostische Bedeutung sollten anhand größerer klinischer Studien validiert werden.

Einen interessanten Zukunftsausblick bieten die therapeutischen Ansätze im Sinne einer antiangiogenen Therapie, die sich aus der erhöhten CD105-Expression im DCIS als auch im invasiven Mammakarzinom ergeben.



## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Das Mammakarzinom ist die häufigste bösartige Krebserkrankung der Frau. Wichtigster prognostischer Faktor ist die Früherkennung, diese ist jedoch nur begrenzt effektiv. Besser als die Früherkennung des Mammakarzinoms selbst, ist die frühzeitige Detektion seiner präinvasiven Vorstufen, zu denen u. a. das Ductale Carcinoma In Situ (DCIS) der Mamma gezählt wird. Dessen Diagnostik wiederum könnte durch den Einsatz der sich noch in der Entwicklung befindlichen optisch-molekularen Bildgebung mit Fluoreszenztracern maßgeblich verbessert werden. Ein potentieller Marker für diese Methode ist der angiogenese-assoziierte Endothelmarker CD105. Insbesondere in invasiven Mammakarzinomen ist dieses Molekül sehr genau untersucht und u. a. als unabhängiger prognostischer Faktor bestätigt worden. Ergebnisse bezüglich der CD105-Expression im DCIS lagen bei Beginn der Arbeit jedoch noch nicht vor.

Hauptziel der hier vorgelegten Arbeit war es, die Basis für eine immunfluoreszenzbasierte *in-vivo*-Detektionsmethode mittels CD105 für das DCIS zu schaffen. Dafür wurde die CD105-Expression im DCIS immunhistochemisch bestimmt und mit der im Normalgewebe sowie der in weiteren benignen und malignen Mamma-Läsionen verglichen. Insgesamt wurden 38 reine DCIS (davon 5 Nuclear Grade 1 = NG1, 11 NG2 und 22 NG3 bzw. 16 comedo und 22 non-comedo DCIS), 37 Normalgewebe, 25 Invasiv Ductale Karzinome (IDC) mit DCIS-Komponente, 19 Fibroadenome, 10 Adenosen und 8 Papillome untersucht. Zur Quantifizierung der Angiogenese erfolgte die Bestimmung der Microvessel-Density (MVD; Stromagefäßdichte), der Necklace-Vessel-Density (Necklace-VD; Ringgefäßdichte) sowie der Färbintensität (FI). Als Vergleich wurden Färbungen des Routine-Panendothelmarkers CD31 durchgeführt.

Die immunhistochemische Darstellung beider Gefäßmarker konnte erfolgreich durchgeführt werden und bildete die Grundlage der quantitativen Auswertungen. In allen DCIS-Proben wurden CD105-positive Gefäße nachgewiesen. Es wurde außerdem gezeigt, dass die Anzahl CD105-positiver Gefäße im DCIS gegenüber dem Normalgewebe der Mamma signifikant erhöht ist. Diese Abgrenzbarkeit des DCIS vom Normalgewebe der Mamma ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für den Einsatz von CD105 in einem optisch-molekularen Screeningverfahren zur DCIS-Früherkennung. Zwar zeigen neben DCIS auch maligne und sogar benigne Mamma-Läsionen eine erhöhte CD105-MVD, jedoch können diese durch ergänzende Diagnostik wie Biopsien vom DCIS abgegrenzt werden. Somit ist CD105 weiterhin ein potentieller Marker für ein solches Diagnoseverfahren und ist durch seine Spezifität für angiogene Gefäße dem Panendothelmarker CD31 deutlich überlegen.

Weiterhin wurde eine signifikante Zunahme der angiogenen Aktivität, bestimmt durch die CD105-MVD, in der hier angenommenen Karzinogenese-Sequenz

*Normalgewebe → DCIS → intraductale IDC-Komponente → invasive IDC-Komponente*

nachgewiesen, d. h. es besteht ein Zusammenhang zwischen Angiogenese und Differenzierung bzw. Progression von Mamma-Läsionen. Diese Ergebnisse zeigen auch, dass das DCIS, trotz seines langsamen Wachstums, bereits eine ausgeprägte Fähigkeit zur Angiogeneseinduktion besitzt. Des Weiteren liefert diese Arbeit Hinweise auf eine gesteigerte Angiogenese in höhergradigen DCIS, verglichen mit der in niedrigeren DCIS-Graden.

Die Quantifizierung des Ring-Phänomens im DCIS (Ring kleinster, der Basalmembran betroffener Gangabschnitte direkt anliegender Gefäße) erfolgte durch ein in dieser Arbeit neu entwickeltes und einfaches Verfahren. Die dabei bestimmte metrische Größe CD105-Necklace-VD ergab in intraductalen Komponenten invasiver Karzinome signifikant höhere Werte als in reinen DCIS. Außerdem ist die CD105-Necklace-VD im DCIS NG3 signifikant höher als im DCIS NG1. Zusätzlich wurden sowohl bei der Darstellung von CD105 als auch von CD31 positive Korrelationen von MVD und Necklace-VD nachgewiesen. Dies macht deutlich, dass die Dichte angiogener Gefäße nicht nur im Stroma, sondern auch im Randbereich von DCIS mit steigender Malignität zunimmt. Interessanterweise ist auch in Papillomen sowohl bei der Darstellung von CD105 als auch bei der Darstellung von CD31 ein bisher so nicht beschriebenes Ring-Phänomen nachweisbar.

Durch Untersuchung der Quotienten CD105/CD31-MVD und CD105/CD31-Necklace-VD sollte festgestellt werden, ob der Anteil der angiogenen Gefäße (dargestellt durch CD105) an der Gesamtgefäßzahl (dargestellt durch CD31) mit zunehmender Tumormalignität ansteigt. Es stellte sich heraus, dass der Quotient CD105/CD31-MVD innerhalb der angenommenen Karzinogenese-Sequenz mit Ausnahme des Übergangs von reinen DCIS zu intraductaler IDC-Komponente signifikant zunimmt. Dies zeigt, dass in höhergradigen Mamma-Läsionen nicht nur die Gesamtgefäßzahl, sondern insbesondere die Zahl der angiogenen Gefäße steigt.

Die Verwendung eines Tissue-Microarray zur Quantifizierung der Angiogenese im DCIS wurde wegen zu kleiner Ausschnitte und der damit fehlenden Möglichkeit der „hot spot“-Bestimmung sowie unvollständiger Darstellung der DCIS-Ränder als ungeeignet eingestuft.

Einen interessanten Zukunftsausblick bieten die therapeutischen Ansätze im Sinne einer antiangiogenen Therapie, die sich aus der erhöhten CD105-Expression im DCIS als auch im invasiven Mammakarzinom ergeben.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. GEKID and RKI, *Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Krebs in Deutschland*. 5. Auflage ed. 2006, Saarbrücken.
2. Giesiepen K, Heitmann C, Janhsen K and Lange C, *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*, in *Heft 25 Brustkrebs*. 2005, Robert-Koch-Institut: Berlin.
3. Lagios MD, *Duct carcinoma in situ. Pathology and treatment*. Surg Clin North Am, 1990. **70**(4): p. 853-71.
4. Faverly DR, Burgers L, Bult P and Holland R, *Three dimensional imaging of mammary ductal carcinoma in situ: clinical implications*. Semin Diagn Pathol, 1994. **11**(3): p. 193-8.
5. van Dongen JA, Fentiman IS, Harris JR ,et al., *In-situ breast cancer: the EORTC consensus meeting*. Lancet, 1989. **2**(8653): p. 25-7.
6. Ernster VL, Barclay J, Kerlikowske K, Grady D and Henderson C, *Incidence of and treatment for ductal carcinoma in situ of the breast*. Jama, 1996. **275**(12): p. 913-8.
7. Moriya T and Silverberg SG, *Intraductal carcinoma (ductal carcinoma in situ) of the breast. A comparison of pure noninvasive tumors with those including different proportions of infiltrating carcinoma*. Cancer, 1994. **74**(11): p. 2972-8.
8. Silverstein MJ, Poller DN, Waisman JR ,et al., *Prognostic classification of breast ductal carcinoma-in-situ*. Lancet, 1995. **345**(8958): p. 1154-7.
9. Schwartz GF, Solin LJ, Olivotto IA, Ernster VL and Pressman P, *The Consensus Conference on the Treatment of in situ Ductal Carcinoma of the Breast, 22-25 April 1999*. Breast, 2000. **9**(4): p. 177-86.
10. Tsikitis VL and Chung MA, *Biology of ductal carcinoma in situ classification based on biologic potential*. Am J Clin Oncol, 2006. **29**(3): p. 305-10.
11. Feig SA, *Ductal carcinoma in situ. Implications for screening mammography*. Radiol Clin North Am, 2000. **38**(4): p. 653-68, vii.
12. Holland R, Peterse JL, Millis RR ,et al., *Ductal carcinoma in situ: a proposal for a new classification*. Semin Diagn Pathol, 1994. **11**(3): p. 167-80.
13. Dershaw DD, Abramson A and Kinne DW, *Ductal carcinoma in situ: mammographic findings and clinical implications*. Radiology, 1989. **170**(2): p. 411-5.
14. Ikeda DM and Andersson I, *Ductal carcinoma in situ: atypical mammographic appearances*. Radiology, 1989. **172**(3): p. 661-6.
15. Stomper PC, Connolly JL, Meyer JE and Harris JR, *Clinically occult ductal carcinoma in situ detected with mammography: analysis of 100 cases with radiologic-pathologic correlation*. Radiology, 1989. **172**(1): p. 235-41.
16. Kuhl CK, Schrading S, Bieling HB ,et al., *MRI for diagnosis of pure ductal carcinoma in situ: a prospective observational study*. Lancet, 2007. **370**(9586): p. 485-92.
17. Boetes C and Veltman J, *Screening women at increased risk with MRI*. Cancer Imaging, 2005. **5 Spec No A**: p. S10-5.
18. Mokbel K, Escobar PF and Matsunaga T, *Mammary ductoscopy: current status and future prospects*. Eur J Surg Oncol, 2005. **31**(1): p. 3-8.
19. Going JJ and Moffat DF, *Escaping from Flatland: clinical and biological aspects of human mammary duct anatomy in three dimensions*. J Pathol, 2004. **203**(1): p. 538-44.

20. Hunerbein M, Dubowy A, Raubach M, Gebauer B, Topalidis T and Schlag P, *Gradient index ductoscopy and intraductal biopsy of intraductal breast lesions*. Am J Surg, 2007. **194**(4): p. 511-4.
21. El Khouli RH, Jacobs MA and Bluemke DA, *Magnetic resonance imaging of the breast*. Semin Roentgenol, 2008. **43**(4): p. 265-81.
22. Jacobs VR, Paepke S, Schaaf H, Weber BC and Kiechle-Bahat M, *Autofluorescence ductoscopy: a new imaging technique for intraductal breast endoscopy*. Clin Breast Cancer, 2007. **7**(8): p. 619-23.
23. Sauter ER, Shan S, Hewett JE, Speckman P and Du Bois GC, *Proteomic analysis of nipple aspirate fluid using SELDI-TOF-MS*. Int J Cancer, 2005. **114**(5): p. 791-6.
24. Silverstein MJ, *The University of Southern California/Van Nuys prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast*. Am J Surg, 2003. **186**(4): p. 337-43.
25. Silverstein MJ, Rosser RJ, Gierson ED ,et al., *Axillary lymph node dissection for intraductal breast carcinoma--is it indicated?* Cancer, 1987. **59**(10): p. 1819-24.
26. Hird RB, Chang A, Cimmino V ,et al., *Impact of estrogen receptor expression and other clinicopathologic features on tamoxifen use in ductal carcinoma in situ*. Cancer, 2006. **106**(10): p. 2113-8.
27. Boyages J, Delaney G and Taylor R, *Predictors of local recurrence after treatment of ductal carcinoma in situ: a meta-analysis*. Cancer, 1999. **85**(3): p. 616-28.
28. Silverstein MJ, *Ductal carcinoma in situ of the breast*. Annu Rev Med, 2000. **51**: p. 17-32.
29. Fisher B, Dignam J, Wolmark N ,et al., *Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial*. Lancet, 1999. **353**(9169): p. 1993-2000.
30. Fisher B, Costantino J, Redmond C ,et al., *Lumpectomy compared with lumpectomy and radiation therapy for the treatment of intraductal breast cancer*. N Engl J Med, 1993. **328**(22): p. 1581-6.
31. Ashikari R, Hajdu SI and Robbins GF, *Intraductal carcinoma of the breast. (1960-1969)*. Cancer, 1971. **28**(5): p. 1182-7.
32. Rosner D, Bedwani RN, Vana J, Baker HW and Murphy GP, *Noninvasive breast carcinoma: results of a national survey by the American College of Surgeons*. Ann Surg, 1980. **192**(2): p. 139-47.
33. Wellings SR, Jensen HM and Marcum RG, *An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions*. J Natl Cancer Inst, 1975. **55**(2): p. 231-73.
34. Moinfar F, Man YG, Bratthauer GL, Ratschek M and Tavassoli FA, *Genetic abnormalities in mammary ductal intraepithelial neoplasia-flat type ("clinging ductal carcinoma in situ"): a simulator of normal mammary epithelium*. Cancer, 2000. **88**(9): p. 2072-81.
35. Simpson PT, Gale T, Reis-Filho JS ,et al., *Columnar cell lesions of the breast: the missing link in breast cancer progression? A morphological and molecular analysis*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(6): p. 734-46.
36. O'Connell P, Pekkel V, Fuqua SA, Osborne CK, Clark GM and Allred DC, *Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(9): p. 697-703.

37. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T and Lakhani SR, *Molecular evolution of breast cancer*. J Pathol, 2005. **205**(2): p. 248-54.
38. Sontag L and Axelrod DE, *Evaluation of pathways for progression of heterogeneous breast tumors*. J Theor Biol, 2005. **232**(2): p. 179-89.
39. Giardina C, Serio G, Lepore G ,et al., *Pure ductal carcinoma in situ and in situ component of ductal invasive carcinoma of the breast. A preliminary morphometric study*. J Exp Clin Cancer Res, 2003. **22**(2): p. 279-88.
40. Park K, Han S, Kim HJ, Kim J and Shin E, *HER2 status in pure ductal carcinoma in situ and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry*. Histopathology, 2006. **48**(6): p. 702-7.
41. Farabegoli F, Champeme MH, Bieche I ,et al., *Genetic pathways in the evolution of breast ductal carcinoma in situ*. J Pathol, 2002. **196**(3): p. 280-6.
42. Lacroix M, Toillon RA and Leclercq G, *Stable 'portrait' of breast tumors during progression: data from biology, pathology and genetics*. Endocr Relat Cancer, 2004. **11**(3): p. 497-522.
43. Mylonas I, Makovitzky J, Jeschke U, Briese V, Friese K and Gerber B, *Expression of Her2/neu, steroid receptors (ER and PR), Ki67 and p53 in invasive mammary ductal carcinoma associated with ductal carcinoma In Situ (DCIS) Versus invasive breast cancer alone*. Anticancer Res, 2005. **25**(3A): p. 1719-23.
44. Jo BH and Chun YK, *Heterogeneity of invasive ductal carcinoma: proposal for a hypothetical classification*. J Korean Med Sci, 2006. **21**(3): p. 460-8.
45. Warnberg F, Nordgren H, Bergkvist L and Holmberg L, *Tumour markers in breast carcinoma correlate with grade rather than with invasiveness*. Br J Cancer, 2001. **85**(6): p. 869-74.
46. Carmeliet P and Jain RK, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
47. Weidner N, Semple JP, Welch WR and Folkman J, *Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma*. N Engl J Med, 1991. **324**(1): p. 1-8.
48. Folkman J, *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
49. Denekamp J, *Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy*. Br J Radiol, 1993. **66**(783): p. 181-96.
50. Vaupel P, Kallinowski F and Okunieff P, *Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review*. Cancer Res, 1989. **49**(23): p. 6449-65.
51. Klagsbrun M and D'Amore PA, *Regulators of angiogenesis*. Annu Rev Physiol, 1991. **53**: p. 217-39.
52. D'Amore PA and Thompson RW, *Mechanisms of angiogenesis*. Annu Rev Physiol, 1987. **49**: p. 453-64.
53. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T ,et al., *Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells*. Cell, 1998. **94**(6): p. 715-25.
54. Jain RK, *Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy*. Science, 2005. **307**(5706): p. 58-62.
55. Kumar S, Ghellal A, Li C ,et al., *Breast Carcinoma: Vascular Density Determined Using CD105 Antibody Correlates with Tumor Prognosis*. Cancer Res, 1999. **59**(4): p. 856-861.

56. Mineo TC, Ambrogi V, Baldi A ,et al., *Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer.* J Clin Pathol, 2004. **57**(6): p. 591-7.
57. Weidner N, *Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication.* Semin Diagn Pathol, 1993. **10**(4): p. 302-13.
58. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F and Angeletti CA, *Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer.* Lancet, 1992. **340**(8812): p. 145-6.
59. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML and Merino MJ, *Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma.* Am J Pathol, 1995. **147**(1): p. 33-41.
60. Weidner N, *The importance of tumor angiogenesis: the evidence continues to grow.* Am J Clin Pathol, 2004. **122**(5): p. 675-7.
61. Hansen S, Sorensen FB, Vach W, Grabau DA, Bak M and Rose C, *Microvessel density compared with the Chalkley count in a prognostic study of angiogenesis in breast cancer patients.* Histopathology, 2004. **44**(5): p. 428-36.
62. Medri L, Nanni O, Volpi A ,et al., *Tumor microvessel density and prognosis in node-negative breast cancer.* Int J Cancer, 2000. **89**(1): p. 74-80.
63. Folkman J, *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis.* Semin Oncol, 2002. **29**(6 Suppl 16): p. 15-8.
64. Maio M, Altomonte M, Calabro L and Fonsatti E, *Bioimmunotherapeutic targets on angiogenetic blood vessels in solid malignancies.* Front Biosci, 2001. **6**: p. D776-84.
65. Scappaticci FA, *Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies.* J Clin Oncol, 2002. **20**(18): p. 3906-27.
66. Harris M, *Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer.* Lancet Oncol, 2004. **5**(5): p. 292-302.
67. Brekken RA, Li C and Kumar S, *Strategies for vascular targeting in tumors.* Int J Cancer, 2002. **100**(2): p. 123-30.
68. Neri D and Bicknell R, *Tumour vascular targeting.* Nat Rev Cancer, 2005. **5**(6): p. 436-46.
69. Guidi AJ, Fischer L, Harris JR and Schnitt SJ, *Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast.* J Natl Cancer Inst, 1994. **86**(8): p. 614-9.
70. Engels K, Fox SB, Whitehouse RM, Gatter KC and Harris AL, *Up-regulation of thymidine phosphorylase expression is associated with a discrete pattern of angiogenesis in ductal carcinomas in situ of the breast.* J Pathol, 1997. **182**(4): p. 414-20.
71. Engels K, Fox SB, Whitehouse RM, Gatter KC and Harris AL, *Distinct angiogenic patterns are associated with high-grade in situ ductal carcinomas of the breast.* J Pathol, 1997. **181**(2): p. 207-12.
72. Brown LF, Guidi AJ, Schnitt SJ ,et al., *Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast.* Clin Cancer Res, 1999. **5**(5): p. 1041-56.
73. Rice AJ, Steward MA and Quinn CM, *Thrombospondin 1 protein expression relates to good prognostic indices in ductal carcinoma in situ of the breast.* J Clin Pathol, 2002. **55**(12): p. 921-5.
74. Boland GP, Butt IS, Prasad R, Knox WF and Bundred NJ, *COX-2 expression is associated with an aggressive phenotype in ductal carcinoma in situ.* Br J Cancer, 2004. **90**(2): p. 423-9.

75. Wang JM, Kumar S, Pye D, Haboubi N and al-Nakib L, *Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers*. J Natl Cancer Inst, 1994. **86**(5): p. 386-8.
76. Bodey B, Bodey B, Jr., Siegel SE and Kaiser HE, *Immunocytochemical detection of endoglin is indicative of angiogenesis in malignant melanoma*. Anticancer Res, 1998. **18**(4A): p. 2701-10.
77. Bodey B, Bodey B, Jr., Siegel SE and Kaiser HE, *Over-expression of endoglin (CD105): a marker of breast carcinoma-induced neo-vascularization*. Anticancer Res, 1998. **18**(5A): p. 3621-8.
78. Miller DW, Graulich W, Karges B ,et al., *Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells*. Int J Cancer, 1999. **81**(4): p. 568-72.
79. Torsney E, Charlton R, Parums D, Collis M and Arthur HM, *Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo*. Inflamm Res, 2002. **51**(9): p. 464-70.
80. Gougos A and Letarte M, *Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line*. J Immunol, 1988. **141**(6): p. 1925-33.
81. Wang JM, Kumar S, Pye D, van Agthoven AJ, Krupinski J and Hunter RD, *A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues*. Int J Cancer, 1993. **54**(3): p. 363-70.
82. Lastres P, Bellon T, Cabanas C ,et al., *Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen*. Eur J Immunol, 1992. **22**(2): p. 393-7.
83. Rokhlin OW, Cohen MB, Kubagawa H, Letarte M and Cooper MD, *Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow*. J Immunol, 1995. **154**(9): p. 4456-65.
84. Robledo MM, Hidalgo A, Lastres P ,et al., *Characterization of TGF-beta 1-binding proteins in human bone marrow stromal cells*. Br J Haematol, 1996. **93**(3): p. 507-14.
85. Cho SK, Bourdeau A, Letarte M and Zuniga-Pflucker JC, *Expression and function of CD105 during the onset of hematopoiesis from Flk1(+) precursors*. Blood, 2001. **98**(13): p. 3635-42.
86. Altomonte M, Montagner R, Fonsatti E ,et al., *Expression and structural features of endoglin (CD105), a transforming growth factor beta1 and beta3 binding protein, in human melanoma*. Br J Cancer, 1996. **74**(10): p. 1586-91.
87. Adam PJ, Clesham GJ and Weissberg PL, *Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**(1): p. 33-7.
88. O'Connell PJ, McKenzie A, Fisticaro N, Rockman SP, Pearse MJ and d'Apice AJ, *Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule*. Clin Exp Immunol, 1992. **90**(1): p. 154-9.
89. Diez-Marques L, Ortega-Velazquez R, Langa C ,et al., *Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1587**(1): p. 36-44.
90. Hirakawa S, Hong YK, Harvey N ,et al., *Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells*. Am J Pathol, 2003. **162**(2): p. 575-86.

91. Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M ,et al., *Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies*. J Cell Physiol, 2001. **188**(1): p. 1-7.
92. Henriksen R, Gobl A, Wilander E, Oberg K, Miyazono K and Funa K, *Expression and prognostic significance of TGF-beta isotypes, latent TGF-beta 1 binding protein, TGF-beta type I and type II receptors, and endoglin in normal ovary and ovarian neoplasms*. Lab Invest, 1995. **73**(2): p. 213-20.
93. Fonsatti E, Jekunen AP, Kairemo KJ ,et al., *Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 2037-43.
94. Haruta Y and Seon BK, *Distinct human leukemia-associated cell surface glycoprotein GP160 defined by monoclonal antibody SN6*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(20): p. 7898-902.
95. Li DY, Sorensen LK, Brooke BS ,et al., *Defective angiogenesis in mice lacking endoglin*. Science, 1999. **284**(5419): p. 1534-7.
96. Düwel A, Eleno N, Jerkic M ,et al., *Reduced Tumor Growth and Angiogenesis in Endoglin-Haploinsufficient Mice*. Tumor Biology, 2007. **28**(1): p. 1-8.
97. McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW ,et al., *Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1*. Nat Genet, 1994. **8**(4): p. 345-51.
98. van den Driesche S, Mummery CL and Westermann CJ, *Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an update on transforming growth factor beta signaling in vasculogenesis and angiogenesis*. Cardiovasc Res, 2003. **58**(1): p. 20-31.
99. Cheifetz S, Bellon T, Cales C ,et al., *Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(27): p. 19027-30.
100. Barbara NP, Wrana JL and Letarte M, *Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 584-94.
101. Zhu HJ and Burgess AW, *Regulation of transforming growth factor-beta signaling*. Mol Cell Biol Res Commun, 2001. **4**(6): p. 321-30.
102. Massague J, *The transforming growth factor-beta family*. Annu Rev Cell Biol, 1990. **6**: p. 597-641.
103. Blobe GC, Schiemann WP and Lodish HF, *Role of transforming growth factor beta in human disease*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1350-8.
104. Letamendia A, Lastres P, Botella LM ,et al., *Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 33011-9.
105. Lastres P, Letamendia A, Zhang H ,et al., *Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1*. J Cell Biol, 1996. **133**(5): p. 1109-21.
106. Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C and Kumar S, *CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells*. Faseb J, 2000. **14**(1): p. 55-64.
107. Ma X, Labinaz M, Goldstein J ,et al., *Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(12): p. 2546-52.



108. Gougos A and Letarte M, *Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells*. J Biol Chem, 1990. **265**(15): p. 8361-4.
109. Guerrero-Esteo M, Lastres P, Letamendia A ,et al., *Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts*. Eur J Cell Biol, 1999. **78**(9): p. 614-23.
110. Botella LM, Sanz-Rodriguez F, Sanchez-Elsner T ,et al., *Lumican is down-regulated in cells expressing endoglin. Evidence for an inverse correlation between Endoglin and Lumican expression*. Matrix Biol, 2004. **22**(7): p. 561-72.
111. Jerkic M, Rivas-Elena JV, Prieto M ,et al., *Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation*. Faseb J, 2004. **18**(3): p. 609-11.
112. Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C and Bernabeu C, *Endoglin Expression Is Regulated by Transcriptional Cooperation between the Hypoxia and Transforming Growth Factor-beta Pathways*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(46): p. 43799-43808.
113. Rius C, Smith JD, Almendro N ,et al., *Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1*. Blood, 1998. **92**(12): p. 4677-90.
114. Zhu B, Mol Cell Biol Res Commun, 2001. **4**: p. 321-330.
115. Charpin C, Dales J-P, Garcia S ,et al., *Tumor Neoangiogenesis by CD31 and CD105 Expression Evaluation in Breast Carcinoma Tissue Microarrays*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(17): p. 5815-5819.
116. Dales JP, Garcia S, Carpentier S ,et al., *Long-term prognostic significance of neoangiogenesis in breast carcinomas: comparison of Tie-2/Tek, CD105, and CD31 immunocytochemical expression*. Hum Pathol, 2004. **35**(2): p. 176-83.
117. Dales JP, Garcia S, Bonnier P ,et al., *CD105 expression is a marker of high metastatic risk and poor outcome in breast carcinomas. Correlations between immunohistochemical analysis and long-term follow-up in a series of 929 patients*. Am J Clin Pathol, 2003. **119**(3): p. 374-80.
118. Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y ,et al., *Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development*. Surgery, 2002. **131**(1 Suppl): p. S109-13.
119. Wikstrom P, Lissbrant IF, Stattin P, Egevad L and Bergh A, *Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer*. Prostate, 2002. **51**(4): p. 268-75.
120. Brewer CA, Setterdahl JJ, Li MJ, Johnston JM, Mann JL and McAsey ME, *Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical cancer*. Obstet Gynecol, 2000. **96**(2): p. 224-8.
121. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K ,et al., *Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(11): p. 3410-5.
122. Pruneri G, Ponzoni M, Ferreri AJ ,et al., *Microvessel density, a surrogate marker of angiogenesis, is significantly related to survival in multiple myeloma patients*. Br J Haematol, 2002. **118**(3): p. 817-20.
123. Pruneri G, Bertolini F, Baldini L ,et al., *Angiogenesis occurs in hairy cell leukaemia (HCL) and in NOD/SCID mice transplanted with the HCL line Bonna-12*. Br J Haematol, 2003. **120**(4): p. 695-8.

124. Behrem S, Zarkovic K, Eskinja N and Jonjic N, *Endoglin is a better marker than CD31 in evaluation of angiogenesis in glioblastoma*. Croat Med J, 2005. **46**(3): p. 417-22.
125. Yao Y, Kubota T, Takeuchi H and Sato K, *Prognostic significance of microvessel density determined by an anti-CD105/endoglin monoclonal antibody in astrocytic tumors: Comparison with an anti-CD31 monoclonal antibody*. Neuropathology, 2005. **25**(3): p. 201-206.
126. Beresford MJ, Harris AL, Ah-See M, Daley F, Padhani AR and Makris A, *The relationship of the neo-angiogenic marker, endoglin, with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer*. Br J Cancer, 2006. **95**(12): p. 1683-8.
127. Balza E, Castellani P, Zijlstra A, Neri D, Zardi L and Siri A, *Lack of specificity of endoglin expression for tumor blood vessels*. Int J Cancer, 2001. **94**(4): p. 579-85.
128. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL ,et al., *Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy*. Clin Cancer Res, 1995. **1**(12): p. 1623-34.
129. Li C, Guo B, Wilson PB ,et al., *Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer*. Int J Cancer, 2000. **89**(2): p. 122-6.
130. Takahashi N, Kawanishi-Tabata R, Haba A ,et al., *Association of Serum Endoglin with Metastasis in Patients with Colorectal, Breast, and Other Solid Tumors, and Suppressive Effect of Chemotherapy on the Serum Endoglin*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(3): p. 524-532.
131. Calabro L, Fonsatti E, Bellomo G ,et al., *Differential levels of soluble endoglin (CD105) in myeloid malignancies*. J Cell Physiol, 2003. **194**(2): p. 171-5.
132. Bredow S, Lewin M, Hofmann B, Marecos E and Weissleder R, *Imaging of tumour neovasculature by targeting the TGF-beta binding receptor endoglin*. Eur J Cancer, 2000. **36**(5): p. 675-81.
133. Maier JA, Delia D, Thorpe PE and Gasparini G, *In vitro inhibition of endothelial cell growth by the antiangiogenic drug AGM-1470 (TNP-470) and the anti-endoglin antibody TEC-11*. Anticancer Drugs, 1997. **8**(3): p. 238-44.
134. She X, Matsuno F, Harada N, Tsai H and Seon BK, *Synergy between anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies and TGF-beta in suppression of growth of human endothelial cells*. Int J Cancer, 2004. **108**(2): p. 251-7.
135. Seon BK, Matsuno F, Haruta Y, Kondo M and Barcos M, *Long-lasting complete inhibition of human solid tumors in SCID mice by targeting endothelial cells of tumor vasculature with antihuman endoglin immunotoxin*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(7): p. 1031-44.
136. Matsuno F, Haruta Y, Kondo M, Tsai H, Barcos M and Seon BK, *Induction of lasting complete regression of preformed distinct solid tumors by targeting the tumor vasculature using two new anti-endoglin monoclonal antibodies*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(2): p. 371-82.
137. Tabata M, Kondo M, Haruta Y and Seon BK, *Antiangiogenic radioimmunotherapy of human solid tumors in SCID mice using (125)I-labeled anti-endoglin monoclonal antibodies*. Int J Cancer, 1999. **82**(5): p. 737-42.
138. Guang-hong Tan LT, Yu-quan Wei, Xia Zhao, Jiong Li, Yang Wu, Yan-jun Wen, Tao Yi, Zhen-yu Ding, Bin Kan, Yong-qiu Mao, Hong-xin Deng, Hong-li Li, Chun-hua Zou, Chun-hua Fu., *Combination of low-dose cisplatin and recombinant xenogeneic endoglin as a vaccine induces synergistic antitumor activities*. International Journal of Cancer, 2004. **112**(4): p. 701-706.

139. Guang-Hong Tan Y-QW, Ling Tian, Xia Zhao, Li Yang, Jiong Li, Qiu-Ming He, Yang Wu, Yan-Jun Wen, Tao Yi, Zhen-Yu Ding, Bin Kan, Yong-Qiu Mao, Hong-Xin Deng, Hong-Li Li, Chun-Hua Zhou, Chun-Hua Fu, Fei Xiao, Xiao-Wei Zhang., *Active immunotherapy of tumors with a recombinant xenogeneic endoglin as a model antigen*. European Journal of Immunology, 2004. **34**(7): p. 2012-2021.
140. Takahashi N, Haba A, Matsuno F and Seon BK, *Antiangiogenic therapy of established tumors in human skin/severe combined immunodeficiency mouse chimeras by anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies, and synergy between anti-endoglin antibody and cyclophosphamide*. Cancer Res, 2001. **61**(21): p. 7846-54.
141. Tsujie M, Uneda S, Tsai H and Seon BK, *Effective anti-angiogenic therapy of established tumors in mice by naked anti-human endoglin (CD105) antibody: differences in growth rate and therapeutic response between tumors growing at different sites*. Int J Oncol, 2006. **29**(5): p. 1087-94.
142. Nettelbeck DM, Miller DW, Jerome V ,et al., *Targeting of adenovirus to endothelial cells by a bispecific single-chain diabody directed against the adenovirus fiber knob domain and human endoglin (CD105)*. Mol Ther, 2001. **3**(6): p. 882-91.
143. Newman PJ, *The biology of PECAM-1*. J Clin Invest, 1997. **100**(11 Suppl): p. S25-9.
144. Albelda SM, Oliver PD, Romer LH and Buck CA, *EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule*. J Cell Biol, 1990. **110**(4): p. 1227-37.
145. Lutzky VP, Carnevale RP, Alvarez MJ ,et al., *Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) recycles and induces cell growth inhibition on human tumor cell lines*. J Cell Biochem, 2006. **98**(5): p. 1334-50.
146. Tang DG, Chen YQ, Newman PJ ,et al., *Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium*. J Biol Chem, 1993. **268**(30): p. 22883-94.
147. Burgdorf WH, Mukai K and Rosai J, *Immunohistochemical identification of factor VIII-related antigen in endothelial cells of cutaneous lesions of alleged vascular nature*. Am J Clin Pathol, 1981. **75**(2): p. 167-71.
148. Weidner N, Folkman J, Pozza F ,et al., *Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1992. **84**(24): p. 1875-87.
149. Horak ER, Leek R, Klenk N ,et al., *Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer*. Lancet, 1992. **340**(8828): p. 1120-4.
150. Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ and Silverman ML, *Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma*. Hum Pathol, 1992. **23**(7): p. 755-61.
151. Charpin C, Devictor B, Bergeret D ,et al., *CD31 quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas. Correlation with current prognostic factors*. Am J Clin Pathol, 1995. **103**(4): p. 443-8.
152. Toi M, Kashitani J and Tominaga T, *Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma*. Int J Cancer, 1993. **55**(3): p. 371-4.
153. Gasparini G, *Clinical significance of the determination of angiogenesis in human breast cancer: update of the biological background and overview of the Vicenza studies*. Eur J Cancer, 1996. **32A**(14): p. 2485-93.
154. Gasparini G, *Angiogenesis research up to 1996. A commentary on the state of art and suggestions for future studies*. Eur J Cancer, 1996. **32A**(14): p. 2379-85.

155. Axelsson K, Ljung BM, Moore DH, 2nd ,et al., *Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(13): p. 997-1008.
156. Goulding H, Abdul Rashid NF, Robertson JF ,et al., *Assessment of angiogenesis in breast carcinoma: an important factor in prognosis?* Hum Pathol, 1995. **26**(11): p. 1196-200.
157. Costello P, McCann A, Carney DN and Dervan PA, *Prognostic significance of microvessel density in lymph node negative breast carcinoma*. Hum Pathol, 1995. **26**(11): p. 1181-4.
158. Liao F, Ali J, Greene T and Muller WA, *Soluble domain 1 of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) is sufficient to block transendothelial migration in vitro and in vivo*. J Exp Med, 1997. **185**(7): p. 1349-57.
159. Pinter E, Barreuther M, Lu T, Imhof BA and Madri JA, *Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) tyrosine phosphorylation state changes during vasculogenesis in the murine conceptus*. Am J Pathol, 1997. **150**(5): p. 1523-30.
160. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM ,et al., *Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis*. Am J Pathol, 1997. **151**(3): p. 671-7.
161. Newman PJ, *Switched at birth: a new family for PECAM-1*. J Clin Invest, 1999. **103**(1): p. 5-9.
162. Elias CG, 3rd, Spellberg JP, Karan-Tamir B ,et al., *Ligation of CD31/PECAM-1 modulates the function of lymphocytes, monocytes and neutrophils*. Eur J Immunol, 1998. **28**(6): p. 1948-58.
163. Voura EB, Chen N and Siu CH, *Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) redistributes from the endothelial junction and is not required for the transendothelial migration of melanoma cells*. Clin Exp Metastasis, 2000. **18**(6): p. 527-32.
164. Sapino A, Bongiovanni M, Cassoni P ,et al., *Expression of CD31 by cells of extensive ductal in situ and invasive carcinomas of the breast*. J Pathol, 2001. **194**(2): p. 254-61.
165. Ferrero E, Belloni D, Contini P ,et al., *Transendothelial migration leads to protection from starvation-induced apoptosis in CD34+CD14+ circulating precursors: evidence for PECAM-1 involvement through Akt/PKB activation*. Blood, 2003. **101**(1): p. 186-93.
166. Ilan N, Mohsenin A, Cheung L and Madri JA, *PECAM-1 shedding during apoptosis generates a membrane-anchored truncated molecule with unique signaling characteristics*. Faseb J, 2001. **15**(2): p. 362-72.
167. Romer LH, McLean NV, Yan HC, Daise M, Sun J and DeLisser HM, *IFN-gamma and TNF-alpha induce redistribution of PECAM-1 (CD31) on human endothelial cells*. J Immunol, 1995. **154**(12): p. 6582-92.
168. Vogl G, Dietze O and Hauser-Kronberger C, *Angiogenic potential of ductal carcinoma in situ (DCIS) of human breast*. Histopathology, 2005. **47**(6): p. 617-24.
169. Teo NB, Shoker BS, Jarvis C, Martin L, Sloane JP and Holcombe C, *Vascular density and phenotype around ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast*. Br J Cancer, 2002. **86**(6): p. 905-11.
170. Cao Y, Paner GP, Kahn LB and Rajan PB, *Noninvasive carcinoma of the breast: angiogenesis and cell proliferation*. Arch Pathol Lab Med, 2004. **128**(8): p. 893-6.
171. Hieken TJ, Farolan M, D'Alessandro S and Velasco JM, *Predicting the biologic behavior of ductal carcinoma in situ: an analysis of molecular markers*. Surgery, 2001. **130**(4): p. 593-600; discussion 600-1.

172. Teo NB, Shoker BS, Jarvis C, Martin L, Sloane JP and Holcombe C, *Angiogenesis and invasive recurrence in ductal carcinoma in situ of the breast*. Eur J Cancer, 2003. **39**(1): p. 38-44.
173. Bose S, Lesser ML, Norton L and Rosen PP, *Immunophenotype of intraductal carcinoma*. Arch Pathol Lab Med, 1996. **120**(1): p. 81-5.
174. Claus EB, Chu P, Howe CL ,et al., *Pathobiologic findings in DCIS of the breast: morphologic features, angiogenesis, HER-2/neu and hormone receptors*. Exp Mol Pathol, 2001. **70**(3): p. 303-16.

## DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die zu der Entstehung und dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dabei danke ich insbesondere Herrn PD Dr. med. Thomas Moesta für die Überlassung des Dissertationsthemas, seine Unterstützung und seinen Zuspruch sowie seinen „Blick für das Wesentliche“.

Herrn PD Dr. rer. nat. Wolfgang Kemmner möchte ich für die geduldige Betreuung, sein unermüdliches Interesse sowie vor allem für seine Begeisterungsfähigkeit für wissenschaftliche Fragestellungen danken.

Mein Dank gilt weiterhin Ina Wendler, der ich meine Kenntnisse über die Immunhistochemie verdanke und die mir bei allen labortechnischen Problemen immer zur Seite gestanden hat. Auch möchte ich mich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen in der Pathologie der Robert-Rössle-Klinik bedanken, die mir so oft beim Schneiden der Paraffinblöcke geholfen haben.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Dr. med. Wolfgang Haensch für die geduldige Hilfe bei der Auswertung meiner histologischen Präparate.

Herrn Dipl.-Inform. Jörg Fischer danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Bei der gesamten Forschungsgruppe möchte ich mich für die freundliche Aufnahme und die Hilfsbereitschaft bei allen Fragestellungen und Problemen bedanken. Insbesondere danke ich Christian und Markus für die vielen hilfreichen Tipps und die gemeinsamen Mensapausen.

Ein ganz großes Dankeschön auch an meine Eltern für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Mein allergrößter Dank gilt Martin, dessen unermüdliche Unterstützung und aufbauende Worte maßgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

## **LEBENS LAUF**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.





## **SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Ich, Alexandra Röhrich, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

**„Immunhistochemische Untersuchung des Neoangiogenesemarkers CD105  
in ausgewählten Stadien der Mammakarzinogenese unter besonderer Berücksichtigung  
des Ductalen Carcinoma In Situ der Mamma“**

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift