

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten und Gewebeproben

Es wurden 63 Barrett-Adenokarzinome, 23 Barrett-Dysplasie-Fälle sowie 43 Barrett-Mukosa-Fälle von insgesamt 101 Patienten untersucht. Darüber hinaus wurden 38 Normalgewebe betrachtet, d. h. mehrschichtige, unverhornte Plattenepithelien des Ösophagus ohne Zeichen einer präkanzerotischen bzw. neoplastischen Veränderung, welche alle von verschiedenen Patienten stammten. Diese Biopsate konnten gesammelt werden, wenn sich z. B. die Verdachtsdiagnose einer Metaplasie/Dysplasie/Neoplasie nicht bestätigte, oder sie waren im tumorfreien Bereich von Plattenepithelkarzinomen zu finden. Die Verteilung der Gewebebiopsate unter den 101 Patienten sah wie folgt aus: die Proben stammten entweder aus der Eingangsuntersuchung (= Zeitpunkt der Diagnosestellung) oder aus einer der Follow-Up-Untersuchungen (mit unveränderter Diagnose, Regression bzw. Progression des Befunds oder Rezidiv). Die Zahl der Nachuntersuchungen war bei jedem Patienten unterschiedlich groß (von einer Untersuchung bis hin zu 14 Kontrollen). In 15 Fällen waren jeweils zwei unterschiedliche Gewebetypen innerhalb eines Biopsates existent. Dabei traten zwölfmal Barrett-Mukosa und Barrett-Karzinom nebeneinander auf sowie dreimal Barrett-Mukosa und Barrett-Dysplasie. Hinzu kommt, dass bei den meisten Patienten mehrere Resektate aus verschiedenen Follow-Up-Untersuchungen vorlagen. Dies erklärt, warum die Zahl der untersuchten Gewebebiopsate (129) größer ist als die Zahl der Patienten (101).

Die Gewebeproben, welche zwischen 1995 und 2005 durch eine endoskopische Mukosaresektion (= EMR) entnommen worden waren, wurden mir von Herrn PD Dr. Dr. med. Michael Vieth aus dem pathologischen Institut in Bayreuth zur Verfügung gestellt. Das schriftliche Einverständnis der Patienten lag vor. Das primäre Ziel der Entnahme war, entweder eine (aufgrund von klinischen Symptomen naheliegende) Verdachtsdiagnose einer Barrett-Metaplasie/Dysplasie/Neoplasie zu bestätigen bzw. auszuschließen oder den Erfolg einer vorangegangenen Tumoroperation bzw. Therapie (Bestrahlung, Chemotherapie) zu kontrollieren. Das Material, welches nicht mehr für Diagnostik und Behandlung der Patienten benötigt wurde, wurde gesammelt, von erfahrenen Pathologen begutachtet und zu Konservierungszwecken eingefroren bzw. in Paraffin eingebettet. Die entsprechenden Diagnosen wurden mit den Patientendaten und den klinisch-pathologischen Parametern (z. B. Tumorgröße, Tumorstadium, Tumordifferenzierung,

Tumorausdehnung, Ausmaß der Resektion) in einer Tabelle zusammengefasst, welche mir, gemeinsam mit den gesammelten Biopsaten, zur weiteren Auswertung zur Verfügung stand. Als Hauptkriterien für die Diagnose Barrett-Mukosa nutzten die Pathologen: **1.)** definierte, histologische Merkmale (siehe 1.3.1) und **2.)** Abwesenheit von Dysplasie oder Tumor in unmittelbarer Nachbarschaft der Barrett-Mukosa-Zellen. Als dysplastisch wurden Gewebe von den Pathologen dann bezeichnet, wenn die histologischen Kriterien (siehe 1.3.2) erfüllt waren. Es erfolgte jedoch keine weitere Unterteilung in Low Grade Dysplasia und High Grade Dysplasia, da oftmals beide Typen gemeinsam auftraten bzw. fließende Übergänge vorlagen. Tumorkriterien waren Infiltration der Lamina muscularis mucosae, Invasion von Blut- und/oder Lymphgefäßen und extreme Verzweigung der neoplastischen Drüsen (siehe 1.3.3). Die Tumoren wurden anhand der TNM-Klassifikation in Stadien eingeteilt (Hermanek und Sobin, 1987).

Von den untersuchten 101 Patienten waren 86 männlich und 15 weiblich. Das durchschnittliche Alter lag bei  $69,25 \pm 11,60$  Jahren ( $68,30 \pm 10,31$  Jahren bei den Männern;  $74,67 \pm 16,68$  Jahren bei den Frauen). Der jüngste (männliche) Patient war 41 Jahre, der älteste 95 Jahre. Die jüngste Patientin war 36 Jahre, die älteste 97 Jahre. Die mediane Follow-Up-Zeit, d. h. die Zeit der Nachbehandlung und Therapie, betrug 18 Monate (25%-Perzentile: 8 Monate, 75%-Perzentile: 32,75 Monate, Minimum: ein Monat, Maximum: 118 Monate). Bei 33 Patienten waren keine Angaben zu weiteren Arztkontakten vorhanden. Zum Überleben der Patienten lagen keine Daten vor, weshalb keine Kaplan-Meier-Schätzung und Cox-Regression angewandt werden konnten.

## 2.2 Material

### 2.2.1 Verwendete Chemikalien

Tab. 2: Übersicht über alle bei der Immunhistochemie verwendeten Chemikalien. GS = Gefrierschnitte. PS = Paraffinschnitte.

Substanz	Hersteller	Anwendung bei
Avidin-Biotin-Peroxidase-Kit	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen	GS
Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	GS
3-Amino-9-Ethylcarbazol	Sigma-Aldrich, Steinheim	GS
Biotin Blocking System	DakoCytomation, Hamburg	GS, PS
Bovines Serumalbumin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	PS
Citronensäure-Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	PS
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Steinheim	GS, PS
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt	GS
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt	PS
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt	GS
Ethanol Volumen-100%	Herbeta Arzneimittel, Berlin	PS
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin	GS
Glyzeringelatine	Merck KGaA, Darmstadt	GS
Hämalaunlösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	GS, PS
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt	GS
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt	GS

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung bei</b>
Levamisol	Sigma-Aldrich, Steinheim	PS
Naphthol-Aminosäure-Bi-Phosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim	PS
Natriumacetat-Trihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	PS
Natriumazid	AppliChem, Darmstadt	PS
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt	GS
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt	PS
Natriumnitrit	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	PS
Neufuchsin	Niepötter Labortechnik, Bürstadt	PS
Normal goat serum	PAN Biotech GmbH, Aidenbach	PS
Pronase E	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	PS
1,2-Propandiol	AppliChem, Darmstadt	PS
Salzsäure rauchend 37%	Merck KGaA, Darmstadt	PS
Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Kit	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen	PS
Tris Base	Merck KGaA, Darmstadt	PS
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	GS
Tween	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	PS
30%ige Wasserstoffperoxidlösung	Merck KGaA, Darmstadt	GS
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	PS

## 2.2.2 Lösungen

### **Folgende Lösungen wurden für die Inkubation der Gefrierschnitte benötigt:**

- PBS (zehnfach; Stocklösung): 80 g NaCl (M = 58,44 g/mol), 2 g KCl (M = 74,56 g/mol), 13,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (M = 141,96 g/mol), 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (M = 136,09 g/mol). Ansatz mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen, pH 7,3 bis 7,4 stellt sich automatisch ein
- PBS (einfach): 100 ml zehnfaches PBS mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen
- Acetatpuffer (50 µM, pH = 5,0): 70 ml 0,2-molares Natriumacetat (16,4 g mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen) + 30 ml 0,2-molare Essigsäure (12 ml Eisessig mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen)
- 0,3%ige Wasserstoffperoxidlösung: 1 ml 30%ige Wasserstoffperoxidlösung in 100 ml PBS (einfach) lösen
- 0,2%ige Tritonlösung: 200 µl Triton in 100 ml PBS (einfach) geben und mit dem Magnetrührer mischen
- ABC-Lösung: 2 ml PBS (einfach) + 8 µl Lösung A (Avidin-Dehydrogenase) + 8 µl Lösung B (biotinylierte Peroxidase)
- AEC-Lösung: eine Tablette 3-Amino-9-Ethylcarbozol in 2,5 ml Dimethylformamid auflösen
- Substrat-Chromogen-Lösung: 3,8 ml Acetatpuffer (pH-Wert = 5,0), 200 µl AEC-Lösung und 2 µl einer 30%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung vorsichtig mischen und Lösung filtrieren

### **Nachfolgende Lösungen wurden für die Immunhistochemie an Paraffinschnitten hergestellt:**

- TBS (zehnfach; Stocklösung): 500 mM Tris Base (= 60,57 g) auf 1000 ml bi-destilliertes Wasser + 1500 mM NaCl (= 87,66 g), pH auf 7,6 einstellen mit ca. 40 ml 37% HCl
- TBS (einfach): 100 ml zehnfaches TBS mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen
- 96%ige Ethanollösung: 93,84 g 100%ige Ethanollösung mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen

- 90%ige Ethanollösung: 85,68 g 100%ige Ethanollösung mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen
- 70%ige Ethanollösung: 62,40 g 100%ige Ethanollösung mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen
- Citratpuffer (pH = 6,0): 2,1 g Citronensäure-Monohydrat (M = 210,14 g/mol) in 500 ml bidestilliertem Wasser lösen, mit NaOH auf pH = 6,0 einstellen und mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen
- Multilink: 20 ml TBS (einfach) + 200 mg bovines Serumalbumin (BSA) 1% + 19,5 mg Natriumazid
- Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Lösung: 4 µl des Fertigkits zu 1 ml Multilink geben
- Entwicklungspuffer: 8,7 g NaCl + 1,5 g Tris HCl + 4,9 g Tris Base in 1000 ml destilliertem Wasser lösen und bei +4°C lagern
- Propandiollösung: 21 g 1,2-Propandiol in 1000 ml destilliertem Wasser lösen und bei +4°C lagern
- 4%ige Natriumnitritlösung: 40 mg Natriumnitrit in 1 ml destilliertem Wasser lösen
- Neufuchsinlösung: 5 g Neufuchsin in 100 ml 2-normaler HCl lösen und bei +4°C lagern
- 0,1%ige Tweenlösung: 1 ml Tween 20 in 1000 ml TBS geben und mit dem Magnetührer mischen
- Substrat-Chromogen-Lösung:
- **Lösung 1:** 8 ml Entwicklungspuffer (Raumtemperatur) mit 2 ml einer Propandiollösung (ebenfalls RT) mischen, den pH-Wert mit ein bis zwei Tropfen 2-normaler HCl auf 9,0 einstellen und 5 mg Levamisol (inhibiert die endogenen alkalischen Phosphatasen) dazugeben
- **Lösung 2:** 50 µl 4%ige Natriumnitritlösung
- **Lösung 3:** 7,5 mg Naphthol-AS-Bi-Phosphat in 60 µl Dimethylformamid lösen

Zu Lösung 2 20 µl Neufuchsinlösung geben und eine Minute schütteln. Anschließend das Gemisch in Lösung 1 überführen, ebenso wie Lösung 3. Den pH-Wert der entstandenen Substrat-Chromogen-Lösung mit ein bis zwei Tropfen 2n HCl auf 8,8 einstellen und die Lösung filtrieren.

## 2.2.3 Geräte und andere Labormaterialien

Tab. 3: Zusammenstellung aller verwendeten Geräte/Materialien. GS = Gefrierschnitte. PS = Paraffinschnitte.

Gerät/Material	Hersteller	Anwendung bei
adhäsive Objektträger „Histo-bond“	Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen	PS
Deckgläser 18 x 18 Millimeter	Menzel-Gläser, Braunschweig	GS, PS
Einmalfilterhalter (FP 030/0; 0,2 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel	GS, PS
Einmalspritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen	GS, PS
Einmalklingen für Kryostat bzw. Mikrotom	Jung Feintechnik GmbH (Leica)	GS, PS
Faltenfilter (Durchmesser 150 Millimeter)	Schleicher & Schuell, Dassel	GS, PS
Feinwaage	Sartorius Werke AG, Göttingen	PS
Horizontalschüttler „KS 250 basic“	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen	GS
Hybridisierungsinkubator	GFL, Berlin	PS
Kreisschüttler „MS 2 Minishaker“	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen	GS, PS
Kryostat „Frigocut 2800“	Leica Microsystems AG, Wetzlar	GS
Magnetrührer „RCT basic“	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen	GS, PS

<b>Gerät/Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung bei</b>
Mikroskop „Leica DMRB“	Leica Micosystems AG, Wetzlar	GS, PS
Mikrotom „Jung SM 2000 R“	Leica Micosystems AG, Wetzlar	PS
Milli Q academic - Anlage	Millipore GmbH, Schwalbach	GS, PS
Mikroskopkamera	NTAS Spot	GS, PS
Pap Pen	The Binding Site GmbH, Schwetzingen	GS, PS
Paraffinstreckbad „GFL-1052“	Mercateo, Köthen	PS
Pasteurpipetten	Eppendorf, Hamburg	GS, PS
pH-Meter „761 Calimatic“	Knick, Berlin	PS
Reaktionsgefäße (500 µl, 1000 µl, 2000 µl)	Eppendorf, Hamburg	GS, PS
„Superfrost <sup>®</sup> -Plus“-Objektträger	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig	GS

Desweiteren wurden für die Behandlung der Gefrier- und Paraffinschnitte eine Feuchtkammer und Glasküvetten verwendet, für die Inkubationen an den Paraffingeweben zusätzlich eine Kühlplatte, ein Kaltwasserbad, ein Schnellkochtopf und eine Mikrowelle.



## 2.3 Antikörper

### 2.3.1 Primärantikörper

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper. Die Verdünnung für die Inkubation der Gefrierschnitte erfolgte in PBS, für die Inkubation der Paraffinschnitte in TBS/20% normales Ziegenserum bzw. Pferdeserum (VEGF-C und VEGF-D).

Primärantikörper	Spezifität	Hersteller	Verdünnung bei Gefrierschnitten	Verdünnung bei Paraffinschnitten
VEGF-A	rabbit polyclonal (A-20) [sc-152]	Santa Cruz Biotechnology, Inc., California	1:100	1:10
VEGF-C	goat polyclonal (N-19) [sc-7133]	Santa Cruz Biotechnology, Inc., California	1:100	1:10
VEGF-D	goat polyclonal (C-18) [sc-7602]	Santa Cruz Biotechnology, Inc., California	1:100	1:100
VEGFR-1	rabbit polyclonal (C-17) [sc-316]	Santa Cruz Biotechnology, Inc., California	1:100	1:100
VEGFR-2	rabbit polyclonal (C-1158) [sc-504]	Santa Cruz Biotechnology, Inc., California	1:100	1:50
VEGFR-3	rabbit polyclonal [102-PA22]	RELIA Tech GmbH, Braunschweig	1:50	1:100
CD31	mouse monoclonal (Clone JC70A) [M 0823]	DakoCytomation, Hamburg	1:100	1:100
LYVE-1	rabbit polyclonal [102-PA50S]	RELIA Tech GmbH, Braunschweig	1:10	1:10
	rabbit polyclonal [DP3500PS]	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen	nicht verwendet	1:100

### 2.3.2 Sekundärantikörper

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in PBS (Gefrierschnitte) bzw. in Multilink (Paraffinschnitte).

Sekundär-antikörper	Bindung an folgende Primärantikörper	Spezifität	Hersteller	Verdünnung
anti-rabbit IgG	VEGF-A, VEGFR-1, -2 und -3, LYVE-1	goat [BA-1000]	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen	1:500 (bei Gefrierschnitten); 1:250 (bei Paraffinschnitten)
anti-goat IgG	VEGF-C, VEGF-D	rabbit [BA-5000]	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen	1:500 (bei Gefrierschnitten); 1:250 (bei Paraffinschnitten)
anti-mouse IgG	CD31	horse [BA-2000]	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen	1:500 (bei Gefrierschnitten); 1:250 (bei Paraffinschnitten)

## 2.4 Immunhistochemische Methoden

### 2.4.1 Direkte und indirekte Nachweisverfahren

Die Immunhistochemie stellt ein Verfahren dar, bei welchem man die Spezifität von Antikörpern nutzt, um die zelluläre und subzelluläre Verteilung und Häufigkeit von bestimmten Antigenen an histologischen Gewebeschnitten zu visualisieren. Ein Antigen lässt sich hierbei direkt oder indirekt nachweisen. Bei der direkten Methode ist an den Antikörper, der die spezifischen Bindungsstellen (Epitope) des Antigens erkennt, ein Enzym oder ein Fluorochrom gebunden (Boenisch et al., 2003). Durch Zugabe einer Substrat-Chromogen-Lösung wird am Ort der Antikörperbindung ein Farbstoffpräzipitat gebildet, welches lichtmikroskopisch nachweisbar ist. Das Verfahren der Konjugierung von primären Antikörpern ist jedoch sehr aufwendig und nur wenig sensitiv, deshalb wird in der Regel eine indirekte Methode des Antigennachweises bevorzugt. Hierbei ist der primäre Antikörper unkonjugiert. Zur Visualisierung werden hochspezifische, gegen

die Spezies des Erstantikörpers gerichtete, sekundäre Antikörper verwendet, die ihrerseits mit einem Enzym gekoppelt wurden. Die Nachweisreaktion erfolgt analog zur direkten Methode, wobei das indirekte Verfahren um einiges sensitiver ist, da durch Verwendung von zwei Antikörpern eine Signalverstärkung entsteht (Boenisch et al., 2003).

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Geweben wurden die Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode (für Gefrierschnitte) bzw. die Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Methode (für Paraffinschnitte) als Varianten des indirekten Antigennachweises eingesetzt. Für beide Methoden wurden jeweils drei Hauptkomponenten benötigt: der gegen das Antigen gerichtete Primärantikörper, ein biotinylierter Sekundärantikörper und ein Peroxidase- bzw. Phosphatase-gekoppelter (Strept-) Avidin-Biotin-Komplex (Hsu et al., 1981). Grundlage dieses Antigennachweises ist die hohe Affinität des Glykoproteins Avidin zu Biotin (Boenisch et al., 2003). Mit einer der insgesamt vier Biotin-Bindungsstellen kann Avidin das an den Sekundärantikörper gekoppelte Biotin binden. An eine andere Bindungsstelle bindet das entsprechende Enzym über eine Biotinbrücke und durch eine Chromogenreaktion werden die Orte der Antikörperbindung sichtbar gemacht. Durch die Verwendung von Streptavidin (anstelle von Avidin) erhöht sich die Sensitivität um ein Zwei- bis Vierfaches (Boenisch et al., 2003). Nachteile, vor allem der Avidin-Biotin-Methode, sind mögliche unspezifische Hintergrundfärbungen, d. h. falsch positive Färbungen, die nicht auf der eigentlichen Antigen-Antikörper-Reaktion beruhen. Die unspezifische Bindung des Primär- oder Sekundärantikörpers, z.B. an geladene Teilchen in dem untersuchten Gewebe (Kreuzreaktion), kann einerseits die eigentliche, spezifische Färbung überdecken oder eine nicht vorhandene, spezifische Markierung vortäuschen. Durch Zugabe einer neutralen Proteinlösung vor der Inkubation mit dem Primärantikörper können in der Regel derartige falsch positive oder störende Färbereultate verhindert werden (Boenisch et al., 2003). Diese Lösung ist meist ein Serum von einer anderen Spezies als der des behandelten Gewebes oder auch Albumin bzw. Magermilchpulver. Die darin enthaltenen Proteine (z. B. andere Antikörper) lagern sich an die geladenen Elemente an und bewirken eine Maskierung dieser Stellen für den primären Antikörper. Eine unspezifische Hintergrundfärbung kann auf der anderen Seite aber auch auf einer ungenügenden Blockade der endogenen Peroxidasen bzw. Phosphatasen beruhen. Dies lässt sich im Falle der ABC-Methode durch ausreichende Spülung der Schnitte in einer 0,3%igen Wasserstoffperoxidlösung verhindern, weil dies eine irreversible Blockade der endogenen Peroxidasen bewirkt (Li et al., 1987).

### 2.4.2 Behandlung der Gefrier- und Paraffinschnitte

Tab. 6: Die Behandlung der Gefrier- und Paraffinschnitte erfolgte nach einer modifizierten ABC-Methode (Boenisch et al., 2003). Als gefrorenes Material lagen 33 Barrett-Adenokarzinome, 17 Barrett-Dysplasie-Fälle, 37 Barrett-Mukosa-Fälle und 6 Normalgewebe vor. Die Dicke der Gefrierschnitte betrug 5  $\mu\text{m}$ . In Paraffin eingebettetes Material lag von 30 Adenokarzinomen sowie von je 6 Barrett-Dysplasie- und Barrett-Mukosa-Fällen vor. Die Dicke der Paraffinschnitte betrug 2 bis 5  $\mu\text{m}$ . Die Paraffinschnitte wurden, im Warmwasserbad schwimmend, auf adhäsive Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Präparate bei 37°C über Nacht zur besseren Anhaftung an die Objektträger aufgeschmolzen.

Arbeitsschritt	Durchführung bei den Gefrierschnitten	Durchführung bei den Paraffinschnitten
Vorbehandlung der Gewebeschnitte	Fixierung in Aceton (-20°C) für 5 Minuten → zweimal in PBS waschen (à 10 Minuten)	Entparaffinierung: dreimal 10 Minuten in Xylol; absteigende Alkoholreihe (96%, 96%, 90%, 90%, 70%, 70%) für je 2 Minuten → in TBS waschen
Antigendemaskierung (Kelly et al., 1977) → durch Hitze- bzw. Enzymbehandlung (Shi et al., 1991; Cattoretti et al., 1993; Finley und Petrusz, 1982)	-	<b>Schnellkochtopf:</b> 250 ml Citratpuffer mit dest. Wasser auf 2,5 Liter auffüllen → Präparate ca. 10 Minuten bei 120°C und 103 kPa (1 bar) kochen → Topf unter fließend kaltem Wasser 10 bis 20 Minuten abkühlen lassen → Schnitte in TBS; <i>alternativ</i> <b>Pronase E:</b> 300 mg in 300 ml TBS lösen → 80 bis 90 Sekunden bei 850 Watt in einer Mikrowelle erhitzen → Schnitte 10 Minuten inkubieren → in 96%igen Ethanol, dann in dest. Wasser und zuletzt in TBS
Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbungen	Absättigung der endogenen Peroxidasen (Li et al., 1987): Inkubation in 0,3%iger H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung für 5 Minuten → zweimal in PBS waschen (à 10 Minuten)	-

Arbeitsschritt	Durchführung bei den Gefrierschnitten	Durchführung bei den Paraffinschnitten
Blockierung der endogenen Avidin-Bindungsaktivität (Wood und Warnke, 1981)	Dako Biotin Blocking System: Lösung 1 und 2 (100 µl/Schnitt bzw. ein bis zwei Tropfen direkt aus der Flasche) nacheinander für je 20 Minuten zur Inkubation auf die Schnitte geben	
	kurz in PBS waschen → 5 Minuten in 0,2%iger Tritonlösung → zweimal in PBS (à 10 Minuten)	kurz in TBS waschen
Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbung	30 bis 60 Minuten in Lösung aus 3%igem fetalen Kälberserum in PBS bei RT inkubieren → 5 Minuten in PBS waschen	-
Primärantikörper (siehe 2.3.1)	100 µl/Schnitt; Inkubation in einer feuchten Kammer über Nacht bei +4°C im Kühlschrank → zweimal in PBS (à 10 Minuten) waschen; <b>Negativkontrollen:</b> ohne primären Antikörper, <b>Positivkontrollen:</b> Schnitte, bei denen sowohl Normalgewebe/Barrett-Mukosa als auch ein Adenokarzinom zu finden ist, färben sich nicht nur im Bereich des Tumors, sondern auch im angrenzenden Platten- bzw. Barrett-Epithel (Boenisch et al., 2003)	100 µl/Schnitt; Inkubation in einer Feuchtkammer für eine Stunde bei RT (VEGF-C, VEGFR-2, CD31) bzw. 37°C (VEGF-A, -D, VEGFR-1, -3, beide LYVE-1-Antikörper) → jeweils 5 Minuten waschen in: Leitungswasser, Tween/TBS (0,1%), Leitungswasser und TBS (ohne Tween); <b>Negativ- und Positivkontrollen:</b> analog zur Behandlung der Gefrierschnitte

Arbeitsschritt	Durchführung bei den Gefrierschnitten	Durchführung bei den Paraffinschnitten
Sekundärantikörper	4 µl in 2 ml PBS lösen → 100 µl/Schnitt; Inkubation bei RT und in der Feuchtkammer für 30 Minuten → 5 Minuten in PBS waschen	4 µl in 1 ml Multilink lösen → 100 µl/Schnitt; Inkubation bei RT und in der Feuchtkammer für 30 Minuten → 5 Minuten in TBS waschen
(Strept-) Avidin-Biotin-Komplex	<b>Peroxidase-gekoppelt:</b> 100 µl/Schnitt; Inkubation bei RT und in der Feuchtkammer für 30 Minuten → zweimal in PBS (à 10 Minuten), anschließend 5 Minuten in dest. Wasser waschen	<b>Alkalische Phosphatase-gekoppelt:</b> 2 µl 0,1%iges Tween (zur Hintergrundreduktion) zur SAP-Lösung geben; 100 µl/Schnitt; Inkubation bei RT und in der Feuchtkammer für 30 Minuten → 5 Minuten in TBS waschen
Substrat-Chromogen-Lösung (siehe 2.2.2)	100 µl/Schnitt → Reaktion bei deutlicher und spezifischer, immunopositiver Reaktion von mitgeführten Referenzgewebeschnitten unter dem Lichtmikroskop durch dest. Wasser stoppen (in der Regel nach 2 bis 3 Minuten)	100 µl/Schnitt → Inkubation bei RT und in der Feuchtkammer für 15 bis 20 Minuten → Stoppen der Reaktion durch Überführen der Präparate in Leitungswasser
Kernfärbung	mit Hämalaun für 10 bis 20 Sekunden; Spülen der Schnitte in dest. Wasser für eine Minute und anschließend mit fließendem Leitungswasser (bis Farbumschlag von rot nach blau)	
Fertigstellung der Präparate	Eindecken mit Glyzeringelatine	aufsteigende Alkoholreihe (70%, 70%, 90%, 90%, 96%, 96%), Eindecken mit Entellan

## 2.5 Auszählung der immunmarkierten Epithelzellen und Gefäße – Statistische Bearbeitung der erhobenen Daten

Nach immunohistochemischer Färbung der Gewebeschnitte wurden diese mit einem Leica-Lichtmikroskop (Typ DMRB), welches mit einem Okular-Maßstab (10 Millimeter in 100 Teile) und einer NTAS-Spot-Kamera ausgestattet war, in 100facher sowie 400facher Vergrößerung ausgewertet und dokumentiert.

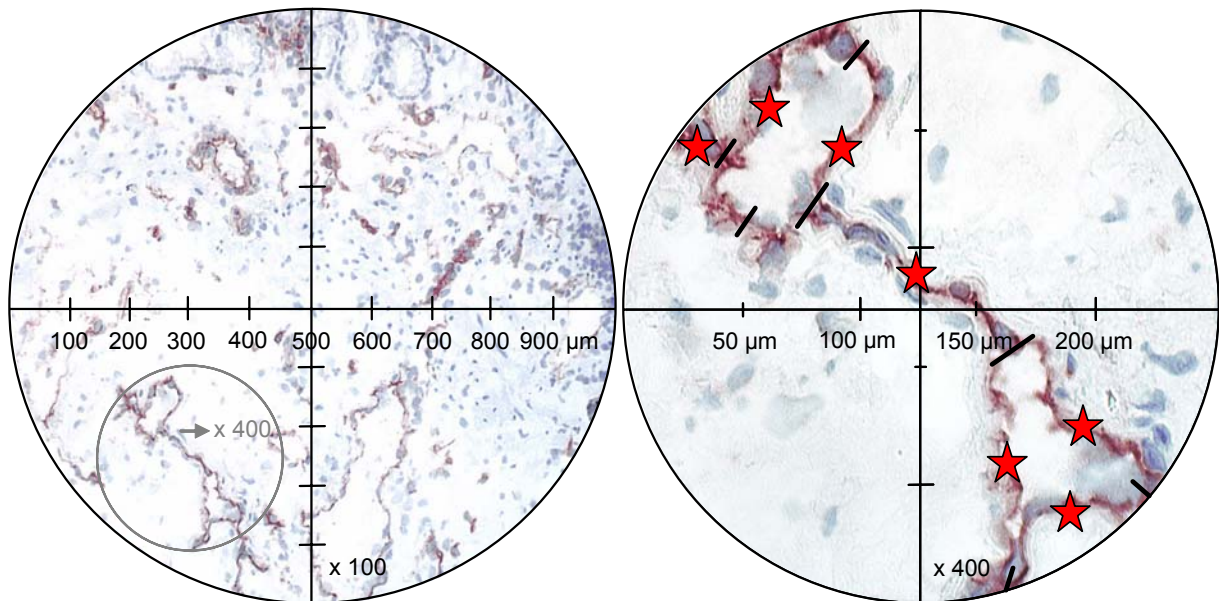


Abb. 5: Links: Exemplarische Darstellung eines Gesichtsfeldes in 100facher Vergrößerung unter dem Leica-Mikroskop. Auswahl von drei Hot Spots (Areale mit stärkster, spezifischer Immunreaktion → kleiner grauer Kreis) in 100facher Vergrößerung. Rechts: Betrachtung dieser Hot Spots in 400facher Vergrößerung und Auszählung der immunopositiven Gefäße bzw. Epithelzellen mit Hilfe des Maßstabes. Definitionsgemäß wurde alle 100 µm ein neues Gefäß gezählt. Die Länge der Strichplatte entsprach in dieser Vergrößerung 250 µm für das gesamte Gesichtsfeld ( $10 \text{ Millimeter in } 100 \text{ Teile} = 10.000 \text{ µm} : 40 \text{ (Vergrößerung des Objektivs)} = 250 \text{ µm}$ ). Die Sterne markieren die gezählten Gefäße (zur Verdeutlichung durch schwarze Striche getrennt).

Gefäße wurden im Ösophagus-Normalgewebe und in den Stadien der Barrett-Karzinogenese immer im Bindegewebe der Lamina propria bzw. Submukosa gezählt (siehe auch 3.1, Abb. 6). Als Gefäß galt auch eine einzelne, deutlich erkennbare Endothelzelle. Ein Gefäßlumen musste nicht zwingend erkennbar sein. Gefäße mit einer ausgeprägten Tunica muscularis (größere Arteriolen bzw. Arterien) wurden bei der Be-



stimmung der Microvessel Density nicht gezählt (Weidner et al., 1991). Bei sehr langen Gefäßen ( $> 100 \mu\text{m}$ ) wurde definitionsgemäß alle  $100 \mu\text{m}$  ein neues Gefäß gezählt und auch Verzweigungen von Gefäßen wurden als jeweils ein neues Gefäß gewertet. Mit dieser Zählmethode sollte die unterschiedliche Länge der Blut- und Lymphgefäße sowie deren Verlaufsrichtung in der Schnittebene berücksichtigt werden und damit eine Verbesserung der Aussagekraft über die Quantität der immunopositiven Gefäße erfolgen.

Positivitäten auf Epithelzellen entsprachen im Ösophagus-Normalgewebe spezifisch gefärbten Plattenepithelzellen und in den Stadien der Barrett-Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz Zylinderepithelzellen und/oder Becherzellen.

Bei der Ermittlung der Anzahl immunopositiver Gefäße und immunopositiver Epithelzellen wurden jeweils drei Hot Spots (Areale mit den stärksten, spezifischen Immunreaktionen) in geringer Vergrößerung (100fach) ausgewählt und anschließend in hoher Vergrößerung (400fach) ausgezählt (siehe Abb. 5). Für jeden Fall wurde der Mittelwert aus den drei Einzelwerten gebildet und anschließend noch einmal der Mittelwert aus allen Werten eines Stadiums berechnet. Diese Auswertung erfolgte für alle Antigene.

Neben der absoluten Anzahl der immunopositiven Epithelzellen wurde deren prozentualer Anteil an allen Epithelzellen eines Gewebeschnittes geschätzt (unter dem Mikroskop in 100facher Vergrößerung). Die Genauigkeit der Schätzung erfolgte in 5%-Intervallen. Wenn zwischen 0 und 5% aller Epithelzellen immunopositiv waren, wurde der gesamte Schnitt als negativ betrachtet. Nur wenn mehr als 5% der Epithelzellen eine positive Immunreaktion zeigten, galt dieser Fall als positiv für ein Antigen und wurde in die weitere statistische Auswertung einbezogen. Aus allen Werten eines „Gebetyps“ wurde für jedes Antigen der Mittelwert gebildet.

Als unspezifisch galt eine Färbung, wenn entweder starke intravasale Hämolyse ein Erkennen einer spezifischen Immunreaktion an Gefäßen unmöglich machten, oder wenn Randphänomene auftraten (starke Farbreaktion in den randständigen Zellen des Schnittes, bedingt durch eine ungleichmäßige Verteilung der Substrat-Chromogen-Lösung). Wenn die Negativkontrollen in der gleichen Inkubationsreihe eine Anfärbung aufwiesen oder wenn das Stroma stark gefärbt war, wurde die entsprechende Markierung ebenfalls als negativ gewertet und Nachinkubationen durchgeführt.

## Statistische Bearbeitung der erhobenen Daten

Nachdem die Gewebeschnitte für alle acht Antigene in der beschriebenen Weise ausgezählt worden waren, wurden mit der SPSS-Software (Version 9.0; SPSS Inc., Chicago, USA) und dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., USA) statistische Berechnungen durchgeführt. Hierzu wurden Zähl- und Korrelationstabellen angelegt. Für alle verwendeten Antikörper wurde zum einen die Fallzahl mit immunopositiven Gefäßen und zum anderen die Fallzahl mit immunopositiven Epithelzellen ermittelt (in Normalgewebe, Barrett-Mukosa, Barrett-Dysplasie und Barrett-Adenokarzinom). Die Veränderungen dieser Häufigkeiten (Zunahme, Abnahme, Konstanz) im Laufe der Barrett-Karzinogenese wurden für jedes Antigen einzeln diskutiert, aber auch gruppenweise verglichen, wobei VEGF-A, -C und -D als (von Epithelzellen synthetisierte) Gefäßwachstumsfaktoren in einer Gruppe zusammengefasst wurden und die Gefäßmarker VEGFR-1, -2 und -3 sowie LYVE-1 und CD31 in einer anderen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei Stadien wurden mit Hilfe des exakten Tests nach Fischer berechnet. Auf die gleiche Weise wurden auch die Mittelwerte der Gefäßzählungen in den verschiedenen Stadien und die Mittelwerte der prozentualen Anteile der immunopositiven Epithelzellen ausgewertet (p-Wert-Berechnung mit Hilfe des T-Tests). Diese Betrachtung ermöglichte beispielsweise Aussagen darüber, ob in späteren Stadien der Barrett-Karzinogenese nur die Zahl der immunopositiven Fälle zunahm, oder ob auch mehr Epithelzellen bzw. Gefäße eine immunopositive Färbung aufwiesen. Schließlich wurden Korrelationsberechnungen durchgeführt: zum einen zwischen dem Vorkommen von VEGFR-1, -2, -3, LYVE-1 und CD31 auf Gefäßen und dem Vorkommen von VEGF-A, -C und -D auf Epithelzellen, zum anderen wurden die Korrelationen der verschiedener Gefäßmarker untereinander ermittelt. Als signifikant wurde eine Korrelation zweier Größen dann bezeichnet, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war. Die p-Werte wurden hierbei mit Hilfe einer Vierfeldertafelanalyse (<http://www.mh-hannover.de/institute/biometrie/JUMBO/bio/vierf.html>) bestimmt.