

2 Material und Methoden

2.1 Das Kollektiv

Die Untersuchungen wurden an paraffineingebettetem Blockmaterial von Zervixkarzinomresektaten aus dem Archiv des Pathologischen Instituts des Klinikums Benjamin Franklin, Berlin durchgeführt. Das Material stammt aus den Jahren 1987 bis 1994. Durch Anschreiben der behandelnden Ärzte sowie der Patienten selber wurden retrospektiv Daten über den Verlauf der Krankheit bis zum Jahre 2001 erhoben. Von den ursprünglich ausgewählten 96 Patientinnen, die in diesem Zeitraum wegen eines Plattenepithelkarzinoms in Behandlung waren, wurden 18 aus der Studie ausgeschlossen, da entweder nicht genügend Material vorhanden war, ein Zweitkarzinom aufgetreten war oder bei der Auswertung durch den Pathologen im Nachhinein ein Carcinoma in situ diagnostiziert wurde. Auch Patientinnen, bei denen der weitere Verlauf der Krankheit unbekannt blieb, wurden nicht berücksichtigt. Das endgültige Kollektiv bestand aus 78 Patientinnen. Die Frauen waren zwischen 24 und 89 Jahren alt, der Median lag bei 50 Jahren. Aufgeschlüsselt nach FIGO und Grading ergibt sich folgendes Bild:

32 Patientinnen FIGO I, 22 Patientinnen FIGO II, 17 Patientinnen FIGO III und 7 Patientinnen FIGO IV. Aufgeteilt nach dem Grading fanden sich im Kollektiv 37 niedrig differenzierte (Grading 3), 41 mässig differenzierte (Grading 2) und keine hochdifferenzierten Karzinome (Grading 1).

FIGO-Stadium	Häufigkeit (n)
I	32
II	22
III	17
IV	7
Grading	
1	0
2	41
3	37
Lymphknotenstatus	
0	39
1	11
unbekannt	28

Tabelle 2: Charakteristika des Kollektivs

2.2 Methoden und Antikörper

Die Spezifität der verwendeten Antikörper war nach Angaben der jeweiligen Firma mit Hilfe von Elektrophorese und Immunblot überprüft worden. Die Tabelle gibt die Klonbezeichnung der Antikörper, die Herstellungsfirma, die entsprechenden Antigene, Andauung und Inkubationszeit sowie die Inkubationstemperatur an.

Antigen	Ak-Klon	Firma	Andauung	Verdünnung	Zeit	Temp.
EGFR	Ab-10(111.6) monoklonal	Neomarkers	0,1%Proteinase K 7 Min, RT	1:50	übernacht	4°C
HER2	HercepTest monoklonal	DAKO	1:10 Epitope Retrieval Solution (Citratpuffer) 40 Min, 95-99°C	keine	30 Min	RT
HER3	C-17 polyklonal	Santa Cruz	Citratpuffer 10 Min, 95-99°C	7,7µg/ml bzw. 1:26	30 Min	RT
HER4	C-18 polyklonal	Santa Cruz	Citratpuffer 10 Min, 95-99°C	5µg/ml bzw. 1:40	30 Min	RT

Tabelle 3: Anwendungskriterien und Bezeichnung der verwendeten Antikörper

(RT = Raumtemperatur)

2.3 Das immunhistochemische Detektionssystem

Für die unterschiedlichen Antikörper wurden jeweils verschiedene Detektionssysteme verwendet, um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen:

- Beim EGF-Rezeptor wurde zur Darstellung des Antigens die APAAP-Methode verwendet, wobei als Sekundärantikörper Rabbit-anti-mouse IgG verwendet wurde.
- Das DAKO-Kit zur Darstellung des HER2-Proteins verwendet nach der Inkubation des Primärantikörpers ein Ready-to-use Visualization Reagent, welches den Sekundärantikörper (goat-anti-rabbit IgG) und Horseradish-Peroxidase gemeinsam enthält.
- Der HER3-Nachweis erfolgte durch die Streptavidin-Biotin-Methode und die Darstellung von HER4 ebenfalls mittels der Streptavidin-Biotin-Methode.

2.3.1 Die APAAP-Methode

Die APAAP-Methode (alkalin phosphatase monoklonal anti-alkalin phosphatase method) fand nach der Publikation von Cordell et al. (1984) breite Anwendung in der Immunhistochemie. Sie wird hauptsächlich zur Bestimmung von Rezeptoren, Peptidantigenen, Neurotransmittern, Wachstumsfaktoren, Immunglobulinen und Proliferationsmarkern benutzt. Im Vergleich zu anderen Verfahren, wie zum Beispiel der PAP-Methode, wird die endogene alkalische Phosphatase-Aktivität des Gewebes durch den Zusatz von Levamisole zur Substratlösung unterdrückt, ohne andere Antigene zu denaturieren. Außerdem kann bei dieser Färbetechnik die Reaktionsstärke durch wiederholtes Auftragen des Brückenantikörpers und des APAAP-Komplexes gesteigert werden. Die wiederholte Applikation bringt zusätzliche Enzymmoleküle an die Antigenbindungsstelle und bewirkt daher bei der Umwandlung der Phosphatase durch anschließend aufgetragenes Fuchsin-Chromogen eine intensivere Färbereaktion.

2.3.2 Das Dako-Färbesystem

Diese Methode unterscheidet sich von der eben beschriebenen APAAP-Methode nur im konjugierten Farbstoffkomplex, welches hier nicht das APAAP-Enzym ist, sondern die sogenannte Horseradish-Peroxidase. Das Visualization Reagenz von DAKO enthält ein Dextran-Polymer, an welches sowohl Sekundärantikörper als auch Horseradish-Peroxidase gekoppelt sind, wodurch die mehrfache Applikation von Brückenantikörper und Enzymkomplex entfällt. Die Farbreaktion entsteht auch hier durch eine enzymatische Umwandlung an der Antigenstelle, wobei hier im Gegensatz zur roten Phosphatasefärbung ein braunes Peroxidase-Reaktionsprodukt entsteht.

2.3.3 Die Streptavidin-Biotin-Methode

Diese Nachweismethode beruht auf der physikalischen Bindungsfähigkeit zwischen Avidin und Biotin. Avidin ist ein Eiweißglycoprotein, welches 4 Moleküle des Vitamins Biotin binden kann. Der Avidin-Biotin-Nachweis besitzt aufgrund der starken Affinität des Avidins zum Biotin eine hohe Empfindlichkeit. Der Antigennachweis erfolgt in drei Schritten. Zunächst wird das Präparat mit dem unkonjugierten Primärantikörper inkubiert.

Anschließend wird ein zweiter Antikörper, der sogenannte Sekundärantikörper, Brückenantikörper oder auch Linkantikörper eingesetzt. Dieser ist gegen das Fc/Fab-Fragment des Primärantikörpers gerichtet. Dieser Sekundärantikörper ist biotinyliert. Im dritten Schritt erfolgt die Inkubation mit Streptavidin, welches durch seine hohe Affinität zu Biotin mit diesem eine Bindung eingeht. An das Streptavidin ist eine Horseradish-Peroxidase oder eine alkalische Phosphatase gebunden. Durch Einsetzen des entsprechenden Chromogens wird nun das im Gewebe aufgebaute Antigen-Antikörper-Gerüst für die Lichtmikroskopie sichtbar gemacht.

Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde das Enzym alkalische Phosphatase eingesetzt.

2.3.4 Probenverarbeitung

Die Probenverarbeitung erfolgte bei den unterschiedlichen Methoden jeweils gleich.

Von den 1x3x4 cm großen Paraffinblöcken wurden 2-4µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Dabei handelte es sich um Super Frost-Objektträger der Firma Menzel.

Anschließend erfolgte ein Trocknungsschritt bei 60°C über Nacht im Brutschrank, womit ein Abschwimmen des Gewebes verhindert werden sollte.

2.3.5 Deparaffinierung

Das Gewebe wurde durch eine absteigende Alkoholreihe deparaffiniert. Hierzu wurden jeweils 20 Objektträger in Lösungsbäder bestehend aus 250 ml Xylol für 5 Minuten, erneut 250 ml Xylol für 5 Minuten, 250 ml Aceton für 10 Minuten, Aceton-Tris-Puffergemisch (pH 7,4: Verhältnis 1:1) für 10 Minuten und Tris-Puffer (pH 7,4) für 10 Minuten eingetaucht.

2.3.6 Antigendemaskierung

Das fixierte und deparaffinierte Material wurde zur Steigerung der spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion entweder enzymatisch andeaut oder im Wasserbad durch Kochen vorbehandelt. Bei der Andauung kommt es zur Demaskierung antigener Determinanten. Die durch die Fixierung mit Formalin hervorgerufenen Verbindungen zwischen den Proteinen werden dabei gespalten. Die hohe Energiezufuhr beim Kochen im Wasserbad löst Proteinbindungen und bewirkt dadurch eine bessere Präsentation der Antigene.

Nach verschiedenen Voruntersuchungen wurden folgende Andauungsmethoden angewendet:

- Zur Darstellung von EGFR: 0,1% Proteinase K (7 Minuten)
- Zur Darstellung von HER2: Kochen in Epitope Retrieval Solution (Citratpuffer) bei 95-99°C im Wasserbad (40 Minuten)
- Zur Darstellung von HER3: Kochen in Citratpuffer pH 6 bei 95-99°C (10 Minuten)
- Zur Darstellung von HER4: Kochen in Citratpuffer pH 6 bei 95-99°C (10 Minuten)

Nach der Andauung wurden die unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt, um eine Adsorption des primären Antikörpers zu verhindern. Dies geschah bei EGFR, HER3 und HER4 durch fetales Kälberserum, welches zuvor hitzeinaktiviert wurde, und bei HER2 durch ein Peroxidase Blocking Reagent.

2.3.7 Antikörperapplikation

In Vorversuchen wurde die optimale Inkubationszeit und Verdünnung unter festen Bedingungen für jeden primären Antikörper ermittelt (siehe Tabelle). Meist wird eine Verminderung der unspezifischen Reaktion durch die optimale Verdünnung der Antikörper bei gleichzeitiger Verlängerung erreicht. Nach dem Auftragen des primären Antikörpers und der jeweilig ermittelten Inkubationszeit wurde mit Tris-Puffer gespült.

Anschließend wurde je nach Antikörper wie folgt verfahren:

- Bei EGFR wurde für 30 Minuten der Brückenantikörper in der Verdünnung 1:40 aufgetragen. Nach wiederholtem Spülen mit Tris-Puffer wurden die Schnitte für 30 Minuten mit dem APAAP-Komplex in einer Verdünnung von 1:40 inkubiert. Zur Verstärkung des Färbesignals, erfolgten die beiden letzten Schritte noch ein zweites Mal für jeweils 10 Minuten.
- Bei der HER2-Bestimmung erfolgte keine Brückenbildung mit dem APAAP-Komplex, hier erfolgte nach der Blockierung der endogenen Peroxidase die Inkubierung mit dem Visualization Reagenz, wie schon unter 2.3.2. beschrieben, weswegen die Wiederholung der Schritte ausgelassen werden konnte.
- Bei HER3 und HER4 wurde die Streptavidin-Biotin-Methode zum Nachweis verwendet, daher wurde nach der Inkubation mit dem Primärantikörper ein biotinylierter Brückenantikörper in der Verdünnung 1:200 aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde für 30 Minuten der Streptavidin-AP-Komplex in der Verdünnung 1:400 aufgetragen. Der Sekundärantikörper und der Streptavidin-AP-Komplex wurden jeweils mit fetalem Kälberserum 1,5%ig versetzt.

- EGFR: Andau: 0,1% ige Proteinase K, Firma:
 Brückenantikörper: AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG,
 Firma: dianova, Code Number: 315-005-045
 APAAP-Komplex: Maus-monoklonal Ak
 Firma: dianova, Kat.Nr. M800
 Entwicklung: Fuchsin Substrat-Chromogen
 Firma: DAKO, Code No.: K0624
- HER2: DAKO HercepTest-Kit for Immunoenzymatic Staining
 Code No. K 5024
- HER3: Citratpuffer pH 6 aus Stammlösung A und B
 Brückenantikörper: Biotin-SP-conjugated AffiniPure Rabbit
 Anti-Mouse IgG, Code Nr.: 315-065-045
 1:2 verdünnt mit Glycerol
 Firma: dianova
 Streptavidin-AP Conjugate, Best. Nr.: 1089161
 Firma: Boehringer Mannheim
 Fuchsin Substrate Chromogen
- HER4: Citratpuffer pH 6
 Brückenantikörper: Biotin-SP-conjugated AffiniPure Mouse
 Anti-Rabbit IgG, Code Nr.: 211-065-109
 1:2 verdünnt mit Glycerol
 Firma: dianova
 Streptavidin-AP Conjugate
 Fuchsin Substrate Chromogen
- alle: Häkalaun: MAYERS Häkalaunlösung Merck 1.09249.0500
 Glycerolgelatine: KAISERS Glyceringelatine Merck
 1.019242.0100

2.3.10 Positiv- und Negativkontrollen

Um die Gültigkeit der Ergebnisse bestätigen zu können, sind Versuchs- und Reagenzienkontrollen notwendig. Diese Kontrollen gewährleisten, dass die erzielten Ergebnisse verlässlich sind. Es ist daher üblich, zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse Substitutions- und Negativkontrollen, und zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse, Positivkontrollen bei jeder Untersuchungsserie mitlaufen zu lassen.

Positive Kontrollen dienen der Überprüfung der Sensitivität eines benutzten Antikörpers. Bei jedem durchgeführten Färbelauf wurden Gewebspräparate oder Zellkulturen mitgeführt, die sicher das fragliche Antigen enthielten (z.B. Positivkontrollen in Form von Mammakarzinomgewebe von DAKO zur Bestimmung von HER2, oder Plazentagewebe bei der Bestimmung von EGFR, HER3 und HER4). Darüber hinaus bieten sie ein Maß für methodisch bedingte Schwankungen der Färbeintensität.

Negativkontrollen dienen der Überprüfung der Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion. Zu diesem Zweck wurde bei jeder Untersuchungsserie ein Gewebepreparat mitgeführt, welches das fragliche Antigen sicher enthielt, bei diesem Präparat wurde jedoch der primäre Antikörper nicht appliziert, sondern dieser durch eine Negativkontrolllösung substituiert. Wies dieses Präparat eine positive Färbereaktion auf, so ließ dies auf eine unspezifische Proteinbindung, unspezifische Bindung durch andere Antikörperreagenzien der Färbereihe oder eine fehlerhafte Probenaufbereitung schließen. Folglich wurde die gesamte Untersuchungsserie nicht ausgewertet.

2.4 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Mit einer DNA-Sonde wird quantitativ das HER-2/neu-Proto-Onkogen auf Chromosom 17q21 nachgewiesen (Popescu et al. 1989), indem es im Zellkern detektiert und in einer leuchtend grünen Färbung vor blauem Kernhintergrund dargestellt wird. Verwendet wurde das INFORM HER-2/neu Kit der Firma ONCOR und mit Formalin fixiertes in Paraffin eingebettetes Zervixkarzinomgewebe.

2.4.1 Probenverarbeitung

Für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) wurden ca. 4µm dicke Schnitte von den Paraffinblöckchen angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte kamen vor der Deparaffinierung über Nacht bei 60°C in den Brutschrank, um das Gewebe auf dem Objektträger zu fixieren und ein Abschwimmen zu verhindern.

2.4.2 Deparaffinierung

Es wurde für 10 Minuten in Xylol deparaffiniert, dann zweimal für 2 Minuten in 100%igem Alkohol dehydriert und anschließend an der Luft für 10 Minuten getrocknet.

2.4.3 Andauung

Die Schnitte wurden mit Pretreatmentlösung bei 45 °C für 15 Minuten im Wasserbad chemisch vorbehandelt, um Peptiddisulfidbrücken zu lösen. Anschließend wurde mit 2xSSC (pH 7) gespült. Daraufhin wurde das Gewebe enzymatisch mit Protein Digestion Solution bei 45°C für 40 Minuten angedaut um Proteine zu verdauen, die den Zugang zur DNA blockieren könnten. Danach wurde wieder gespült. Nun wurden die Schnitte in 75%igem, 85%igem und dann 100%igem Alkohol für jeweils 2 Minuten dehydriert und anschließend wieder für 10 Minuten an der Luft getrocknet.

2.4.4 Sondenapplikation

Die Hybridisierungslösung besteht aus einer Sonde mit einer DNA-Sequenz, welche das Gegenstück zur Sequenz der HER-2 Gens darstellt. Diese wurde auf die Schnitte aufgetragen und mit einem Coverslip bedeckt. Zuerst wurden sie für 10 Minuten bei 70-75°C inkubiert, welches der Überführung der doppelsträngigen DNA in einsträngige DNA diente (Denaturierung), und dann über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer belassen.

Die ungebundene Sonde wurde am nächsten Tag mit 0,5xSSC (pH 7) abgespült, in dem die Schnitte bei 72°C für 5 Minuten im Wasserbad erhitzt wurden.

Es folgte das abwechselnde Inkubieren mit Detection Reagent (FITC-Avidin), dann dem Sekundärantikörper (Anti-Avidin) und wieder FITC-Avidin für jeweils 15 Minuten gefolgt von gründlichem Spülen mit 1xPBD, um die hybridisierte Sonde mit dem mit Fluoreszenz beladenen Liganden, hier das Avidin, aufzuspüren und dort am HER-2 Gen zu fixieren.

2.4.5 Entwicklung

Auf die so verbliebene DNA wurde anschließend eine fluoreszierende Gegenfärbung (DAPI in Antifade) aufgetragen und mit einem Deckglas bedeckt.

Im Epifluoreszenz-Mikroskop kann dann die Emission von grünem und blauem Licht beobachtet und die einzelnen Signale im Kern ausgezählt werden. Als amplifiziert galten Tumore, die in mindestens 20 Zellen mehr als 4 Signale zeigten.

2.4.6 Lösungen und Reagenzien

Oncor® INFORM™ HER-2/neu Gene Detection System

Cat. No.: S8000-KIT

2.5 Auswertung

Die Auswertung erfolgte unabhängig durch zwei Untersucher.

2.5.1 EGFR-Auswertung

Die Auswertung der EGFR-Färbung erfolgte mit Hilfe des Immunreaktiven Scores (IRS) von Remmele und Stegner (1987). Dieser Score berücksichtigt sowohl den Prozentsatz positiver Zellen als auch deren Färbeintensität. Danach ergibt sich zur Beurteilung der Expression eines Antigens die Produktbewertungszahl für jedes Präparat aus der Formel:

$$\text{IRS} = \text{SI} \times \text{PP}$$

SI bezeichnet die Färbeintensität (Staining Intensity) und gibt den vorherrschenden Intensitätsgrad der Färbung an. Sie ist wie folgt gestaffelt:

- 0 = keine Färbereaktion
- 1 = schwache Färbereaktion
- 2 = mäßige Färbereaktion
- 3 = starke Färbereaktion

Die Abschätzung des Prozentsatzes positiver Zellen (PP) erfolgte nach dem Verhältnis positiver Karzinomzellen zu den negativen Zellen mit folgender Einteilung:

- 0 = keine positiven Zellen
- 1 = weniger als 10% positive Zellen
- 2 = 10-50% positive Zellen
- 3 = 50-80% positive Zellen
- 4 = mehr als 80% positive Zellen

Aus der Multiplikation beider Bewertungsfaktoren resultiert ein IRS von 0 bis 12 Punkten.

Die Subjektivität der Bewertung wurde dadurch verringert, dass zu Beginn jeder Auswertung erst der Standard höchstpositiver Färbung in Form der Positivkontrolle und dann der Standard höchstnegativer Färbung in Form der Negativkontrolle beurteilt wurde.

2.5.2 HER2-Auswertung

Die Auswertung von HER2 erfolgte nach dem vom Hersteller des HercepTest-Kits etablierten Score, der im Hinblick auf die Therapie mit einem HER2-Antikörper entwickelt wurde und daher vor allem klinische Relevanz in der Therapie des Mammakarzinoms hat. Dieser Score berücksichtigt nur eine Membranfärbung, die bei mehr als 10 Prozent der Zellen vorliegen muss, ansonsten wird das Präparat mit 0 bewertet. Gibt es vereinzelte Membranfärbungen in mehr als 10 Prozent, die aber keine geschlossenen Ringe bilden, wird das Präparat mit 1+ bewertet. Bei geschlossenen Ringen in schwacher bis mäßiger Intensität erhält das Präparat die Bewertung 2+ und bei einer starken Membranfärbung 3+.

2.5.3 FISH-Auswertung

Zur Auswertung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung wurde in verschiedenen Regionen des Tumors die Anzahl der Signale in den einzelnen Zellen ausgezählt und mit dem Score bewertet, den die überwiegende Anzahl der Zellen aufwies. Die Einteilung war ≤ 4 , 5-10, 11-20 oder >20 .

2.5.4 HER3- und HER4-Auswertung

Für HER3 und HER4 wurde ein eigener Score entwickelt, um den unterschiedlichen Färbungen der Kompartimente Zytoplasma, Membran und Kern gerecht zu werden. Daher erfolgte die statistische Auswertung zunächst getrennt, wobei hier nur das Kompartiment berücksichtigt wurde, welches in der Regel stark angefärbt war; dies waren bei der HER4-Färbung die Kerne und bei der HER3-Färbung das Zytoplasma.

Die Einteilung der Intensität erfolgte in Anlehnung an den IRS-Score, jedoch wurde bei der Abschätzung des Prozentsatzes nur unterteilt in weniger als 50% oder mehr als 50% gefärbte Zellen.

- 0 = keine Färbereaktion
- 1 = schwache Färbereaktion
- 2 = mäßige Färbereaktion
- 3 = starke Färbereaktion

multipliziert mit:

- 0 = keine positiven Zellen
- 1 = weniger als 50% positive Zellen
- 2 = mehr als 50% positive Zellen

Die einzelnen so mit 0 bis 6 bewerteten Kompartimente Zytoplasma, Membran und Kern wurden daraufhin addiert, so dass sich ein Wert zwischen 0 und 18 ergab.

2.6 Statistik

Microsoft Excel diente zur Dokumentation und zur Datenverwaltung. Die Berechnungen wurden mit dem statistischen Programm SPSS Version 10.0 durchgeführt und dem Institut für Statistik und Informationsverarbeitung des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der FU Berlin vorgelegt.

Angewendet wurden der Chi-Quadrat-Test mit Kreuztabellen und für die Überlebensanalyse Kaplan-Meier-Kurven (Kaplan et al. 1958) und der Log-Rank-Test.

Bei HER2 wurden entsprechend den Richtlinien des HercepTest Tumore mit einem Wert von 0 oder 1+ als negativ angesehen, mit 2+ oder 3+ als positiv.

Da fast alle Präparate eine zumindest schwach positive EGFR-Färbung zeigten, wurde der „cut-off-point“ bei ≥ 5 festgelegt.

Der cut-off-point bei HER3 wurde relativ niedrig bei ≥ 3 angesetzt, da die HER3-Färbung insgesamt eine eher schwache Färbung ist, trotz wesentlich höherer Konzentration des Antikörpers im Gegensatz zu HER4, weshalb der „cut-off-point“ bei HER4 bei ≤ 6 festgelegt wurde.

Bei der FISH-Auswertung wurden Präparate als amplifiziert bzw. positiv bezeichnet, die in mindestens 20 Zellen mehr als 4 Signale enthielten.