

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Einteilung und Ausbreitung der Karzinome mit Überblick über Therapieoptionen

Die Zervixkarzinome werden klinisch nach FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) in vier Stadien mit verschiedenen Unterstadien unterteilt (*Tabelle 1*).

TNM-Kategorien	FIGO	Kriterien	Therapieoptionen
TX		Primärtumor kann nicht beurteilt werden	
T0		Kein Anhalt für Primärtumor	
Tis	0	Karzinoma in situ, CIN III	Konisation, LEEP (loop electrosurgical excision procedure), Laser-vaporisation, Kryotherapie <sup>113,114,115</sup> . Oberstes Gebot Histologie zur Feststellung des Ausmaßes des Tumors.
T1	I	Karzinom streng auf Zervix Uteri beschränkt (Ausdehnung auf Korpus bleibt unberücksichtigt)	siehe Unterklassen
T1a	IA	Invasives Karzinom, das lediglich mikroskopisch zu erkennen ist (alle makroskopisch erkennbaren fallen unter Ib); Stromainvasion max. 5 mm, Oberflächenausdehnung von nicht mehr als 7 mm	Bei Invasionstiefe von bis zu 3 mm ohne Gefäß- und Lymphgefäßbeteiligung reine Hysterektomie bzw. bei Frauen mit Kinderwunsch ev. therapeutische Konisation bei tumorfreien Resektionsrändern <sup>116</sup> . Bei Invasionstiefe von 3-5 mm oder bestehender Unsicherheit über Invasionstiefe oder (Lymph-) Gefäßbeteiligung radikale Hysterektomie mit Beckenlymphknotendissektion <sup>117</sup> . Bei Inoperabilität evtl. Afterloadbestrahlung <sup>118</sup> .
T1a1	IA1	Stromainvasion nicht mehr als 3 mm, Oberflächenausdehnung nicht mehr als 7 mm	
T1a2	IA2	Stromainvasion 3-5 mm, Oberflächenausdehnung nicht mehr als 7 mm	
T1b	IB	Makroskopisch erkennbare Läsion oder subklinische Läsion, die größer ist als IA	Radikale Hysterektomie mit bilateraler pelviner Lymphadenektomie <sup>119</sup> oder kombinierte Bestrahlung (perkutan und Afterloading) <sup>120 121</sup> oder Kombination aus beidem <sup>122,123</sup> oder cisplatinhaltige Radiochemotherapie
	IB1	Kleiner als 4 cm	
	IB2	größer als 4 cm	

## Material und Methoden

TNM-Kategorien	FIGO	Kriterien	Therapieoptionen
T2	II	Infiltration der Parametrien bis jenseits des Uterus, aber nicht bis zur Beckenwand und dem unteren Drittel der Scheide	siehe Unterklassen
T2a	IIA	Ohne Infiltration der Parametrien, Infiltration der oberen 2/3 der Scheide	Radikale Hysterektomie mit pelviner Lymphadenektomie <sup>119</sup> , ev. mit anschließender perkutaner Becken-bestrahlung <sup>123</sup> , oder kombinierte Radiatio (Afterload und perkutane Beckenbestrahlung) <sup>119</sup> . Bei Tumoren über 4 cm Durchmesser ist eine zusätzliche Bestrahlung der paraaortalen Lymphknoten in Betracht zu ziehen <sup>121 124</sup> . Radiochemotherapie mit Cisplatin ist alleiniger Radiatio überlegen.
T2b	IIB	Infiltration der Parametrien, aber nicht bis zur Beckenwand	Kombinierte Radiatio <sup>119 125</sup> , auch cisplatinhaltige Radiochemotherapie <sup>126</sup> oder neoadjuvante Chemotherapie <sup>127</sup> . Teilweise auch noch OP mit Resektion der Parametrien bis Beckenwand (Pivers III) und paraaortaler Lymphonodektomie <sup>128</sup> .
T3	III	Ausbreitung bis zur Beckenwand, Befall des unteren Scheidendrittels, Hydronephrose oder eine stumme Niere	Kombinierte Radiatio <sup>119 125</sup> , eventuell auch cisplatinhaltige Radiochemotherapie <sup>126</sup>
T3a	IIIA	Befall des unteren Drittels der Scheide, keine Ausbreitung bis zur Beckenwand	wie III
T3b	IIIB	Ausbreitung bis zur Beckenwand, Verursachung einer Hydronephrose oder einer stummen Niere	wie III <sup>129</sup>
T4	IVA	Tumor infiltriert Schleimhaut von Blase oder Rectum und/oder überschreitet Grenzen des kleinen Beckens	wie III
	IVB	Ausbreitung auf entfernte Organe (Fernmetastasen)	wie III, eventuell Chemotherapie mit Cisplatin, Metastasenchirurgie, Metastasenbestrahlung

Tabelle 1: Klinische (FIGO) und pathologische Einteilung der Zervixkarzinome mit Erläuterungen und Überblick über Therapieoptionen (vgl. dazu die Richtlinien der AGO<sup>128</sup>). TNM bedeutet dabei Tumor Nodi (positive Lymphknoten) und Metastasen. Entsprechend wird in pathologischen Angaben an das T Stadium noch ein N0 oder N1 für fehlende bzw. vorhandene Lymphknotenmetastasen und ein M0 oder M1 für fehlende oder vorhandenen Fernmetastasen angehängt.

## 2.2 Das Patientenkollektiv

112 Patientinnen, die in den Jahren 1987-1994 im Klinikum Benjamin Franklin wegen eines Plattenepithelkarzinoms der Zervix behandelt wurden und von denen ausreichendes Gewebe zur Verfügung stand gingen in diese Untersuchung ein. Die Aufschlüsselung nach FIGO-Stadien und Grading ist *Tabelle 2* und *Tabelle 3* zu entnehmen.

## Material und Methoden

FIGO-Stadium (N =112)	
<b>I (N=47)</b>	Ohne Angabe (N=1)
	A (N=9)
	B (N=38)
<b>II (N=33)</b>	A (N=5)
	B (N=28)
<b>III (N=24)</b>	Ohne Angabe (N=3)
	A (N=4)
	B (N=17)
<b>IV (N=8)</b>	Ohne Angabe (N= 2)
	A (N=3)
	B (N=3)

*Tabelle 2: Dargestellt ist die Zusammensetzung des untersuchten Tumorpatientinnenkollektivs nach FIGO-Stadien und deren Substadien (UFIGO). Im Text wird im weiteren nur mit den FIGO-Stadien gearbeitet, um das Kollektiv nicht zu stark aufzusplitteln.*

Differenzierungsgrad (Grading)	Anzahl (N=112)
Hoch differenziert (G1)	5
Mässig differenziert (G2)	55
Niedrig differenziert (G3)	52

*Tabelle 3 Zusammensetzung der untersuchten Karzinome nach Grading.*

Hinsichtlich der erfolgten Therapien stellt sich das Kollektiv der Karzinompatientinnen wie folgt dar: 3 Patientinnen erhielten aufgrund schlechten Allgemeinzustandes keine Therapie, 43 wurden primär einer Strahlentherapie (Afterloading, perkutane Bestrahlung oder beides) zugeführt. 66 Patientinnen wurden zunächst operativ behandelt, wobei sich zum Teil noch eine Nachbehandlung anschloß. Eine Übersicht mit genaueren Einteilungen gibt *Tabelle 4*.

## Material und Methoden

Primärbehandlung	Anzahl (N=112)	Gesamt	Anzahl	Genaues Verfahren
<b>Keine</b>	<b>3</b>			
<b>Operative Therapie</b>	<b>66</b>		1	Konisation
			5	Hysterektomie
			43	Radikal erw. Wh
			9	Radikal erw. Wh und komb. Radiatio
			2	Radikal erw. Wh und Afterload
			5	Radikal erw. Wh und adjuvante Chemotherapie
<b>Strahlentherapie</b>	<b>43</b>		38	Komb. Radiatio
			2	Nur Afterload
			3	Nur perkutane Radiatio

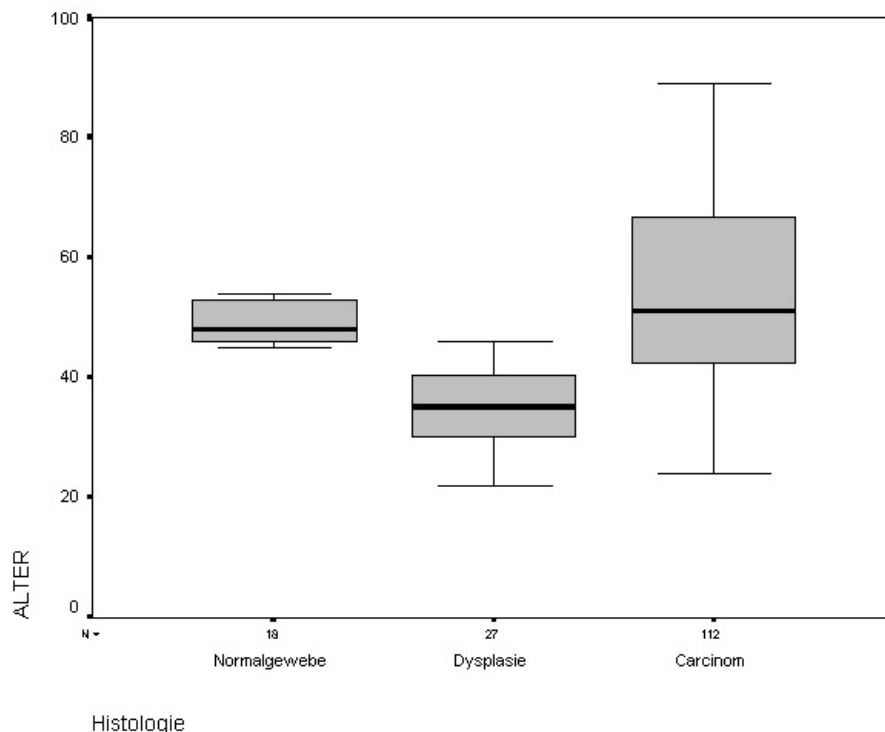
*Tabelle 4: Übersicht über die bei den Karzinompatientinnen erfolgten Primärtherapien. Radikal erw. Wh steht für radikal erweiterte abdominale Hysterektomie nach Wertheim, komb. Radiation für perkutane Bestrahlung in Verbindung mit Afterload.*

Daneben wurden 27 Präparate von Patientinnen, welche wegen eines CIN III in Behandlung waren, untersucht. Zum Vergleich mit Normalgewebe wurden 19 Präparate von Patientinnen herangezogen, die aufgrund eines Uterus myomatosus hysterektomiert wurden.

## 2.3 Altersverteilung der Kollektive

### 2.3.1 Gegenüberstellung der Altersverteilung von Karzinom- zu CIN III und Kontrollgruppenpatientinnen (*Abbildung 1*)

Der Mittelwert des Alters unserer Kontrollgruppenpatientinnen mit Uterus myomatosus lag bei 50,8 Jahren (Median bei 48 Jahren). Für die CIN Patientinnen lag der Mittelwert des Alters bei 36,6 Jahren (Median bei 35). Für die Karzinompatientinnen lag der Mittelwert des Alters bei 54,4 Jahren (Median bei 51).



*Abbildung 1: Boxplotdarstellung der Altersverteilungen der untersuchten Kollektive. Der waagerechte dunkle Balken in dem grauen Viereck entspricht dabei dem Median, das darumliegende graue Feld dem 50% Streubereich um den Median, die daraus nach außen hervorgehenden Balken entsprechen dem Streubereich ohne Ausreißer und Extremwerte.*

### 2.3.2 Altersverteilung der Karzinome in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium (*Abbildung 2*)

Der Mittelwert des Alters für die Patientinnen im FIGO-Stadium I lag bei 49,7 Jahren (Median bei 47 Jahren), für die Patientinnen im FIGO-Stadium II bei 59,6 Jahren (Median bei 49 Jahren), für die Patientinnen im FIGO-Stadium III bei 60,9 Jahren

## Material und Methoden

(Median bei 62) und für die Patientinnen im FIGO-Stadium IV bei 62,6 Jahren (Median bei 65 Jahren).

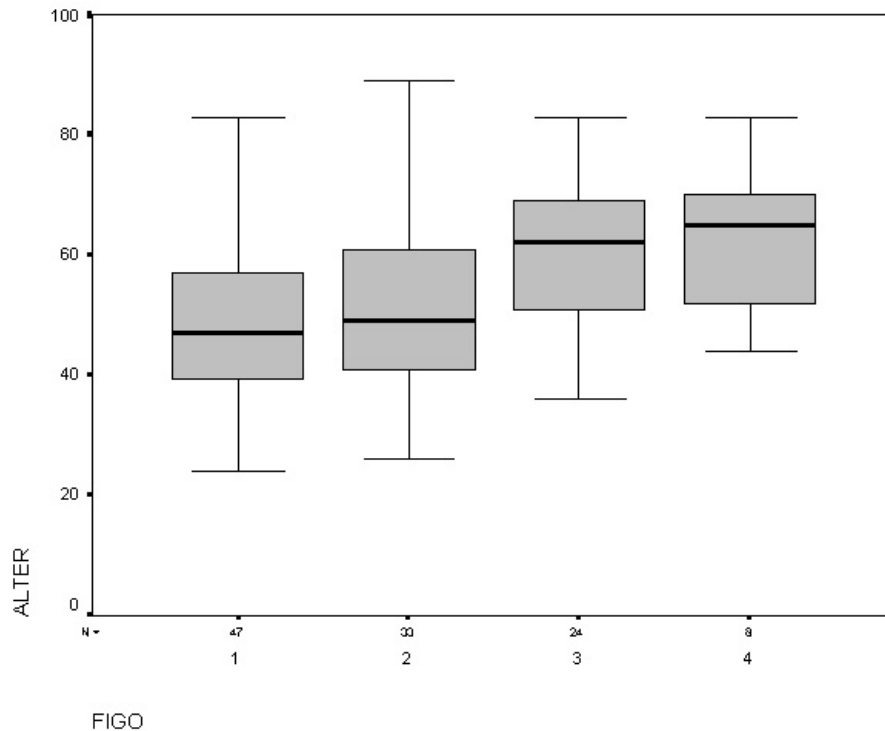


Abbildung 2: Altersverteilung der Karzinompatientinnen in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium.

### 2.3.3 Altersverteilung in Abhängigkeit vom Grading (Abbildung 3)

Der Mittelwert des Alters für Patientinnen mit gut differenzierten Karzinomen lag bei 39,4 Jahren (Median 37 Jahre), für die Patientinnen mit mässig differenzierten Karzinomen bei 55,2 Jahren (Median bei 53 Jahren) und für die Patientinnen mit gering differenzierten Karzinomen bei 55,0 Jahren (Median 51 Jahre).

## Material und Methoden

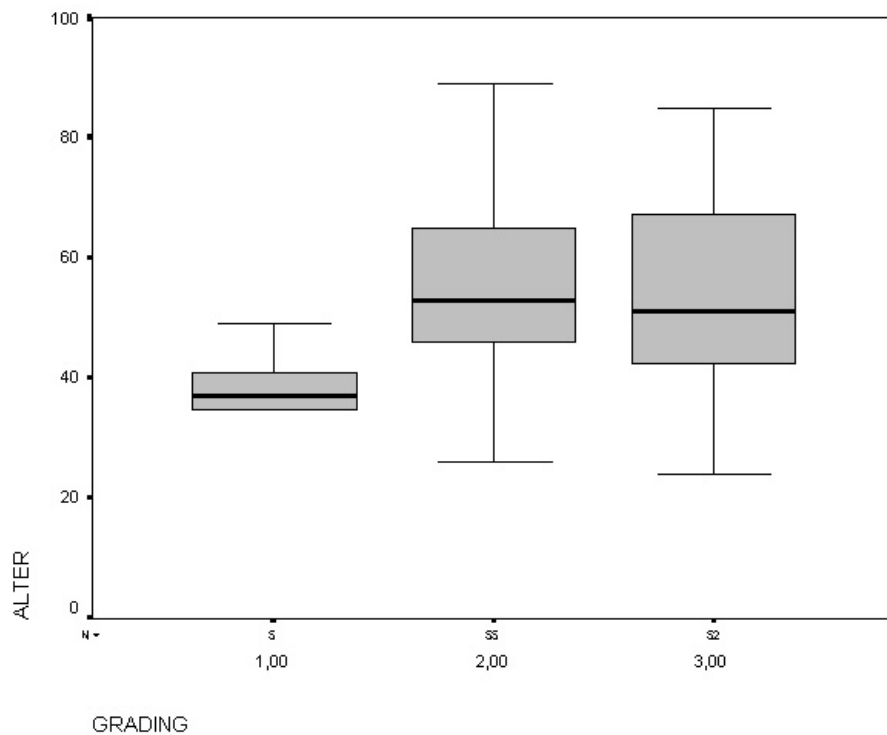


Abbildung 3: Altersverteilung nach Grading. 1,00 steht für gut, 2,00 für mäßig und 3,00 für gering differenzierte Karzinome.

## 2.4 Immunhistochemie

### 2.4.1 Schneiden und Entparaffinisierung der Präparate

Sämtliche Präparate standen als bereits durch die Pathologie anhand von HE-Schnitten bewertetes und in Paraffin eingebettetes Gewebe zur Verfügung. Die geeigneten Blöcke wurden anhand dieser Schnitte bestimmt, die Blöcke anschließend auf einer Kühlplatte auf ca.  $-12^{\circ}$  Celsius abgekühlt und dann mit einem Mikrotom in ca.  $4\ \mu\text{m}$  dicke Schnitte geschnitten. Diese wurden auf Objektträger (Superfrost Plus der Firma Menzel-Gläser) aufgezogen und anschließend für 24 Stunden bei  $36^{\circ}$  Celsius im Brutschrank getrocknet.

Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte, indem sie zunächst für 5 Minuten in einem Becken mit Xylol ("reinst", Firma J.T. Baker) und daraufhin für weitere 5 Minuten in einem weiteren Becken mit Xylol behandelt wurden. Daran anschließend

## Material und Methoden

kamen die Schnitte für 10 Minuten in ein Becken mit Aceton ("reinst", Firma J.T. Baker), für 10 Minuten in eine Aceton /TRIS Mischung (im Verhältnis 1:2) und abschließend nochmals für 10 Minuten in reinen TRIS-Puffer (34,25 g Tris HCL SIGMA Nr. T 3253, 4,00g TRIS Base SIGMA NR. T 1503 sowie 43,90g NaCL Merck pro analysi Art. 6404 auf 5 l Aqua tridest, dann auf pH 7,4-7,6 eingestellt). Daran schloss sich die Vorbehandlung an, wobei sich das weitere Vorgehen nach dem jeweiligen primären Antikörper richtete.

### 2.4.2 Vorbehandlung

Die Vorbehandlung dient dazu, maskierte Antigene freizulegen und so dem Antikörper besser zugänglich zu machen. Ob eine Vorbehandlung nötig ist, ist auch von der Art des verwendeten Antikörpers abhängig. Insofern kommen weitestgehend Herstellerempfehlungen zum Tragen. *Tabelle 5* gibt einen Überblick über die im folgenden beschriebenen Vorbehandlungen und Primärantikörperapplikationen.

Arbeitsschritt	CR-1	TGF $\alpha$	erbB-2
Vorbehandlung	Mikrowelle	Saponin	keine
Abdecken unspezifischer Bindungsstellen	30 min hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum		
Primärantikörperapplikation	bei 4°Celsius über Nacht	bei 4° Celsius über Nacht	1 h bei Raumtemperatur

*Tabelle 5: Übersicht über Vorbehandlung und Primärantikörperinkubation*

#### 2.4.2.1 CR-1

Für die CR-1-Färbungen wurden die Schnitte für 20 min in Zitratpuffer (10 mM, pH 6.0) in der Mikrowelle sprudelnd gekocht. Anschließend kühlten die Präparate für ca. eine Stunde bei Raumtemperatur langsam ab, bis sie wieder Raumtemperatur erreicht hatten. In der Folge wurden die Präparate einmal mit Aqua tridest und dreimal für 5 min in TRIS gespült.



#### **2.4.2.2 TGF $\alpha$**

Für die TGF $\alpha$  Färbung wurde die Präparate für 30 min bei Raumtemperatur mit Saponin 0,05% behandelt (0,05 g Saponin (SIGMA S 21499) auf 100 ml Aqua tridest) und anschließend 3x 5 min in TRIS Puffer gespült.

#### **2.4.2.3 erbB-2**

Für die erbB-2 Detektion erfolgte keine Vorbehandlung.

### **2.4.3 Abdecken unspezifischer Bindungsstellen**

Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Präparate für eine halbe Stunde mit zuvor hitzeinaktiviertem (30 min bei 56° Celsius im Wasserbad) fötalem Kälberserum (Firma Seromed S 0113) überdeckt, um unspezifische Färbereaktionen so gering wie möglich zu halten. Danach wurden die Präparate mit TRIS-Puffer kurz gespült und der jeweilige Primärantikörper aufgetragen.

### **2.4.4 Inkubation mit dem Primärantikörper**

#### **2.4.4.1 Primärantikörper CR-1**

Für die CR-1 Färbungen wurden die Präparate nach Auftragen des Primärantikörper (Affinity purified CR67, polyklonaler Kaninchen Antikörper, Originalkonzentration 50  $\mu$ g/ml freundlicherweise zur Verfügung gestellt von W.J. Gullick, Imperial Cancer Research Fund, Royal Postgraduate Medical School, Hammersmith Hospital, London) in einer Verdünnung von 1:20 mit TRIS-Puffer entsprechend einer Anwendungskonzentration von 2,5  $\mu$ g/ml über Nacht bei 4°Celsius inkubiert. Der Antikörper richtet sich gegen die Aminosäuren 97-113 des humanen CR-1-Proteins und wird mit Hilfe des entsprechenden synthetischen Peptids mit der Aminosäurenabfolge CPPSFYGRNCEHDVRKE gewonnen<sup>85, 130</sup>.

#### 2.4.4.2 Primärantikörper TGF $\alpha$

Für die TGF $\alpha$  Färbung wurde der Primärantikörper (Oncogene TGF $\alpha$  Cat# GF 10, Maus monoklonal IgG) im Verhältnis 1:30 mit Tris verdünnt, um so zu einer Anwendungskonzentration von 3,3  $\mu$ g/ml zu gelangen und die Präparate dann bei 4° Celsius im Kühlschrank über Nacht mit ihm inkubiert. Der Antikörper erkennt eine Zielregion innerhalb der 17 carboxyterminalen Aminosäuren des TGF $\alpha$  Moleküls und ist hervorragend für die Immunhistochemie am Paraffinschnitt geeignet <sup>131</sup>.

#### 2.4.4.3 Primärantikörper erbB-2

Für die erbB-2 Färbung wurde der Antikörper (Oncogene c-neu (Ab-2) Cat# OP14, Maus monoklonal, Originalkonzentration 100  $\mu$ g/ml) in einer Verdünnung 1:10 mit TRIS entsprechend einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml aufgetragen und die Präparate für 60 min bei Raumtemperatur mit ihm inkubiert. Dieser Antikörper richtet sich nach Herstellerangaben gegen die extrazelluläre Domäne von p185-erbB-2.

#### 2.4.5 Anwendung von Brückenantikörpern

Brückenantikörper und Entwicklung	CR-1	TGF $\alpha$	erbB-2
1. Schritt	Maus anti Kaninchen	Kaninchen anti Maus	Kaninchen anti Maus
2. Schritt	Kaninchen anti Maus	APAAP-Komplexantikörper	APAAP-Komplexantikörper
3. Schritt	APAAP-Komplexantikörper	Kaninchen anti Maus	Kaninchen anti Maus
4. Schritt	-	APAAP-Komplexantikörper	APAAP-Komplexantikörper
5. Schritt	Entwicklung (sieheText)		

Tabelle 6: Übersicht über Brückenantikörper und Entwicklung

## Material und Methoden

Zur Detektion wurde das APAAP-System verwendet (Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase). Je nach Primärantikörper wurden die Präparate dazu zunächst mit verschiedenen Brückenantikörpern behandelt. Die Inkubation mit den Brückenantikörpern erfolgte jeweils bei Raumtemperatur; zwischen den Arbeitsgängen wurde jeweils mit TRIS gespült. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mit TRIS. Eine Übersicht gibt *Tabelle 6*.

### **2.4.5.1 Brückenantikörper für CR-1**

Für die CR-1 Färbung wurde zunächst ein monoklonaler muriner IgG Antikörper gegen Kaninchenimmunglobuline (Dianova Nr 211-005-109) in der Verdünnung 1:40 für 30 min aufgetragen. Die Präparate wurden dann nach Spülung mit TRIS-Puffer für 30 min mit einem monoklonalen Kaninchen IgG Antikörper gegen Immunglobuline der Maus ( Dianova Nr.315-005-045) ebenfalls in der Verdünnung 1:40 inkubiert, dann letztendlich nach erneutem Spülen mit TRIS-Puffer der oben beschriebene APAAP -Komplexantikörper (Verdünnung1:40) für ebenfalls 30 min aufgetragen, wiederum mit TRIS-Puffer gespült und entwickelt.

### **2.4.5.2 Brückenantikörper für TGF $\alpha$ und erbB-2**

Nach erneutem Spülen mit TRIS-Puffer wurden die Präparate für 30 min mit einem Kaninchen-Anti-Maus Brückenantikörper (IgG, Firma Dianova No 315-005-045) in der Verdünnung 1: 40 inkubiert, anschließend nach Spülen mit TRIS-Puffer der APAAP-Komplex Antikörper (Firma Dianova Best.-Nr. M800) ebenfalls in der Verdünnung 1:40 aufgetragen und für eine halbe Stunde einwirken gelassen. Nach Spülen mit TRIS-Puffer folgte ein weiterer Inkubationszyklus mit Brückenantikörpern, wobei zuerst der KAM (Kaninchen anti Maus) Brückenantikörper wie anschließend auch der APAAP-Komplexantikörper in den obigen Konzentrationen für jeweils 10 min auf die Präparate aufgetragen wurden und zwischen den Arbeitsgängen die Präparate wieder mit mit TRIS-Puffer gespült wurden.

### 2.4.6 Entwicklung

Zur Entwicklung wurden zunächst 175 ml Entwicklungspuffer ( 8,7 g NaCl (MERCK 6404), 1,5 g TRIS-HCl (SIGMA T-3253), 4,9 g TRIS-Base (SIGMA T-1503) in 1 l Aqua bidest) und 62,5 ml Propandiol ( 21,0 g Propandiol MERCK 801464 in 1 l Aqua bidest) in einen Erlenmeyerkolben gegeben und bei Raumtemperatur auf pH 9,75 eingestellt. Anschließend wurden 100 mg Levamisole (SIGMA L-9756) zur Unterdrückung der Aktivität der endogenen alkalischen Phosphatase appliziert. In zwei kleinen Bechergläsern wurden einmal 125 mg Naphtol-As-Bi-Phosphat (SIGMA N-2250) in 1500 µl Dimethylformamid (MERCK 3034) gelöst - im weiteren als Lösung 1 bezeichnet- und in dem zweiten Becherglas 50 mg Natriumnitrit (MERCK 102-F-0220) in 1250 µl Aqua bidest gelöst und nach Zugabe von 500 Mikrolitern Neufuchsin (5 g Neufuchsin (Merck 4040) in 100 ml 2-molarer HCl gelöst) unter Schütteln für eine Minute reagieren gelassen - im folgenden Lösung 2 genannt. Anschließend werden erst Lösung 2, dann Lösung 1 in den Erlenmeyerkolben mit dem Entwicklungspuffer gegeben und auf pH 8,8 eingestellt. Unmittelbar nach dem Zubereiten wird die Lösung filtriert und die Präparate werden in Küvetten auf einem Schüttler für 30 min mit der Entwicklungslösung inkubiert. Nach dieser Zeit werden die Präparate zweimal in TRIS gespült und dann für 45 s in Hämalaun (Ansatz: 1 g Hämatoxylin (MERCK 4305), 0,2 g NaJO<sub>3</sub> (MERCK 6525), 50 g Kalialaun (MERCK 507 A 95744) in 1 l Aqua bidest gelöst und über Nacht gerührt, am nächsten Tag Zugabe von 50 g Chloralhydrat (MERCK 425) und 1 g Zitronensäure (MERCK 244) und nochmaliges Rühren über Nacht) gegengefärbt. Danach wurden die Präparate für 10 min mit Leitungswasser gespült, anschließend mit auf 50-60 ° Celsius erhitzter Glyceringelatine (Kaisers Glyceringelatine MERCK 9242) eingebettet und mit Deckgläschen abgedeckt.

## **2.5 Kontrollen**

### **2.5.1 Spezifität der Antikörper**

#### **2.5.1.1 CR-1-Primärantikörper**

Die Spezifität des verwendeten CR-67 Antikörper ist bereits mehrfach von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen worden<sup>132</sup>.

Dennoch wurde die Spezifität der Antikörperbindung am Präparat durch Blockade des Antikörpers mit dem Zielpeptid überprüft. Zur Blockade des Antikörpers wurde der Primärantikörper CR-67 vor dem Auftragen desselben auf die Präparate mit dem Zielpeptid im 100fachen Überschuss versetzt und zwei Stunden bei 37° Celsius inkubiert. Schnitte derselben Karzinome, welche auch Gegenstand der Peptidverdrängung waren, wurden in den Färbungen als Positivkontrolle mitgeführt.

#### **2.5.1.2 TGF $\alpha$ Primärantikörper und erbB-2 Primärantikörper**

Zur Spezifität des TGF $\alpha$  Antikörpers wird auf die Arbeit von Sorvillo et al verwiesen<sup>131</sup>.

Die Spezifität des erbB-2 Antikörpers wird vom Hersteller an der Mammakarzinomzelllinie SKBR3, welche eine 5-8 fach Genamplifikation für erbB-2 und bis zu 128 fach erhöhten mRNA Gehalt aufweist, überprüft und ist bereits in anderen Publikationen dargelegt worden<sup>133</sup>. Er erzeugt in der Immuncytochemie eine Membranfärbung, in der Immunhistochemie laut Herstellerangaben auch ein zytoplasmatisches Färbemuster.

### **2.5.2 Positivkontrollen und Negativkontrollen**

In den einzelnen Färbevorgängen mitgeführte bekannt positive Präparate dienen einerseits dazu, falsch negative Ergebnisse auszuschließen. Durch Anfärbung der betreffenden Präparate kann sichergestellt werden, daß der benutzte Antikörper in der entsprechenden Färbung das betreffende Antigen, wenn es vorhanden ist, auch anfärbt (Sensitivitäts-Maß für die Erfassung der richtig Positiven). Darüberhinaus bieten sie ein Maß für methodisch bedingte Schwankungen der Färbeintensität. Ein

## Material und Methoden

Nichtanfärben der Positivkontrolle führte zu einem Verwerfen der Färbung und einer Wiederholung derselben.

Negativkontrollen dienen dazu, Farbreaktionen, die nicht auf der Antigenbindung des Primärantikörpers beruhen ("Falsch Positive Färbesignale"), erkennen und ausschließen zu können.

Negativkontrollen erfolgten durch Ersetzen des Primärantikörpers durch Puffer (*Bild 2*). Erfolgte dennoch eine Anfärbung der Negativkontrolle, so wurde die Färbung verworfen und wiederholt.

CR-1:

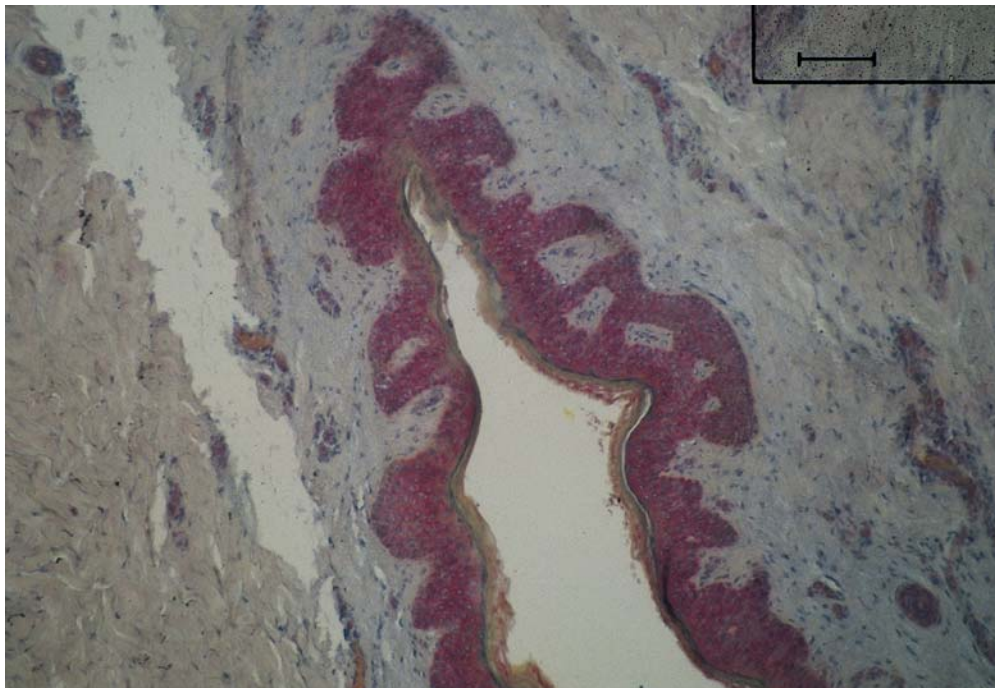
Die in die Färbungen integrierten Positivkontrollen waren Zervixkarzinome, bei denen die Spezifität der Färbereaktion bereits durch eine Peptidverdrängung nachgewiesen wurde.

TGF $\alpha$

Als Positivkontrolle dienten Epidermisschnitte (*Bild 1*).

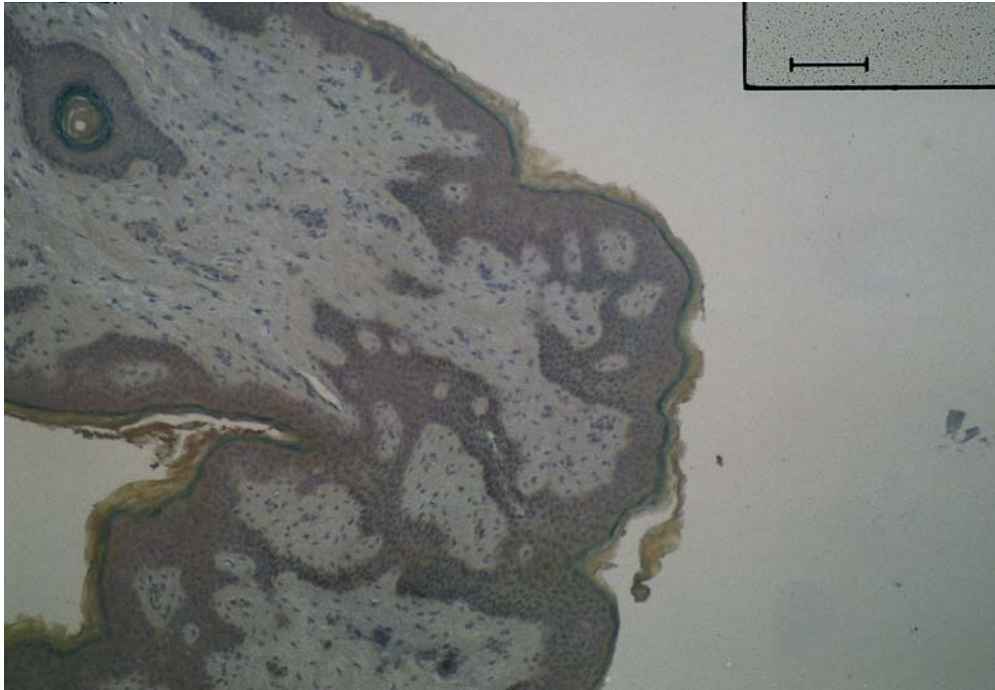
erbB-2

Als Positivkontrolle dienten Mammakarzinomschnitte (*Bild 3*).

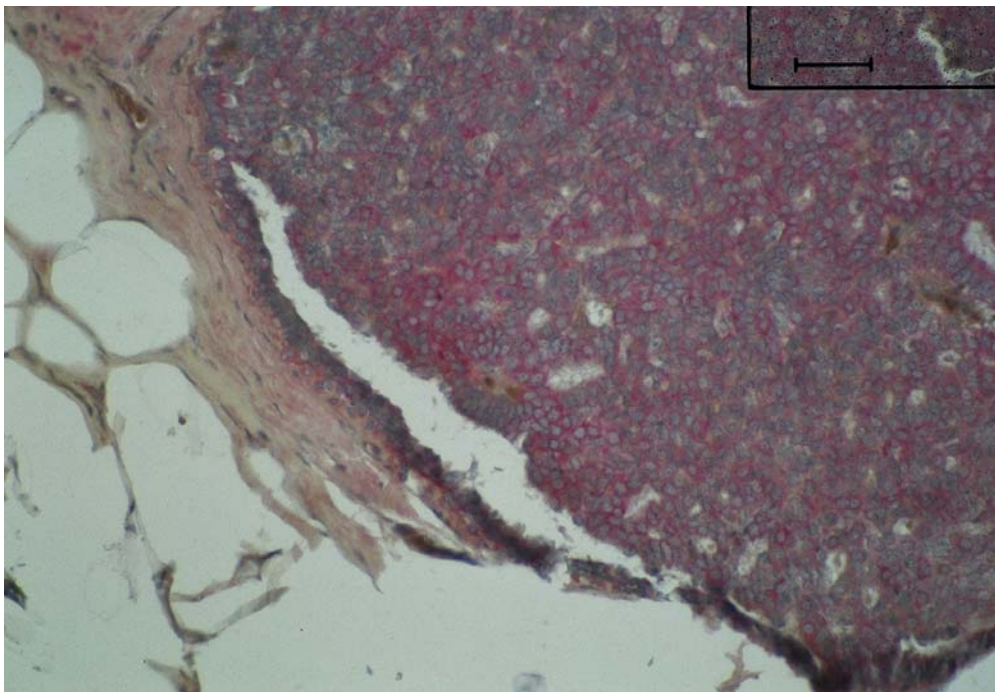


*Bild 1: Positivkontrolle TGF  $\alpha$  Epidermis (100.fach)*

## Material und Methoden



*Bild 2: Beispiel einer Negativkontrolle, hier Epidermis für TGF  $\alpha$  (100 fach)*



*Bild 3: Positivkontrolle erbB-2: Mammakarzinom(200 fach).*

## 2.6 Auswertung

Die Auswertung der Präparate erfolgte nach einem immunreaktiven Score durch zwei unabhängige Bewerter ohne Kenntnis der klinischen Parameter, deren Ergebnisse gemittelt wurden. Ein dritter Bewerter führte stichprobenhafte Kontrollen durch.

Die Färbeintensität wurde dabei mit 0 (negativ), 1 (schwach positiv), 2 (mäßig positiv) und 3 (stark positiv) bewertet, wobei jeweils die stärkste erreichte Färbintensität betrachtet wurde. Das am stärksten positive Präparat und ein negatives Präparat dienten dabei als Referenz. In einem weiteren Schritt wurde dann der Prozentsatz der angefärbten Zellen betrachtet und ebenfalls mit einem Faktor bedacht; 0 (keine Anfärbung), 1 (0-10% der Zellen weisen eine Färbung auf), 2 (10-50% angefärbt), 3 (50-80% angefärbt), 4 (80-100% angefärbt). Dabei blieb eine eventuelle Anfärbung im Bindegewebe oder anderen Nicht-Zielgeweben unberücksichtigt. Die so gewonnenen Faktoren wurden dann miteinander multipliziert, um zu einem Gesamtscore zu gelangen. Aus dem oben gesagten ergibt sich, daß die Färbung insgesamt auf einer Skala von 0-12 Ausdruck fand (vgl. Tabelle 7). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS Version 10.0 für Windows. Statistische Aussagen wurden dabei dann als signifikant gewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  unter 5% lag ( $p < 0,05$ ). Als statistische Verfahren fanden dabei der Chi-Quadrat Test, der Logranktest, der Mann-Whitney U Test und der Spearman Korrelationskoeffizient Verwendung. Als Ansprechpartner aus dem Institut für Statistik im Hause stand Dr. Justus Welke beratend zur Seite.

Die Auswertung der Überlebensdaten erfolgte durch Auswertung der Krankenakten, direkten Patientenkontakt, Auswertung der Nachsorgeakten der gynäkologischen Poliklinik und der Strahlenambulanz sowie durch Anschreiben der Hausärzte und der Einwohnermeldeämter.



## Material und Methoden

maximale Färbeintensität		Prozentzahl angefärbter Zellen		
0= keine Anfärbung	x	0= keine Zellen angefärbt	=	Immun- reaktiver Score von 0-12
1= schwache Anfärbung		1= 0-10% der Zellen angefärbt		
2= mäßige Anfärbung		2= 10-50% der Zellen angefärbt		
3= starke Anfärbung		3= 50-80% der Zellen angefärbt		
		4= 80-100% der Zellen angefärbt		

*Tabelle 7: Errechnung des Immunreaktiven Scores nach Stegner und Remmele*