

### **3. Material und Methodik**

#### **3.1. Krankengut**

##### **3.1.1. Datenerhebung**

Die Daten werden retrospektiv mit Hilfe von standardisierten Erhebungsbögen (Anhang 8.1.) in einer Datenbank des Statistikprogrammes SPSS (*"Statistical Package for the Social Sciences"*) erfaßt. Grundlage der Erhebung bilden die Krankenakten der stationären Aufenthalte sowie der Nachsorgebesuche in der chirurgischen Poliklinik, die OP- Berichte, die pathologischen Befunde sowie Informationen durch Einwohnermeldeämter und Hausärzte. Alle Patienten, die zwischen 1982 und 1993 mit der Diagnose eines kolorektales Karzinom operiert und im Anschluß daran von der chirurgischen Poliklinik des UKBF<sup>1</sup> lückenlos betreut wurden, werden bei der Datenerhebung berücksichtigt. Die im folgenden definierten Ein- und Ausschlußkriterien bestimmen dasjenige Kollektiv aus der Gesamtheit der erfaßten Patienten, das in dieser Arbeit berücksichtigt wird.

Insgesamt werden 29 Merkmale sowie deren verschiedene Ausprägungen aus den Krankenunterlagen der Patienten erfaßt und mit Hilfe eines eindeutig festgelegten Schlüssels kodiert (Anhang 8.1.). Die Variablen "Alter" bzw. "Zugehörigkeit zu einer Altersgruppe", "Gesamtüberlebenszeit", "lokalrezidiv-, fernmetastasen- und tumorereignisfreie Überlebenszeit" lassen sich aus den erfaßten Basisdaten berechnen. Für Patienten, die mindestens 5 Jahre nach der Operation noch lebten, wird für die statistische Analyse als Überlebenszeit pauschal 60 Monate angegeben und zwar unabhängig von der tatsächlichen Überlebenszeit.

Die Primärtumore werden gemäß der IUAC<sup>2</sup> von 1997 (39) und der darauf beruhenden Einteilung der AJCC<sup>3</sup> (40) klassifiziert. Tumore, die im pathologischen Befund nach einer älteren Klassifikationsart kodiert waren, werden entsprechend der aktuellen Version der TNM- Einteilung umkodiert.

---

<sup>1</sup> UKBF: Universitätsklinikum Benjamin Franklin

<sup>2</sup> International Union Against Cancer

<sup>3</sup> American Joint Committee on Cancer

In Fällen mit adjuvanter Chemo- oder Radiotherapie wird nach prä- oder postoperativer Behandlung, Dauer und Dosis differenziert. Lokalrezidive oder Fernmetastasen, die in zeitlicher Folge auftraten, werden aufsteigend nummeriert und jeweils mit Datum, Lokalisation, Therapie und Identifikationsnummer des histologischen Präparates dokumentiert. In Fällen einer Metastasierung zum selben Zeitpunkt in mehreren Organen, werden alle unterschiedlichen Lokalisationen mit den entsprechenden Angaben einzeln aufgeführt.

Die Variablen "**Gefäßdichte des Tumors**" und "**Expression des *basic Fibroblast Growth - Factor***" (bFGF) werden experimentell ermittelt (Kapitel 3.12., 3.13). Die Gefäßdichte wird dabei aus der Anzahl der Gefäße in den jeweils vier am dichtesten vaskularisierten mikroskopischen Gesichtsfeldern bestimmt. Die Expression des bFGF wird mit einer Statusangabe "mit/ohne" in die Datenbank aufgenommen.

### **3.1.2. Einschlußkriterien**

Zum 30.8.1996 waren 556 Patienten mit der Diagnose „kolorektales Karzinom“ in der elektronischen Datenbank der Chirurgischen Poliklinik des UKBF erfaßt. Diese wurden im Zeitraum zwischen 1982 und 1995 wegen dieser Tumorerkrankung operiert. Von den 556 Patienten erfüllen 146 die unten aufgeführten Einschlußkriterien.

1. Von den erfaßten Patienten werden nur diejenigen in die Untersuchung eingeschlossen, deren kolorektales Karzinom histologisch gesichert ist und die kurativ operiert worden sind, d.h. die Resektionsränder müssen makro- und mikroskopisch frei von Tumorzellen sein (R0).
2. Um eine vergleichbare Ausgangssituation für die Analyse des Zeitraumes von der Operation bis zum Auftreten von Metastasen erhalten zu können, werden nur Patienten in das Untersuchungskollektiv aufgenommen, bei denen es zum Zeitpunkt der Operation noch nicht zu einer Metastasierung des Tumors gekommen ist. Diese Einschränkung wird bewußt mit der Absicht gewählt, einen möglichen Prognosefaktor ermitteln zu können. Dieser soll dem behandelnden Arzt zum Zeitpunkt der Operation des Primärtumors Hinweise über die

Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Rezidivs geben, was für das adjuvante Therapiekonzept relevant sein kann.

3. Mindestens ein zur immunhistochemischen Analyse geeignetes Präparat des Tumors muß in der Tumorbank des pathologischen Instituts vorhanden sein.
4. Die Patientendaten dürfen keine schwere Zweiterkrankung einschließlich einer Zweitneoplasie aufweisen.
5. Es werden die Gewebeschnitte nur derjenigen verstorbenen Patienten eingeschlossen, deren Tod tumorbedingt eintrat und nicht in die Phase der postoperativen Sterblichkeit von 30 Tagen nach Operation fällt.
6. Nur diejenigen Patienten werden berücksichtigt, die bis zum Zeitpunkt der Aktendurchsicht im August 1996 eine Mindestbeobachtungszeit von 60 Monaten nach der Operation aufweisen oder bis zu diesem Zeitpunkt verstorben sind.
7. Die Aufnahme in das Untersuchungskollektiv setzt die Vollständigkeit der demographischen, klinischen und pathologischen Daten voraus.

### **3.2. Tumorpräparate**

Die experimentellen Untersuchungen zu Expression der Angiogenesefaktoren und Gefäßdichte des Tumors werden an Schnitten der Primärtumore durchgeführt (Kapitel 3.2.), deren Präparate in der Tumorbank des pathologischen Institutes des UKBF aufbewahrt werden. Mit Hilfe der histologischen Identifikationsnummer des Pathologiebefundes des Primärtumors können die entsprechenden Präparate der kolorektalen Karzinome eindeutig identifiziert werden. Von jedem Operationspräparat werden die Abtragungsebenen und mindestens ein Stück des Tumors in getrennten Paraffinblöcken aufbewahrt. Die Paraffinblöcke können mit Hilfe der vom Pathologen gefärbten, beschrifteten und bewerteten Tumorschnitte den einzelnen Abschnitten des Resektates (Abtragungsebenen, Tumor, Lymphknoten) zugeordnet werden.

### **3.3. Antikörper**

Den theoretischen Überlegungen zur Angiogenese beim kolorektalen Karzinom folgend (Kapitel 1.5.) werden Antikörper für die immunhistochemischen Untersuchungen ausgewählt. Da für diese keine Anleitung für die Anwendung an Paraffinschnitten, die in Formalin fixiert sind, existiert, muß in einer Reihe von

Voruntersuchungen ein geeignetes Protokoll entwickelt werden. Im Anhang (Kapitel 8.4.2) ist das Schema aufgeführt, nach dem die Antikörper ausgetestet und die Vorbehandlung der Tumorschnitte optimiert wurde. Ziel dabei ist es, einerseits das Antigen spezifisch, reproduzier- und auswertbar zu markieren oder andererseits eine Exprimierung der entsprechenden Antigene auszuschließen (Kapitel 3.11.).

### **Antikörper JC/70**

Bei JC/70 handelt es sich um einen monoklonalen Maus- Antikörper (Klon JC/70A) vom Isotyp IgG1,  $\kappa$ , der gegen das Glykoprotein PECAM (*Platelet / Endothelial Cell Adhesion Molecule*), welches auch als CD31 oder endo-CAM-1 (*endothelial Cell Adhesion Molecule*) bezeichnet wird, gerichtet ist. Bei der Herstellung des Antikörpers dient Milzgewebe eines Patienten mit einer Haarzelleukämie als Immunogen. Die Spezifität des Antikörpers ist identisch mit derjenigen der CD31-Antikörper-Gruppe, was durch Immunoblots, immunhistochemische Analysen und durch die Reaktivität mit transfizierten, das CD31-Antigen exprimierenden, murinen Zelllinien nachgewiesen wurde (104). Der Antikörper wurde 1993 in den 5<sup>th</sup> *International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens* aufgenommen und seine Reaktivität mit dem CD31-Antigen bestätigt. Der Antikörper ist durch seine starke Reaktivität mit formalinresistenten Epitopen auf CD31 von Endothelzellen in Normalgewebe, sowie in gut- und bösartigen Proliferationsgewebe charakterisiert. Auf Gefrierschnitten und Blutaussstrichen markiert der Antikörper auch Megakaryozyten, Thrombozyten und gelegentlich Plasmazellen. Er reagiert schwach mit B-Zellen, peripheren T-Zellen und Neutrophilen (104). Der Antikörper wird von der Firma DAKO A/S, Glostrup / Dänemark in flüssiger Form als Gewebeüberstand (RPMI 1640 Medium mit fötalem Kälberserum) dialysiert gegen 0.05 M Tris/HCL mit 15 mM NaN<sub>3</sub> und pH 7.2 bezogen. Die Maus- IgG- Konzentration des Antikörperpräparates beträgt 345 mg/l bei einer totalen Proteinkonzentration von 13.7 g/l.

### **Anti-bFGF- Antikörper**

Es handelt sich um einen monoklonalen Maus- Antikörper, der durch Immunisierung von BALAB/c- Mäusen mit rekombinanten bFGF und Fusion mit dem Plasmocytom SP2/0-Ag14 hergestellt wird. Der Antikörper neutralisiert die biologische Aktivität von bFGF und zeigt keine Kreuzreaktivität mit aFGF (*acidic Fibroblast Growth Factor*). Der Antikörper wird von der Firma Calbiochem-Novabiochem International, Cambridge, USA bezogen. 100 µg des gereinigten Antikörpers sind in 1.0 ml 0.05 M Natriumphosphat -Puffer gelöst.

### **3.4. Methoden der Antigenfärbung**

Die Immunhistochemie ist eine Technik zur Identifikation zellulärer oder Gewebestandteile (Antigene) mittels Antigen- Antikörper- Interaktionen. Der Ort der Antikörperbindung wird dabei entweder durch direkte Antikörpermarkierung oder durch Verwendung einer indirekten Markierungsmethode identifiziert.

Man unterscheidet die direkten und die indirekten Formen der Antigen-detektion. Bei der direkten Methode ist an den spezifischen Primärantikörper ein Enzym konjugiert, welches nach Zugabe eines geeigneten Substrates eine Farbreaktion katalysiert und dadurch am Ort des Antigens zu einer Anfärbung führt. Als Enzym wird hierfür meist Peroxidase oder alkalische Phosphatase verwendet und als Substrat z.B. Diaminobenzidin oder Neufuchsin / Naphthol-AS-BI-Phosphat. Dabei spaltet das Enzym ein Molekül aus dem Substrat ab, welches sich mit einem Salz im Inkubationsmedium verbindet und einen Azofarbstoff bildet, der unter dem Lichtmikroskop zu erkennen ist. Im Unterschied dazu ist bei der indirekten Methode das für die Farbreaktion erforderliche Enzym an einen zweiten Antikörper gebunden, der wiederum spezifisch gegen den am Antigen gebundenen Primärantikörper gerichtet ist. Voraussetzung hierfür ist, daß der Sekundärantikörper einer anderen Spezies entstammt als der Primärantikörper. Der Sekundärantikörper stellt also die Verbindung zwischen dem am Antigen gebundenen Primärantikörper und dem Enzym her. Der Vorteil der indirekten Technik besteht darin, gleiche Sekundärantikörper für unterschiedliche Primärantikörper verwenden zu können.

Dabei muß vorausgesetzt werden, daß die Primärantikörper der selben Spezies entstammen (105). Der am Antigen gebundene Primärantikörper ist mit mehreren Sekundärantikörpern verbunden und diese konsequenterweise auch mit den entsprechenden Enzymmolekülen. Dadurch wird bei der indirekten Methode das entstehende Farbsignal verstärkt und die Sensitivität der Antigendetektion erhöht. Aufgrund der erhöhten Sensitivität kann der Primärantikörper in niedrigerer Konzentration verwendet werden. Das Prinzip der indirekten immunhistoimmunhistochemischen Färbung läßt sich durch Einführung weiterer Antikörper, die zwischen Primärantikörper und enzymtragenden Antikörpern vermitteln, modifizieren. Bei der in vorliegender Arbeit verwendeten APAAP-

(Alkalische- Phosphatase-Anti- Alkalische-Phosphatase) Methode wird der Primärantikörper über einen Sekundärantikörper, der aufgrund seiner Funktion als Brückenantikörper bezeichnet wird, an einen Komplex bestehend aus anti- alkalische Phosphatase - Antikörpern und dem Enzym alkalische Phosphatase gebunden. Das zugehörige Schema ist in **Abb. 3-1** wiedergegeben. Im Fall der APAAP-Technik sind also die spezifischen Antigenbindungsstellen der anti- alkalischen Phosphatase-Antikörper durch die alkalische Phosphatase-

Moleküle abgedeckt. Der Sekundärantikörper wird im Überschuß

zugegeben, damit eines seiner beiden identischen Bindungsstellen am konstanten Bereich des Primärantikörpers und der andere an demjenigen eines anti-alkalischen Phosphatase-Antikörpers des APAAP-Komplexes bindet. Damit der Sekundärantikörper zwei andere Antikörper gleichzeitig binden kann, müssen diese einen identischen Abschnitt aufweisen. Gewährleistet wird das dadurch, daß diese

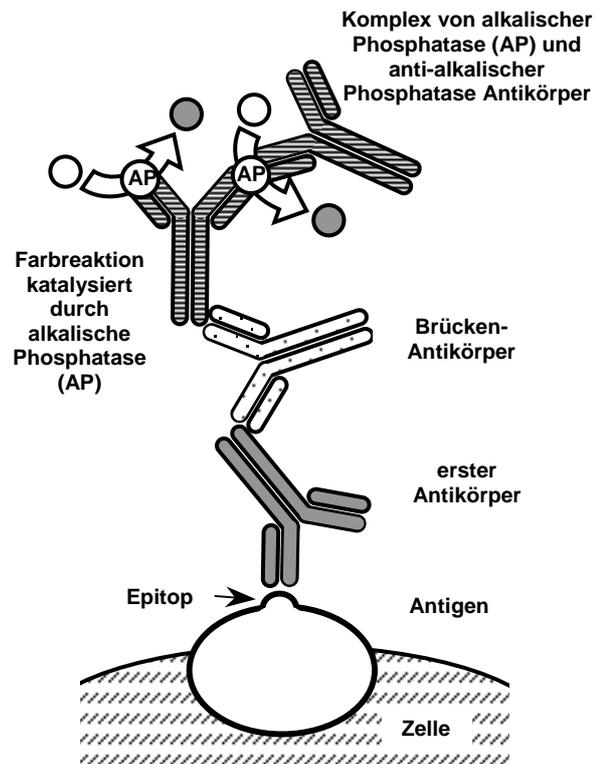


Abbildung 3-1: Schema APAAP-Methode

der gleichen Spezies entstammen und damit eine ähnliche konstante Region des Antikörpers aufweisen. Neben den oben beschriebenen Vorteilen der indirekten immunhistochemischen Technik bietet die APAAP-Technik zusätzlich die Möglichkeit, eine Färbung durch weitere Anlagerung von APAAP-Komplexen zu verstärken. Dabei tritt keine nennenswerte Anhebung der unspezifischen Färbung auf, da die Antigenbindungsstellen des APAAP-Komplexes durch Bindung mit dem Enzym nicht mehr für unspezifische Bindungen an das Gewebe zur Verfügung stehen. Um eine optimale Färbung zu erhalten und eine Ausfällung der Antikörper auf dem Gewebeschnitt zu verhindern, müssen die verwendeten Antikörper in der richtigen Konzentration verwendet werden. Die optimale Verdünnung des Primärantikörpers ist abhängig von der Antigendichte im Gewebe und muß in einem bestimmten Verhältnis zu sekundären und tertiären Antikörpern stehen. Ist die Konzentration des Primärantikörpers z.B. zu hoch gewählt für die vorhandene Antigendichte, so kann es dazu kommen, daß der Sekundärantikörper mit seinen beiden Antigenbindungsstellen an benachbarten Antigenen bindet und folglich keine Antigenbindungsstelle für die Verbindung mit dem Tertiärantikörper bzw. APAAP-Komplex zur Verfügung steht. Die optimalen Konzentrationen müssen für das jeweilige Antigen bzw. die beteiligten Antikörper vor Beginn der Färbereihen ermittelt werden. Die verschiedenen Antikörperschichten werden nacheinander auf den Gewebeschnitt gegeben. Zwischen den einzelnen Inkubationszeiten muß der nicht-gebundene Anteil der Antikörper aus dem Schnitt entfernt werden, um ungewollte Komplexbildungen zwischen Antikörpern und Enzymkomplexen und konsekutiver Farbreaktion bei Zugabe des Substrates, die nicht spezifisch über den Primärantikörper an das Gewebe gebunden sind, zu verhindern. Dazu wird der Schnitt zwischen den Inkubationsschritten mit einer Pufferlösung gespült. Damit sich während der Inkubation die Konzentration der Antikörper in der Inkubationslösung nicht verändert, was zur Bildung von unspezifischen Präzipitaten führen könnte, läuft der Vorgang in einer feuchten geschlossenen Kammer ab, um ein Verdunsten der Flüssigkeit zu verhindern.

### **3.5. Blockierung endogener Enzyme**

Wenn Enzyme, die mit dem zugesetzten Substrat reagieren können, im Gewebe endogen vorhanden sind, kann es zu einer Farbreaktion unabhängig von der

Antigenlokalisation am Ort des endogenen Enzyms kommen. Um die dadurch verursachte falsch-positive Färbung zu verhindern, müssen die endogenen Enzyme inaktiviert werden.

Bei den alkalischen Phosphatasen handelt es sich um eine Gruppe von Enzymen, die Phosphatmonoester bei einem alkalischen pH - Wert hydrolysieren. Drei Isoenzyme werden nach den Geweben benannt, in denen ihre höchsten Konzentrationen gefunden werden. Es handelt sich dabei um die plazentare (PAP), die intestinale (IAP) und die gewebeunspezifische Form, die u.a. in Knochen, Nieren, und Leber nachgewiesen werden können. Während die gewebeunspezifische Form in verschiedenen Geweben exprimiert wird, findet sich die intestinale Form ausschließlich im Dünndarm und die plazentare nur in der Plazenta (106). Die endogene alkalische Phosphatase, z.B. in Endothelzellen und Granulozyten, kann durch die Zugabe von Levamisol in die Inkubationslösung blockiert werden (107). Levamisol hemmt die nicht- intestinale Form der alkalischen Phosphatase, zeigt aber keinen inhibierenden Effekt auf die intestinale Form (108).

In der vorliegenden Arbeit wird nur Gewebematerial aus dem Dickdarm untersucht, in dem keine Aktivität der intestinalen Form des Enzyms zu erwarten ist. Darüber hinaus ist die Aktivität dieser Enzyme durch die Fixierung und Einbettung in Paraffin, wenn überhaupt, nur in geringem Ausmaß erhalten (105). Die Gewebeschnitte werden hier zur Blockierung der gewebeunspezifischen endogenen alkalischen Phosphatase mit Levamisol inkubiert. Die vollständige Hemmung aller Isoformen des endogenen Enzyms wird zudem durch negative Kontrollen überprüft.

### **3.6. Kontrollen**

Grundsätzlich muß bei jeder Anwendung der Immunhistochemie die Spezifität der verwandten Antikörper überprüft werden. Polyklonale Antikörper enthalten Antikörper gegen verschiedene antigene Determinanten auf dem Antigen. Da viele verwandte Moleküle gleiche Bausteine beinhalten, kann es zu einer falsch- positiven Färbung kommen. Obwohl bei Verwendung von monoklonalen Antikörpern dieses Problem reduziert ist, existieren Ähnlichkeiten zwischen den Epitopen verschiedener Moleküle, die zu einer unerwünschten Kreuzreaktivität führen können. Zur

Überprüfung der Spezifität des verwendeten Antiserums ist nachzuweisen, daß die Färbung nicht von einem nicht- spezifischen Antikörper im Antiserum erzeugt wird. Dabei wird der Primärantikörper durch ein unspezifisches Antiserum des gleichen Tieres ersetzt.

Zum Ausschluß einer unspezifischen Färbung durch Sekundär- oder Tertiärantikörper wird der Primärantikörper mittels Pufferlösung substituiert. Sollte es dabei zu einer Anfärbung kommen, ist diese entweder durch die verwendeten Sekundär- oder Tertiär- Antiseren oder durch die Aktivität der endogene alkalischen Phosphatase bedingt (109). Neben dieser Überprüfung einer falsch- positiven Lokalisation des Antigens muß in einem weiteren Schritt eine falsch- negative Färbung ausgeschlossen werden. Um auszuschließen, daß ein vorhandenes Antigen durch die angewandte Methode nicht erkannt wird, muß eine positive Kontrolle durchgeführt werden. Dabei wird der Gewebeschnitt mit bekannter Expressierung des Antigens angefärbt. Als positive Kontrolle können auch Strukturen auf dem zu untersuchenden Schnitt dienen, falls bereits bekannt ist, daß diese das entsprechende Antigen aufweisen.

Bei der vorliegenden Arbeit werden z.B. als positive Kontrolle für die Anfärbung die eindeutig zu identifizierenden Endothelien größerer Gefäße des Normalgewebes herangezogen, die sich auf dem selben Schnitt befinden. Auch werden nur bereits hinreichend charakterisierte Antikörper verwendet, bei denen weitere negative Kontrollen wie die der Adsorption bereits durch den Hersteller erfolgt ist.

### **3.7. Fixierung der Präparate**

Ziel der Fixierung des Gewebes ist es, die Autolyse sowie die bakterielle Zersetzung des Gewebes zu verhindern, welche nach der Entnahme aus dem lebenden Organismus einsetzt. Sie beeinflusst entscheidend alle nachfolgenden Schritte der immunhistochemischen Analyse und damit die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Auswertung. Das Gewebe soll durch die Fixierung in einem Zustand erhalten werden, der so gut wie möglich dem des lebenden Organismus entspricht. Neben der exakten Erhaltung der Morphologie sollen auch die antigenen

Eigenschaften des Gewebes konserviert werden, was eine Färbung von Strukturen mittels spezifischer Antikörper erlaubt. Eine Methode der Fixierung, die diese Anforderungen gleichermaßen erfüllt, existiert nicht.

Werden archivierte Gewebe - wie in der vorliegenden Arbeit – retrospektiv analysiert, kann der Prozeß der Gewebefixierung nicht mehr beeinflusst werden. In diesem Fall ist es wichtig, die möglichen chemischen und molekularen Veränderungen des Gewebes beim durchgeführten Fixierungsverfahren zu berücksichtigen. Auf diese Weise kann ein geeignetes Verfahren der weiteren Bearbeitung einschließlich des sogenannten *Antigenretrievals* (Kapitel 3.10.) ausgewählt werden. Darüber hinaus muß die Beurteilung der erzielten Ergebnisse immer auch den möglichen Einfluß des Fixierungsverfahren einschließen. Die vorrangige Aufgabe der Fixierung besteht in der Stabilisierung der Gewebeproteine, welche die wichtigsten zellulären Bestandteile für die spätere Analyse darstellen. Fixationsmittel haben die Eigenschaft, Brücken zwischen den Proteinen zu bilden. Auf diese Weise bildet sich ein Gel, welches idealerweise alle Strukturen und deren Relationen zueinander in einem solchen Zustand erhält, der auch im lebenden Gewebe vorhanden ist. Lösliche Proteine werden an Strukturproteinen auf diese Art gebunden und dadurch unlöslich. Die Fixierung führt dabei zu einer Denaturierung der Proteine. Für die pathologische Routinediagnostik ist dies zwar von untergeordneter Bedeutung, hingegen für die Immunhistochemie essentiell, daß die antigenen Epitope durch die Vorbehandlung unverändert bleiben. Im Anhang (8.6.) ist die vom pathologischen Institut der UKBF gewählte Fixierung der Tumoren beschrieben. Im Folgenden soll näher auf die Mechanismen der Fixierung von Geweben mittels Formaldehyd eingegangen werden, das in der vorliegenden Arbeit angewendet wird.

Formaldehyd zeigt eine relativ konstante Penetrationsrate über einen Konzentrationsbereich von 8% bis 40% und gehört zu den langsamen Fixierungsmitteln (110). Das Fixierungsmittel penetriert in Form von Methylenglykol schnell das Gewebe, fixiert es jedoch nur langsam und zwar durch den infolge Dissoziation aus Methylenglykol gebildeten Formaldehyd. Formaldehyd ist eine reaktive, elektrophile Substanz, welche zu Bindungen zwischen verschiedenen

funktionellen Gruppen biologischer Makromoleküle führt. Die Fixierung mit Formaldehyd beeinträchtigt nur in geringem Maße die Antigenität.

Folgende Erkenntnisse lassen sich für die Interpretation von immunhistochemischen Färbungen derart fixierter Präparate ableiten:

- Das Durchdringen des Gewebes mit Fixierungsmittel ist ein langsamer Prozeß. Um eine gleichmäßige Fixierung zu erhalten, sollten die Gewebeblöcke vergleichbar klein oder dünn sein. Eine unterschiedliche Fixierung kann dazu führen, daß das Antigen entweder nicht nachgewiesen werden kann oder daß die Färbeargebnisse unterschiedlich fixierter Präparate miteinander nicht vergleichbar sind.
- Gewebe, die in Formaldehyd fixiert sind, verkleinern sich um ca. 33%. Die Fixierungszeit beeinflußt auch den Grad der Verkleinerung des Gewebevolument (110). Die quantitative Auswertung bezüglich einer definierten Fläche ist nur dann vergleichbar, wenn für die Präparate ähnliche Fixierungszeiten angenommen werden können.
- Die Osmolalität der Fixierungslösung beeinflußt die Diffusionsvorgänge über die Zellmembran während der Fixierung. Daraus ergibt sich, daß Zellen, deren Zellmembran nicht intakt ist, sich in anderen Maßen als intakte vergrößern oder verkleinern. Die mögliche Diffusion nicht fixierter Gewebeteile, führt zu einer fehlerhaften Lokalisation der entsprechenden Materialien. Wird dieses ungebundene Material ganz aus dem Präparat geschwemmt, kann dies zu einem falsch- negativem Ergebnis der histologischen Analyse führen.
- Die Umgebungstemperatur der Fixierung beeinflußt den Erhaltungsgrad der ursprünglichen Morphologie. Bei niedriger Umgebungstemperatur läuft die Autolyse des Gewebes langsamer ab, so daß für einen längeren Zeitraum der ursprüngliche Zustand des Gewebes erhalten bleibt als bei höherer Temperatur.
- Innerhalb der Zelle kommt es zu unterschiedlichen Zeitpunkten zur Fixierung der Zellorganellen, was wiederum den Erhaltungsgrad der Morphologie der Organellen beeinflußt, abhängig von der Sequenz der einzelnen Stoffwechselwege (110).

Die praktische Durchführung der Fixierung erfolgte durch die Abteilung für Pathologie des UKBF. Angaben zu den Fixierungszeiten sind dem Anhang (Kapitel 8.6.) zu entnehmen.

### **3.8. Para- und Deparaffinierung**

#### **Paraffinierung**

Ziel der Gewebeerarbeitung ist es, das fixierte Gewebe in einem festen Medium einzulassen. Dabei muß das Medium hinreichend fest sein, um einerseits das Schneiden von dünnen Gewebeschnitten zu ermöglichen, darf aber andererseits nicht zu steif sein, um eine Schädigung des Gewebes zu vermeiden. Wie auch in dieser Arbeit geschehen, wird zur Einbettung der Gewebe vorwiegend Paraffinwachs verwendet. Paraffinwachs kann im flüssigen Zustand das Gewebe durchdringen und härtet bei Abkühlung ohne größere Schädigung des Gewebes aus. Nach der Fixierung muß das Gewebe im ersten Schritt mit Hilfe des Fixierungsmittels dehydriert werden. Die Dehydrierung sorgt dafür, daß das Paraffinwachs ungehindert das Gewebe penetrieren kann. In der vorliegenden Arbeit wird Alkohol als Dehydrierungsmittel verwendet, wobei die Präparate eine Alkoholreihe aus 70-, 80-, 96- und 100-prozentigen Alkohollösungen durchlaufen. Der Alkohol wird anschließend mittels Aceton wieder entfernt. Detaillierte Angaben zur Paraffinierung, die durch die Abteilung für Pathologie des UKBF durchgeführt wurde, sind im Anhang (Kapitel 8.6.) aufgeführt.

#### **Deparaffinierung**

Um das geschnittene, fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe immunhistochemisch untersuchen zu können, muß der wasserlösliche Antikörper das Gewebe durchdringen und die antigenen Determinanten im ursprünglichen Zustand wieder vorfinden. Hierfür wird das Paraffin in umgekehrter Reihenfolge wie bei der Imprägnierung zunächst mittels Xylol gelöst. Die Präparate durchlaufen eine absteigende Alkoholreihe von 90-, 80- und 70-prozentigem Alkohol und werden dann in einer Pufferlösung gewässert.

## **Praktische Durchführung**

Die Objektträger mit den getrockneten Gewebeschnitten werden beschriftet und dann horizontal in ein Färbekörbchen gestellt, das zunächst für 1-2 min in einen mit Xylol gefüllten Glaskasten eingebracht und dabei kontinuierlich bewegt wird. Anschließend werden die Schnitte in einen Glaskasten mit 90-prozentigen Alkohol gegeben und der Vorgang mit 80- und 70-prozentigen Alkohol wiederholt. Die Schnitte verbleiben jeweils für 5 min in den Alkohollösungen. Danach wird das Färbekörbchen in einem mit Spülpuffer gefüllten Glaskasten für 10 min. gewässert.

### **3.9. Anfertigung der Tumorschnitte**

Die Qualität der Tumorschnitte ist entscheidend für die weitere immunhistochemische Analyse. Gefordert werden faltenfreie 1-2  $\mu\text{m}$  dünne Schnitte, die die ursprüngliche Morphologie des Tumors erhalten und eine Zuordnung der Antigenmarkierungen zu einzelnen Zellen oder intra- und extrazellulären Strukturen ermöglicht. Alle Schnitte werden mit einem Microtom (Anhang 8.3.8.) angefertigt. Für die Realisierung einer Untersuchung mit unterschiedlicher Antikörpern in Form von Einzelmarkierungen am identischen Tumor ist es notwendig, Serienschnitte von allen Paraffinpräparaten anzufertigen. Serienschnitte sind Schnitte eines Präparates, die in direkter Folge angefertigt werden, also den identischen Ausschnitt des Gewebes, um jeweils 1-2  $\mu\text{m}$  in der Tiefe versetzt, zeigen. Die ausgewählten Paraffinblöcke werden auf einer Kühlplatte für mindestens 20 Minuten bis auf  $-20^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, und ein Wärmebad auf  $40-50^{\circ}\text{C}$  vorgeheizt. Die Schnitte werden bei einer Einstellung des mechanischen Vortriebs des Microtoms von  $1\mu\text{m}$  aus den gekühlten Paraffinpräparaten angefertigt. Der Tumorschnitt wird anschließend mit einem Pinsel faltenfrei auf der Wasseroberfläche des Wärmebades ausgebreitet und durch die Einwirkung der Wärme geglättet, danach auf den Objektträger aufgetragen und für 1-2 Stunden bei Zimmertemperatur und anschließend für 12 Stunden im Wärmeschrank getrocknet.

### 3.10. Antigen- Rückgewinnung (*antigen retrieval*)

Durch die Fixierung kann es zu Veränderungen der antigenen Epitope kommen, die die Ausbildung der spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung behindern. Da bisher kein Fixationsmittel gefunden werden konnte, welches die Immunreaktivität unbeeinträchtigt läßt (111), wurden Verfahren entwickelt, um die antigenen Determinanten in ihrer ursprünglichen Form wiederherzustellen. Man bezeichnet diese Verfahren als Antigen-Rückgewinnung bzw. in der englischsprachigen Fachliteratur als „*antigen retrieval*“.

Die Sekundär-, Tertiär- und Quartär- Struktur der Proteine ist abhängig von der Primärstruktur und wird durch die Sequenz der Aminosäuren definiert . Bleibt die Primärstruktur bei den Fixationvorgängen unverändert, so sollte es theoretisch möglich sein, durch eine entsprechende Vorbehandlung die ursprüngliche dreidimensionale Struktur wiederherzustellen (111).

Diskontinuierliche Epitope, die erst durch die tertiäre und quartäre Faltung des Proteins und der daraus resultierenden Annäherung voneinander in der Aminosäurenkette entfernter liegenden Peptidsequenzen entstehen, sind empfindlicher für einen Verlust der ursprünglichen Antigenität als Sequenzen in der Primärstruktur. Das Problem ist bei Verwendung monoklonaler Antikörper größer als bei polyklonalen, da die Wahrscheinlichkeit gering ist, daß alle Epitope, die von den polyklonalen Antikörpern erkannt werden, zuvor durch die Fixierung maskiert worden sind (112).

Infolge der durch die Fixierung ausgelösten intra- und intermolekularen Bindungen werden Veränderungen der Molekülstrukturen hervorgerufen, die von verschiedenen Faktoren wie pH- Wert, Temperatur, Gewebezustand, Fixierungsmittel und Fixierungsdauer abhängen. Aus diesem Grund kann es keine generelle Empfehlung für die geeignete Vorbehandlung von Gewebeschnitten zwecks Antigenfreilegung geben. Es existieren unterschiedliche Verfahren, denen ein Ziel gemeinsam ist: die Wiederherstellung der ursprüngliche Struktur des Epitops.

## **Enzymatische Vorbehandlung**

Die Immunreaktivität von maskierten Antigenen kann durch Behandlung der Schnitte mit proteolytischen Enzymen wiederhergestellt werden. Die enzymatische Vorbehandlung führt nicht nur zu einer Verstärkung der immunhistochemischen Färbung, sondern auch zu einer Verbesserung der Verlässlichkeit und Sensitivität der immunhistochemischen Methode (113). Das geeignetste Enzym und die optimale Dauer der proteolytischen Vorbehandlung muß aufgrund der nicht vorhersagbaren Veränderungen während der Fixierung für jede Kombination von Gewebe, Fixierung und Antikörper individuell bestimmt werden. Darüber hinaus muß der Vorgang bezüglich Temperatur und Enzymkonzentration kontrolliert werden. Um die durch die Fixierung verursachten Bindungen zu lösen, können die Schnitte mit proteolytischen Enzymen wie Trypsin, Proteinase K, Pronase und Pepsin vorbehandelt werden.

Durch die Verwendung von Puffern unterschiedlicher pH-Werte und mittels Zusätzen kann der Grad der Wiederherstellung der ursprünglichen Antigenität optimiert werden. Für die Mehrzahl der Antikörper kann Zitratpuffer, Tris-HCl, Phosphor- oder Natriumacetat eingesetzt werden (112). Die Färbeintensität ändert sich über einen Bereich von pH- Werten zwischen 1 und 10 wenig (114). Im allgemeinen können daher Zitratpuffer mit einem pH -Wert von 6.0 oder Tris-HCL mit einem pH -Wert von 7-8 verwendet werden (112). Bei neu eingesetzten Antikörpern sollte der Versuch unternommen werden, das Färbeergebnis durch Variation des pH- Wertes der Vorbehandlungslösung zu verbessern, da in einzelnen Fällen wie z.B. bei MIB1 und bei Östrogenrezeptoren (114) oder bei der Markierung extrazellulären Thrombospondins (115) die besten Ergebnisse bei extremen pH- Werten erzielt wurden.

## **Vorbehandlung mittels Wärme**

Der wichtigste Effekt der Antigen-Rückgewinnung mittels Wärme ist die damit verbundene Energiezufuhr. Dies führt nicht nur zu einer Aufbrechung der Bindungen zwischen den Proteinen, sondern kann auch die Bindungen zwischen Kalziumionen und Aminosäuren lösen. Die Art der Wärmezufuhr ist dabei von untergeordneter Bedeutung (112). Vergleichbare Ergebnisse wurden bei Verwendung von

Mikrowellenofen, Wasserbad, direkter Hitze, Autoklav und Dampfdrucktopf erzielt. Der kritische Faktor bei dieser Methode des "*antigen retrievals*" ist das Verhältnis von aufgebrauchter maximaler Temperatur und einer ausreichend langen Zeitdauer, ohne daß das Gewebes infolge der Wärmeeinwirkung beeinträchtigt wird (112). Je höher die Temperatur, desto besser ist die Antigen-Wiedergewinnung bei der kurzzeitigen Wärmebehandlung (116). Bei niedrigen Temperaturen hingegen muß die Dauer der Wärmebehandlung verlängert werden, um das gleiche Ergebnis zu erzielen (117). Für die Beurteilung neuer Antikörper ist ein Vergleichstest der verschiedenen Antigen-Retrieval-Methoden zweckmäßig (111). Ein großer Anteil der in der vorliegenden Arbeit enthaltenen experimentellen Untersuchungen besteht deshalb darin, eine optimale Kombination der Einflußgrößen für die Detektion des gewünschten Antigens zu finden. Hierbei wird der Einfluß unterschiedlicher Enzyme bzw. alternativ derjenige der Wärmebehandlung mittels Drucktopf und deren Einwirkungszeit sowie die Wirksamkeit von Art des Puffers und dessen pH- Wert untersucht. Bei jeder Änderung der eingesetzten Behandlungsmethode müssen die Ergebnisse reproduziert werden, um verlässliche prognostische Korrelationen zwischen Färbeergebnissen und klinischen Daten erhalten zu können (112). Nur durch eine standardisierte Vorgehensweise lassen sich die Ergebnisse unterschiedlicher Autoren vergleichen.

### **Praktische Durchführung**

Die Vorbehandlung für die Arbeit mit dem Antikörper JC/70 erfolgt enzymatisch und für den bFGF-Nachweis mittels heißem Wasserdampf.

### **Vorbehandlung mit heißem Wasserdampf**

Ein handelsüblicher Schnellkochtopf wird bis zu einer Höhe von ca. 5 cm mit Zitratpuffer (Anhang 8.3.7.) gefüllt und dieser dann bis zum Siedepunkt auf einer Herdplatte erhitzt. Die Schnitte werden aus dem Färbekorbchen genommen, in einen Kochständer einsortiert, dieser senkrecht in den siedenden Zitratpuffer gestellt und der Schnellkochtopf verschlossen. Sobald der maximale Dampfdruck im Topf erreicht ist, wird die Zeit gemessen und nach 2 Minuten der Topf von der Herdplatte

genommen. Durch geringfügiges Öffnen des Topfventils wird innerhalb von etwa 5 Minuten ein Druckausgleich mit der Umgebung erreicht. Anschließend werden für 10 min. die Schnitte im Topf mit fließendem Aqua dest. gespült und in eine mit Spülpuffer (Anhang 8.3.7.) gefüllte Färbeküvette übergeführt. Um ein Austrocknen zu verhindern, muß bei allen Umlagerungen der Schnitt immer von einer Flüssigkeitsschicht bedeckt bleiben.

### **Enzymatische Vorbehandlung**

Eine Färbeküvette mit 100 ml Spülpuffer wird in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt, darin 50 mg Protease (Anhang 8.3.3.) gelöst und die Objektträger mit den Tumorschnitten in die Küvette gestellt. Die Küvette verbleibt dabei für die gesamte Lösungszeit im Wasserbad. Die Objektträger werden 5 Mal mit Spülpuffer gespült und verbleiben danach in der nun mit reinem Spülpuffer gefüllten Küvette.

### **3.11. Antigenfärbung**

#### **Praktische Durchführung**

Während der **Inkubation** werden die eingesetzten Antikörper auf das Präparat gegeben. In dieser Phase findet die eigentliche Immunreaktion zwischen Primärantikörper und dem Antigen statt. Entscheidend für eine qualitativ hochwertige Immunfärbung ist ein stets vollständig mit Flüssigkeit bedeckter Schnitt, damit ein Austrocknen verhindert wird. Dadurch werden alle Epitope vom Antikörper erreicht und es kommt nicht zu einem unspezifischen Antrocknen der Antikörper an das Gewebe. Die Inkubation findet daher in feuchten, geschlossenen Kammern, den Inkubationskästen, statt. Zwischen Auftragen der Antikörper sowie vor Beginn der Entwicklungsreaktion ist es notwendig, restliche ungebundene Antikörper zu entfernen, um eine falsche positive Färbung des Hintergrundes zu verhindern.

Die Schnitte werden nacheinander aus der Küvette genommen und abgetupft, ohne daß dabei der Flüssigkeitsfilm, der den Schnitt bedeckt, zerstört wird. Mit einem Fettstift wird der Schnitt auf dem Objektträger umfahren. Die Objektträger werden horizontal auf die Halterungen des Inkubationskastens gelegt, die Lösung mit dem Primärantikörper auf den Schnitt pipetiert und der Inkubationskasten mit einem

Deckel verschlossen. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Objektträgerhalterungen gekippt und die Schnitte für 2 min. mit Spülpuffer gespült. Der Sekundärantikörper wird in gleicher Weise aufgebracht wie der Primärantikörper. Nach Ende seiner Inkubationszeit wiederholt sich der beschriebene Spülvorgang. In gleicher Weise folgt dann der tertiäre Antikörper (APAAP) und die Wiederholung der Auftragung des Sekundär- und des Tertiärantikörpers. Nach Ablauf der zweiten Inkubationszeit des tertiären Antikörpers erfolgt eine abschließende Spülung. Dann werden die Objektträger in eine Färbeküvette mit Spülpuffer gestellt.

### **Entwicklung**

Um die gebundenen Antikörper und damit die Lokalisation des Antigens unter dem Lichtmikroskop sichtbar machen zu können, wird durch das an die Antikörper gebundene Enzym eine Farbreaktion katalysiert. Im Schritt der Entwicklung der Farbreaktion wird die den Farbstoff enthaltende Entwicklungslösung auf das Präparat gegeben und damit die enzymatische Farbreaktion gestartet. Die Zusammensetzung der Entwicklungslösung und die entsprechenden Entwicklungszeiten sind dem Anhang (Kapitel 8.4.1.) zu entnehmen.

Der Spülpuffer wird aus der Küvette abgekippt und diese dann mit Entwicklungslösung gefüllt. Die Küvette mit den Tumorschnitten wird für 30 min auf ein elektrisches Schüttelbrett gestellt. Anschließend werden die Schnitte in der Färbeküvette unter fließendem Aqua dest. für 2 min. gespült und die Küvette mit der Gegenfärbungslösung gefüllt. Nach 2 min. wird die Gegenfärbungslösung abgekippt und die Schnitte in der Küvette solange mit kaltem Leitungswasser gespült, bis alle Reste der Gegenfärbungslösung entfernt sind. Die Schnitte verbleiben danach in der mit Leitungswasser gefüllten Küvette.

### **Fixierung der spezifischen Färbungen**

Ziel der Fixierung ist es, die Schnitte mit den markierten Antigenfärbungen dauerhaft haltbar für spätere Analysen unter dem Lichtmikroskop zu machen. Die Objektträger werden dazu nacheinander aus der Küvette genommen und ihre Unterseite trockengerieben. Danach wird ein Tropfen Glyceringelatine, die zuvor im

Wärmeschrank bei einer Temperatur von 67°C verflüssigt wurde, auf die Mitte des Schnittes gegeben. Ein Deckgläschen wird an einem Rand des Schnittes auf den Objektträger gesetzt und mit einem spitzen Metallstab auf den Schnitt gedrückt, wobei darauf zu achten ist, daß sich keine Luftblasen unter dem Deckglas bilden.

### **3.12. Quantifizierung der intratumoralen Gefäßdichte**

Die weiter unten im Detail beschriebene Vorgehensweise folgt den Empfehlungen einer internationalen Konsensus-Konferenz zur Quantifizierung der Angiogenese von humanen Tumoren (62). Der immunhistochemisch gefärbte Tumorschnitt wird zunächst bei einer 40fachen Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop durchgesehen. Dabei werden vier Regionen mit für den einzelnen Schnitt überdurchschnittlich hohen Gefäßdichten mit dem Ziel ausgewählt, die Region mit der höchsten Gefäßdichte des Tumorschnittes zu erfassen. In diesen vier Gebieten wird dann jeweils bei einer 200fachen Vergrößerung das 0,781 mm<sup>2</sup> große Feld eines vor das Objektiv geschaltete Netzmikrometer ausgezählt. Jede markierte Endothelzelle und jede Ansammlung von Endothelzellen, die räumlich unabhängig von anderen Mikrogefäßen, Tumorzellen und anderen Elementen des Bindegewebes ist, wird als einzelnes Mikrogefäß gezählt. Dabei ist die Existenz eines sichtbaren Lumens unerheblich. Eine minimale Größe bzw. Länge des Gefäßes wird nicht festgelegt. Gefäßabschnitte, die als Teilstücke eines größeren Gefäßes, durch mehrfachen Anschnitt desselben in der Ebene des Tumorschnittes entstehen, werden als einzelne unabhängige Gefäße gezählt. Als Ergebnis der ausgewerteten Gefäßdichte des Tumors wird dabei das Maximum aus den Gefäßzahlen der vier Gebiete berücksichtigt. Aus den Gefäßdichten der Tumore aller 146 Patienten wird der Mittelwert des Gesamtkollektivs - das sind 75 Gefäße pro Gesichtsfeld - gebildet und das Patientenkollektiv in zwei Gruppen aufgeteilt: eine Gruppe mit "hoher" (> 75) und eine mit "niedriger" (≤ 75) Gefäßdichte.

Mit Hilfe zweier erfahrener Pathologen wurde vor Beginn der Auswertung der Tumorschnitte trainiert, die spezifische Anfärbung der Endothelzelle von der gelegentlich angefärbten Entzündungsinfiltrate unterscheiden zu können. Darüberhinaus wurde an einer großen Anzahl von Schnitten die Bestimmung der

„hotspots“ geübt. Eine reproduzierbare Auszählung von „hotspots“ wird unterstützt durch die genaue Definition eines auszählbaren einzelnen Gefäßes. Alle Schnitte werden von einem einzigen Experimentator ausgewertet. Die Reproduzierbarkeit wird dadurch überprüft, indem zufällig ausgewählte Tumore vom selben Experimentator im Abstand von 4 Wochen erneut ausgewertet und die Ergebnisse verglichen werden (Anhang 8.7.).

### **3.13. Auswertung der bFGF-Färbung**

Die mit dem bFGF monoklonalen Antikörper markierten Tumorschnitte werden bei einer 40fachen Vergrößerung systematisch durchgesehen. Dabei werden die Tumorzellen auf eine Expression des *basic Fibroblast Growth Factors* untersucht. Wird in Tumorzellen der Angiogenesfaktor nachgewiesen, dann wird dieser Tumor als bFGF- positiv bewertet. Die Tumore werden also in solche mit und solche ohne nachgewiesener Expression unterteilt, wobei Anzahl oder Anteil der Tumorzellen mit bFGF-Anfärbung pro Schnitt nicht ermittelt wird.

### **3.14. Statistische Verfahren**

Die erhobenen Daten werden in eine Datenbank des Statistikprogramms SPSS® eingegeben und mit dessen Hilfe numerisch und graphisch ausgewertet. Die dabei ermittelten Kaplan- Meier- Kurven werden in die Microsoft® - Programme Excel® und Word® übertragen.

Bei der Analyse der verschiedenen Ausprägungen eines tumor- oder patientenspezifischen Parametersatzes, bestehend aus Metastase, Lokalrezidiv, Tumorereignis, Gefäßdichte und bFGF- Expression sowie dem Anteil der verstorbenen Patienten werden die statistischen Auswerteverfahren Chi-Quadrat-Test und Fishers exakter Test angewandt. Die Analysen werden jeweils für das Gesamtkollektiv der Patienten und für die betroffenen Unterkollektive durchgeführt. Zur Analyse des tumor- oder patientenspezifischen Parametersatzes bezüglich der Überlebenszeit werden Mann-Whitney-U-Test, Kruskal-Wallis-H-Test und der Log-Rank-Test herangezogen. Für diejenigen Analysen, bei denen zensierte Fälle durch Wahl des Untersuchungskollektivs ausgeschlossen werden, erfolgt eine Überprüfung

auf signifikante Unterschiede mit Hilfe von Mittelwert - Vergleichstests. In den anderen Fällen kommt der Log-Rank-Test zum Einsatz.

Die prognostische Bedeutung der Gefäßdichte für die Gesamtüberlebenszeit des Unterkollektivs jener Patienten mit mindestens einem Tumorereignis wird mittels multivariater Analyse nach dem Cox'schem- Regressions- Verfahren überprüft.

Vor Beginn der Arbeit wird definiert, welche Zusammenhänge statistisch untersucht werden sollen (Kapitel 2.). Da es sich um mehrere Fragestellungen handelt, sind zu deren Beantwortung multiple Tests notwendig. Hierbei ist das Risiko nicht auszuschließen, daß bei einer höheren Zahl von unabhängigen Tests mit ein und derselben Variablen, auch die Wahrscheinlichkeit steigt, zufällig eine falsche Ablehnung der Nullhypothese zu erhalten. Nach Bonferroni läßt sich dieses Problem dadurch lösen, in dem die ermittelten p-Werte mit der Anzahl der durchgeführten unabhängigen Tests multipliziert werden und überprüft wird, ob der auf diese Weise neu ermittelte p-Wert weiterhin kleiner als das vorgegebene Signifikanzniveau  $\alpha$  ist (118). In der vorliegenden Arbeit sind die meisten der Tests nicht unabhängig voneinander. Daher reduziert sich das Problem der multiplen Tests auf wenige Fälle. Selbst bei einer Vorgehensweise nach Bonferroni behält aber die Gefäßdichte ihre statistisch signifikante prognostische Bedeutung (Kapitel 4.) bei.

Für alle durchgeführten Tests gilt, daß eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0.05$  als statistisch signifikant bezeichnet wird. Eine Zusammenstellung aller in dieser Arbeit angewandter statistischer Tests findet sich im Kapitel 8.5.