

Aus dem Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Andreas Erbersdobler

**Molekulargenetische, histologische und immunhistologische Untersuchungen
an alten Feuchtpräparaten der Pathologisch-anatomischen Lehrsammlung
Rostock**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Paula Rocktäschel, geb. am 26. Januar 1990 in Berlin-Lichtenberg
wohnhaft in 5 Court Place Gardens, Oxford OX4 4EW, Großbritannien

Oxford, 01. Februar 2017

Gutachter:

Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler

Institut für Pathologie

Strempelstraße 14

18055 Rostock

Prof. Dr. med. Andreas Büttner

Institut für Rechtsmedizin

St.-Georg-Straße 108

18055 Rostock

Prof. Dr. med. Thomas Schnalke

Berliner Medizinhistorisches Museum der Charité Berlin

Charitéplatz 1

10117 Berlin

Datum der Verteidigung: 20. Dezember 2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Pathologische Sammlungen in Deutschland	9
1.1.1	Besonderheiten von Universitätssammlungen im Allgemeinen . . .	9
1.1.2	Historischer Kontext pathologischer Sammlungen	9
1.1.3	Aktuelle Situation pathologischer Sammlungen	11
1.1.4	Alter Kram, der Arbeit macht – Sind Sammlungen heute nur noch Ballast und kein Gewinn?	12
1.2	Die Pathologisch-anatomische Lehrsammlung der Universitätsmedizin Ro- stock	14
1.2.1	Geschichte der Rostocker Sammlung	14
1.2.2	Aktuelle Ausstattung	14
1.3	Anwendbarkeit moderner pathologischer Labormethoden an alten Präpa- raten	15
1.3.1	Einfluss von Fixier- und Konservierungslösungen auf histologische und molekulare Gewebsstrukturen	15
1.3.2	Bisherige molekulargenetische, histologische und immunhistologi- sche Untersuchungen an alten Präparaten	17
1.3.3	Einschränkungen bei der Arbeit mit pathologischen Sammlungs- objekten	19
1.4	Fragestellung und Ziel der Studie	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Verwendete Materialien	22
2.1.1	Verwendete Präparate.	22
2.1.2	Verwendete Antikörper für die immunhistologischen Färbungen. . .	24
2.1.3	Verwendete Chemikalien und Substanzen	24
2.2	Methoden	26
2.2.1	Aufbereitung von alten Präparaten und Probengewinnung.	28
2.2.2	Histologische Färbungen	29
2.2.3	Immunhistologische Verfahren	30
2.2.4	DNA-Isolierung	32
2.2.5	Mutationsanalysen	35
2.2.6	MGMT-Promotormethylierung im Gliom	38
2.2.7	DNA-basierte Bestimmung von HPV-Typen	41

2.2.8	Nachweis mykobakterieller DNA	45
2.2.9	Statistik	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Verwendete Präparate	48
3.2	Makroskopische Aufarbeitung der Präparate	48
3.3	(Immun-)Histologische Untersuchungen und Validierung der Diagnose . .	50
3.3.1	Histologische Untersuchung der Tumorpräparate.	50
3.3.2	Histologische Untersuchungen der Infektionspräparate	52
3.3.3	Immunhistologische Untersuchungsergebnisse	55
3.3.4	Validierung der Diagnose	57
3.4	Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen	58
3.4.1	DNA-Isolierung	58
3.4.2	Amplifizierbarkeit der gewonnenen DNA	59
3.4.3	Ergebnisse der Mutationsanalysen	61
3.4.4	Nachweis viraler DNA des Humanen Papillomavirus	62
3.4.5	Nachweis mykobakterieller DNA	63
3.5	Übersicht über die Untersuchungsergebnisse	65
4	Diskussion	69
4.1	Ausgewählte Präparate und Krankheitsentitäten	69
4.2	Makroskopische Bearbeitung der Präparate	70
4.2.1	Auswirkungen der Biopsieentnahme auf den Gesamteindruck . . .	70
4.3	(Immun-)histologische Diagnoseverifizierung	71
4.3.1	Notwendigkeit der Diagnoseverifizierung	71
4.3.2	Durchführbarkeit histologischer Färbungen	72
4.3.3	Durchführbarkeit immunhistologischer Färbungen	73
4.4	Erfolg der molekulargenetischen Untersuchungen	75
4.4.1	Isolierbarkeit von amplifizierbarer DNA	75
4.4.2	Ergebnisse der Mutationsanalysen	78
4.4.3	Ergebnisse der Erregernachweise	78
4.5	Schlussfolgerungen	81
5	Anhang	83

Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte.	27
2	Aufbau eines LCD-Chips mit 8 Arrays und vergrößerte Darstellung eines DNA-Arrays zur HPV-Typen-Bestimmung (Exemplarisch Positivität für HPV Typ-16 auf Array 4).	43
3	Häufigkeiten der einzelnen Organ- und Krankheitsentitäten innerhalb der verwendeten Feuchtpräparate.	48
4	Ausgewählte Präparate vor und nach der präparatorischen Aufarbeitung. .	49
5	H&E Schnitte der Präparate (A) Lu176 und (B) Nn28 in jeweils 20- und 40-facher Vergrößerung.	51
6	H&E Schnitte des Präparates Ht32 in 10- und 20-facher Vergrößerung. . .	52
7	H&E Schnitte der Tuberkulosepräparate (A) Mi133, (B) Lu180 und (C) Thy3 in den jeweils angegebenen Vergrößerungen.	53
8	H&E Schnitte der Tuberkulosepräparate (A) Lu30/10 und (B) Kn322 in jeweils 10- und 20-facher Vergrößerung.	54
9	H&E Schnitte des Tuberkulosepräparate Ni250 in 10- und 40-facher Ver- größerung.	55
10	Immunhistologische Färbungen gegen Vimentin in den Präparaten (A) Lu176 und (B) Nn28 in den jeweils angegebenen Vergrößerungen.	56
11	Immunhistologische Färbung gegen GFAP im Präparat ZNS212 in 4- und 20-facher Vergrößerung.	57
12	Boxplots der (A) DNA-Menge und (B) DNA-Reinheit aus den Tumor- bzw. Infektionspräparaten.	58
13	Beziehung zwischen DNA-Menge und -Reinheit der (A) Tumor- und (B) Infektionspräparate.	59
14	DNA-Menge und -Reinheit der (A) Tumor- und (B) Infektionspräparate in Abhängigkeit vom Fixierzeitpunkt.	60
15	Elektropherogramm des (A) KRAS-Gens im Präparat Da236 (G12D) und (B) des BRAF-Gens im Präparat Ht13 (V600E).	62
16	Ergebnisse der HPV LCD-Arrays für die Präparate Mu7, Mu28 und Md40.	63
17	Ergebnisse der MYCO Direct 1.7 LCD-Arrays für die Präparate Lu7.2, Lu124 und Ni250.	64
18	Die fünf häufigsten Todesursachen 1916 (A) und 2014 (B) unter Männern in Deutschland im Vergleich.	69
19	Effekte von Formaldehyd auf DNA.	92

Tabellenverzeichnis

1	Für die Studie verwendete Präparate und sammlungsinterne Angaben. . .	24
2	Angaben zu den für die immunhistologischen Färbungen genutzten Anti- körpern (AK).	24
3	Verwendete Chemikalien.	26
4	Bildung des IRS nach Remmele und Stegner [70].	32
5	Verdaupuffer	33
6	Angaben zu den verwendeten PCR-Primern.	35
7	Referenzsequenzen.	38
8	Sequenz zum Nachweis des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus. . . .	40
9	Zusammenstellung des Hybridisierungs- und Markierungsmixes für 8 Arrays.	45
10	Übersicht über die zur Bestimmung mykobakterieller DNA genutzten Primer- Sets.	45
11	PCR- und Sequenzierungsprimer für die Untersuchung des pcnA-Gens. . .	47
12	Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen im Überblick.	56
13	Erfolgsrate der DNA-Amplifizierung nach Präparateklassen.	60
14	Übersicht über Spezies-Zuordnung der isolierten mykobakteriellen DNA. .	64
15	Ergebnisse der molekulargenetischen, histologischen und immunhistologi- schen Untersuchungen an den Tumorpräparaten.	67
16	Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen an den Infektions- präparaten.	68
17	Übersicht über vorherige molekulargenetische Untersuchungen an alten Sammlungspräparaten.	77

Abkürzungsverzeichnis

GFAP	Glial fibrillary acidic protein (Saures Gliafaserprotein)
H&E-Färbung	Hamatoxylin-Eosin-Färbung
HIER	Heat-induced epitope retrieval (Hitze-induzierte Epitodendemaskierung)
HPV	Humane Papillomviren
IRS	Immunoreactive score
MAC	Mycobacterium-avium-Komplex
MGMT	O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase
MOT	Mycobacterium-other-than-tuberculosis-Komplex
MTUB	Mycobacterium-tuberculosis-Komplex
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PMR	Percentage of methylated reference
TTF-1	Thyroid transcription factor 1

„Diese Sammlungen sind es, die es als Quellen der Forschung neu zu fokussieren gilt. Die in ihnen verborgenen Möglichkeiten sollten dringend für die Lehre, zum Nutzen der Öffentlichkeit und zur Profilbildung der Universitäten wiederentdeckt werden. Vor allem aber, und dies scheint nicht allen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern sofort einzuleuchten: Die Sammlungen bergen immer noch einen ungeheuren Wissensschatz, den es auch heute noch zu heben gilt: sie sind von höchstem Nutzen für die Forschung.“

Ernst Seidl in [81], Seite 27

1 Einleitung

1.1 Pathologische Sammlungen in Deutschland

1.1.1 Besonderheiten von Universitätssammlungen im Allgemeinen

Laut dem zwischen 2004 - 2009 von der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) geförderte Projekt „Universitätsmuseen und -sammlungen in Deutschland“ gelten als *Universitätssammlung*

„[...] alle aktuell oder ehemals zu einer wissenschaftlichen, theologischen und künstlerischen Hochschule gehörenden Sammlungen mit gegenständlichen und audio-visuellen Objekten.“ [3].

Im Unterschied zu klassischen Museen dienen die Objekte in Universitätssammlungen vornehmlich der Lehre und Forschung und weniger der öffentlichen Präsentation [54]. Universitätssammlungen haben in der Entstehung und Profilbildung eines Fachgebietes oft eine ganz entscheidende Rolle gespielt [96], da die zusammengetragenen Objekte z. B. nicht nur der Ausbildung von Nachwuchswissenschaftlern dienen, sondern auch bei der Systematisierung und Klassifizierung des entsprechenden Fachgebietes einen maßgeblichen Anteil hatten [52,54]. Die folgende Arbeit entstand in der pathologisch-anatomischen Lehrsammlung der Universitätsmedizin Rostock: Eine zu Lehr- und Forschungszwecken gegründete Sammlung von pathologischen Feucht- und Trockenpräparaten menschlicher Herkunft.

1.1.2 Historischer Kontext pathologischer Sammlungen

Symptome eines Patienten auf innere organische Veränderungen zurückzuführen, ist ein relativ junger Ansatz in der Medizin. Seit Hippokrates (ca. 400 v. Chr.) wurden Krankheit und Gesundheit durch die Vier-Säfte-Lehre erklärt (Humoralpathologie)¹. Die organbasierte Pathologie ist im Vergleich dazu eine junge medizinische Fachrichtung. Erst Anfang des 18. Jahrhunderts wurden in Europa Lehrstühle für Pathologie und pathologische Anatomie gegründet². Im Griechenland zu Zeiten Hippokrates' und Galens war das Sezieren von menschlichen Körpern verboten. Anatomische Kenntnisse gewann

¹Nach dieser führt ein Ungleichgewicht der im Körper verteilten Säfte Blut, schwarze Galle, gelbe Galle und Schleim zu Krankheit [91].

²U. a.: 1828 Gründung des ersten britischen Lehrstuhls für pathologische Anatomie in London unter Robert Carswell, 1835 Gründung des ersten französischen Lehrstuhls für pathologische Anatomie unter Jean Cruveilhier und 1849 Gründung des ersten deutschen Lehrstuhls für Pathologie in Würzburg unter Rudolph Virchow [32,58].

man aus der Behandlung von offenen Frakturen und durch Tiersektionen [32]. Erst im 13. / 14. Jahrhundert wurden, zuerst in Italien, Sektionen an öffentlichen Universitäten zur Ausbildung von Ärzten und zur Verbrechensaufklärung erlaubt und die Praxis des Sezierens breitete sich langsam über ganz Europa aus [32]. In Deutschland fanden wahrscheinlich um 1500 die ersten Sektionen statt [37]. Obwohl das 16. Jahrhundert oft als Zeitalter der Anatomie bezeichnet wird, war es nicht weniger auch ein Zeitalter der aufkommenden Organpathologie, da bei anatomischen Sektionen auch organische Veränderungen gefunden wurden [53].

Zum Ende des 16. Jahrhunderts entstand der Wunsch nach einer Aufbewahrung besonders eindrucksvoller Sektionsfunde, woraufhin sogenannte *Wunderkammern* und *Kuriositäten-Kabinette* sowie auch die ersten anatomisch-pathologischen Sammlungen zu Studienzwecken gegründet wurden [41, 95]. Die Sammler konzentrierten sich dabei mehr auf das Absonderliche und Eigentümliche als auf eine umfassende Darstellung verschiedener Krankheiten [41, 53], da in den Besuchern dieser öffentlichen Kabinette vor allem die Bewunderung über die Bandbreite von Gottes Schöpfung hervorgerufen werden sollte [41]. Am Ende des 16. Jahrhunderts waren die meisten anatomischen Präparate in diesen Sammlungen und Kabinetten Trockenpräparate. Dies änderte sich mit der im 17. Jahrhundert aufkommenden Praxis, menschliche Organe durch Verwendung von Alkohol haltbar zu machen [37, 41]. Begründet in der mit pathologisch-anatomischen Präparaten verbundenen Gotteshuldigung und basierend auf dem Gedanken, dass Schönheit und Ästhetik der Lehre förderlich seien, wurden an menschliche Präparate nicht nur wissenschaftlich beschreibende, sondern auch künstlerische Ansprüche gestellt. Viele Schaupräparate waren daher allegorisierend und ästhetisch arrangiert [41, 58].

Trotz der verbreiteten Sektionspraxis war die Relevanz der Anatomie und Organpathologie im Gegensatz zur Humoralpathologie weiterhin gering. Dies lag vor allem an der Unfähigkeit, Erkrankungen der inneren Organe zu Lebzeiten zu diagnostizieren und zu therapieren [32]. Jedoch begann man im frühen 18. Jahrhundert verstärkt, ante mortem gestellte Diagnosen mit post mortem gefundenen Organveränderungen zu korrelieren [59]. Schließlich konnten im frühen 19. Jahrhundert durch die Erfindung der Auskultation und Perkussion auch Veränderungen der inneren Organe zu Lebzeiten diagnostiziert werden [84]. Anatomisch-pathologische Präparate wurden zu Studienzwecken unerlässlich. So entstanden europaweit große medizinische Sammlungen sowie anatomische Theater zu Ausbildungszwecken³. Diese Entwicklungen führten zu einem wahren Boom an pathologischen Präparaten [41], welche ihre künstlerischen Aspekte zu Gunsten einer mehr

³U.a.: 1713 Bau des anatomischen Theaters in Berlin [58], 1766 Le Musée Fragonard in Maisons-Alfort (bei Paris) [6], 1799 Collection of John Hunter in London [7].

nüchtern-funktionalen Betrachtung mit dem Ziel der unverzerrten Lehre zunehmend verloren [58]. In der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts beherbergten pathologische Universitätssammlungen in Deutschland durchschnittlich ca. 5000 - 6000 Präparate⁴.

Eine Ausnahme davon war die von Rudolph Virchow geschaffene Sammlung des pathologischen Institutes in Berlin, welche 1890 etwa 19 000 Präparate umfasste [58]. 1893 erkannte Ferdinand Blum die fixierende Wirkung von Formaldehyd [13, 36] und wenig später entwickelte Johann Carl Kaiserling (ein Assistent von R. Virchow in Berlin) seine farberhaltende Präparationsmethode mit einem Mix aus Formalin-basierter Fixierlösung und anschließender Verbringung des Präparates in eine Ethanol-haltige Konservierungslösung [13, 58]. Bis in die 1930er Jahre hinein erlebten pathologische Sammlungen eine Blütezeit, da nun auch vermehrt histologische Schnitte und Gefrierpräparate in die Sammlungen aufgenommen wurden [13]. Der zweite Weltkrieg bildete mit den europaweit großen Verlusten an pathologischen Sammlungsbeständen einen tiefen Einschnitt⁵. Zusätzlich dazu nahm das Interesse der Universitäten an pathologischen Sammlungen seit den 1950er Jahren mit dem Aufkommen neuer Bildgebungs- und Lehrmethoden immer mehr ab. Daher beschränkt sich die aktuelle Sammlungsarbeit an Instituten, die noch Sammlungen beherbergen, meist auf ein Erhalten der vorhandenen Bestände ohne nennenswerte Neuanschaffungen [13].

1.1.3 Aktuelle Situation pathologischer Sammlungen

Heute beherbergen laut einer bundesweiten Umfrage der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP) im Jahr 2014 von den insgesamt 35 universitären pathologischen Instituten in Deutschland noch 16 eine Sammlung. Unter diesen stellt die pathologisch-anatomische Lehrsammlung der Universitätsmedizin Rostock mit ihren über 1000 Feucht- und Trockenpräparaten eine der umfangreicheren Kollektionen dar [52]. Ähnlich wie die meisten Universitätsammlungen führen auch pathologische Sammlungen häufig ein Schattendasein⁶. An vielen medizinischen Fakultäten fehlt es an finanziellen und personellen Kapazitäten, um die Sammlungen aus den Kellern und von den Dachböden in konservatorisch angemessene Räumlichkeiten zu überführen. Weiterhin fehlen Inventarisierungsstrukturen, so dass oft kein Überblick über eventuell vorhandene Bestände herrscht. Von den oben erwähnten 16 pathologischen Sammlungen hatten im Jahr 2014 nur 40 % eine digitale Erfassung ihrer Objekte begonnen [52]. Zudem existiert meist

⁴U.a.: in Breslau um 1840: 6160, in Würzburg um 1840: 3000, in Leipzig 1871: 8000 [58].

⁵So wurden z.B. große Teile der Hunterian Collection in London im Mai 1941 während des deutschen Bomberangriffes („The Blitz“) zerstört [7].

⁶In musealen Fachkreisen tragen universitäre Sammlungen daher auch den Namen *Cinderella Collections* [97].

keine universitätsweite Sammlungsordnung [81], auf die sich interessierte Mitarbeiter berufen können⁷. Wie die meisten universitären Sammlungen werden auch pathologische Sammlungen oft nur aufgrund des speziellen Interesses einzelner Wissenschaftler erhalten [4]. Auch sind Sammlungen finanziell vom universitären Tagesgeschäft abhängig, so dass eine kontinuierliche Sammlungsarbeit in vielen Fällen erschwert ist [95]. Ursache für diese stiefmütterliche Behandlung pathologischer Sammlungen ist vielfach ein fehlendes Bewusstsein für ihr Potential hinsichtlich eines modernen Einsatzes in Lehr- und Forschungsprojekten. Glücklicherweise wird dieses Potential in den letzten Jahren stärker erkannt. Diese Entwicklung führte unter anderem zur Bildung der AG „Sammlungsbezogene wissenschaftliche Forschung in Deutschland“ des Wissenschaftsrates⁸ sowie zur Etablierung der „Koordinierungsstelle für wissenschaftliche Universitätssammlungen in Deutschland“⁹. Unter Pathologen und anderen Medizinern reift das Interesse an den facheigenen Sammlungen. So setzt sich z. B. speziell die Deutsche Gesellschaft für Pathologie (DGP) für eine stärkere Vernetzung und Förderung von pathologischen Sammlungen ein, um deren „Sichtbarkeit und Wertschätzung“ zu verbessern und das „brachliegende Potential zu evaluieren und dies eventuell sogar im Rahmen koordinierter Drittmittelanträge zu nutzen.“ [52]

1.1.4 Alter Kram, der Arbeit macht – Sind Sammlungen heute nur noch Ballast und kein Gewinn?

Ständige Veränderung ist nötig zur Erhaltung des Alten. Die in pathologischen Sammlungen enthaltenen Objekte sind ebenso handwerklich und wissenschaftlich wertvoll wie konservatorisch widerspenstig. Der Erhalt einer pathologischen Sammlung ist daher mit viel Arbeit verbunden [13]. Eine Sammlung zu erhalten bedeutet dabei nicht, sie lediglich zu konservieren [92]. Ganz im Gegenteil muss gerade eine alte Sammlung mit der Zeit gehen, um bestehen zu können. Ohne eine ständige Anpassung der Sammlung an aktuelle Lehr- und Forschungsmethoden wird sie von Studierenden, Wissenschaftlern und Ärzten nicht angenommen werden. Sie läuft Gefahr, ihre Existenzberechtigung zu

⁷Eine Hilfestellung dabei bieten einige kürzlich publizierte nationale und internationale Empfehlungen wie u. a. (1) „Empfehlungen zu wissenschaftlichen Sammlungen als Forschungsinfrastrukturen“ des Wissenschaftsrates [4], (2) „Minimum Requirements for Preservation and Access of Recent Heritage of Science (RHS)“ [8], (3) „UMAC Resolution on Protection of University Collections“ des UMA (University Museums And Collections Committee) [10], (4) „Empfehlungen zum Umgang mit menschlichen Überresten in Museen und Sammlungen“ des Deutschen Museumsbundes [5] (5) „Empfehlungen zum Umgang mit Präparaten aus menschlichem Gewebe in Sammlungen, Museen und öffentlichen Räumen“ publiziert im Deutschen Ärzteblatt [“2003]

⁸Die Arbeit dieser AG fruchtete 2011 unter anderem in den „Empfehlungen zu wissenschaftlichen Sammlungen als Forschungsinfrastrukturen“ [4].

⁹Internetpräsenz erreichbar unter <http://wissenschaftliche-sammlungen.de/de/> [Stand 15.09.2015]

verlieren und schließlich im dynamischen Universitätsgeschehen vor dem Hintergrund endlicher finanzieller und personeller Ressourcen verloren zu gehen. Eine aktiv geführte pathologische Sammlung muss daher einer ständigen Veränderung unterliegen, indem die Sammlungsverantwortlichen auf wissenschaftliche Entwicklungen, wechselnde Interessengebiete der jeweiligen Nutzer, (eventuell altersgeschwächten) Zustand der Objekte und gesellschaftspolitisch-ethische Bedenken reagieren. Es gilt Wege zu finden, die Existenzberechtigung einer Sammlung immer wieder aufs Neue kritisch zu hinterfragen und vor allem „realistisch zu begründen“ [4].

Potential und Nutzen einer aktiven Arbeit mit der Sammlung. Pathologische Sammlungen sind als Universitätssammlungen Teil unseres wissenschaftlichen Erbes [54]. Eine aktive Pflege ist jedoch nicht nur aus geschichtswissenschaftlichen Gründen erstrebenswert. In pathologisch-anatomischen Sammlungen soll der Tod dem Leben dienen indem die hier verwahrten Präparate in der Ausbildung medizinischer Berufe, in der medizinischen Bildung der Öffentlichkeit sowie als Forschungsobjekte genutzt werden [24]. Die pathologische Lehre ist auf plastische Beispiele vielmehr als auf gedruckte Abbildungen angewiesen, da Pathologie und Anatomie „begreifbare“ Fächer sind, in denen ein Sinn für dreidimensionale Strukturen im menschlichen Körper entwickelt werden muss [16]. Gerade vor dem Hintergrund stetig sinkender Obduktionszahlen¹⁰ können alte Präparate, wie sie in pathologischen Sammlungen in großer Zahl enthalten sind, daher wieder an Relevanz gewinnen. Weiterhin müssen diese unwiederbringlichen Zeugen unserer medizinischen Geschichte als Forschungspool für die aktuelle sowie für spätere Generationen erhalten bleiben [96]. Pathologische Sammlungen haben dabei einen entscheidenden Vorteil: Sie enthalten sowohl Präparate mit Krankheitsausprägungen, die heutzutage selten geworden sind, wie auch Beispiele von heute äußerst relevanten Erkrankungen und können daher sowohl in medizinhistorischen wie auch in aktuellen Fragestellungen Anwendung finden.

Zusätzlich zum fachlichen Nutzen kann sich die aktive Förderung einer Sammlung auch für das entsprechende Institut und die Universität im Allgemeinen lohnen. Sammlungen eignen sich erstaunlich gut für Öffentlichkeitsarbeit und können bei geschicktem Einsatz erheblich die Außenwirkung und Reputation einer Universität stärken [81]. Weiterhin bieten sich Sammlungen hervorragend als Initiations- und Verbindungsglied für interuniversitäre Kooperationen auf nationaler und internationaler Ebene an [81].

¹⁰Siehe z. B. [78] oder [23].

1.2 Die Pathologisch-anatomische Lehrsammlung der Universitätsmedizin Rostock

1.2.1 Geschichte der Rostocker Sammlung

Die Universität Rostock wurde am 12.11.1419 gegründet und ist damit einer der ältesten Universitäten Deutschlands. 1865 wurde Theodor Ackermann der erste Lehrstuhlinhaber am damaligen Institut für pathologische Anatomie und experimentelle Pathologie. Maßgeblich gefördert durch die Professoren A. Thierfelder, E. Schwalbe und W. Fischer entstand in den folgenden Jahrzehnten die pathologische Lehrsammlung des Institutes. Einen besonderen Beitrag leistete dabei Ernst Schwalbe, von 1908 - 1920 Ordinarius am Institut für Pathologie, mit der Zusammenstellung seiner bekannten „Mißbildungssammlung“ für das Studium und Erforschen der Teratologie. Im zweiten Weltkrieg erlebte Rostock 1942 schwere Bombardements durch die Royal Air Force, von denen das Institutsgebäude und die Sammlungsbestände jedoch zum größten Teil verschont blieben [64]. Ab 1960 kümmerten sich die Präparatoren Ute Naumann und Heinz Krüger um die pathologische Sammlung und konnten sie am 1. Oktober 1963 dem damaligen Institutsdirektor Walter Fischer für die Lehre übergeben. Bis ca. 1980 erfuhr die Sammlung eine ständige Erweiterung mit neuen Präparaten. Im Zuge von Umbaumaßnahmen wurde die Ausstellungsfläche 1992 auf die Hälfte reduziert. 1993 übernahm der medizinische Fachpräparator Frank Schreiber zusammen mit den Sektionsassistenten Enrico Sebrantke und Wolf-Dieter Schreiber die Sammlung. Aufgrund der minimierten Fläche erfolgte eine Neu-Konzeption der Sammlungsbestände, so dass die Sammlung seit dem Wintersemester 1993/1994 in einem verkleinerten Ausmaß wieder für die Lehre genutzt werden konnte [77].

1.2.2 Aktuelle Ausstattung

Heute verfügt die pathologisch-anatomische Lehrsammlung der Universität Rostock über ca. 1000 Feucht- und Trockenpräparate. Sie ist dabei eine Sammlung ohne speziellen Schwerpunkt. Etwa 300 Präparate sind aktuell im Ausstellungsraum für Studenten im Rahmen des pathologischen Lehrseminars einsehbar. Die Sammlung dient vornehmlich der Ausbildung von Medizinstudenten und Studenten der medizinischen Biotechnologie und ist nicht für die Öffentlichkeit zugänglich. Die aktuelle Sammlungsarbeit umfasst zwei Ziele: verstärkte Integration in die medizinische Lehre sowie Öffnung der Sammlung für aktuelle Forschungsfragen.

1.3 Anwendbarkeit moderner pathologischer Labormethoden an alten Präparaten

1.3.1 Einfluss von Fixier- und Konservierungslösungen auf histologische und molekulare Gewebsstrukturen

Zur Herstellung eines Organpräparates kamen (und kommen) in pathologischen Sammlungen verschiedene Fixier- und Konservierungsflüssigkeiten zum Einsatz, welche die Anwendbarkeit moderner pathologischer Labormethoden an alten Sammlungspräparaten einschränken können. Die Fixierung dient dem Erhalt der natürlichen Gestalt eines Organs durch Unterbrechung der Autolyse [87]. Die anschließende Konservierung dient dem Schutz gegen mikrobiologischen Befall, Austrocknung und mechanische Zerstörung des Präparates. Früher zielte die Erhaltung rein auf die makroskopische Form eines Organs ab, jedoch müssen heute auch histologische und molekulare Strukturen erhalten bleiben [87]. Fixier- und Konservierungsflüssigkeit können identisch sein, sind es jedoch meistens nicht [87]. Seit der Entdeckung seiner fixierenden Eigenschaften durch Ferdinand Blum 1893 [13] ist Formaldehyd bei Weitem das gängigste Fixierungsmittel [87]. Die meisten Konservierungsflüssigkeiten sind hingegen Glycerol- oder Ethanol-basiert [87].

Formaldehyd (oder Formalin) ist in Wasser gelöstes Formaldehydgas oder Methanal und führt durch eigenen Einbau zur Ausbildung von Quervernetzungen (*cross-links*), vorrangig zwischen Proteinen, aber auch zwischen Nukleinsäuren und Proteinen [38,99]. Durch Addition von Formaldehyd an freie Amino- und Iminoreste werden die Nukleinsäuren zuerst relativ schnell reversibel hydroxymethyliert [21,31,46,85], was zum sukzessiven Auseinanderweichen der komplementären DNA-Stränge führt [21]. In einem zweiten, langsameren Schritt kommt es dann zu einer irreversiblen Quervernetzung, indem über die hydroxymethylierten Bereiche irreversible Methylenbrücken zwischen verschiedenen Molekülen ausgebildet werden [31,46,85]. Außerdem kann Formaldehyd durch Triggerung der Hydrolyse zur Spaltung von Phosphodiester-Bindungen oder zur Abspaltung von DNA-Basen führen. Dadurch wird die DNA fragmentiert und es entstehen apurinische oder apyrimidinische Bereiche [31,85]. Weiterhin führt Formalin zu einer Deaminierung der DNA-Basen, wobei hier besonders Cytosin betroffen ist. Diese Deaminierung transformiert Cytosin zu Uracil, welches anders als die originale Base Cytosin mit Adenin anstatt mit Guanin paart [45]. Die Amplifizierung dieser quervernetzten, apurinischen / apyrimidinischen oder deaminierten Bereiche durch die Taq-Polymerase kann unter PCR-Bedingungen zum Einbau von artifiziellen Mutationen führen, wobei Raten von bis zu einer artifiziellen Mutation auf 500 Basen erreicht werden können [85,102]. Eine

Übersicht über die beschriebenen Effekte zeigt Abb. 19 im Anhang.

Durch Quervernetzung von Proteinen erhält Formaldehyd die mikroskopische Struktur eines Organs in der Regel sehr gut [99], führt im Gegenzug aber zu einer Maskierung und Zerstörung von antigenen Bindungsstellen für die Immunhistologie. Diese können zwar zum Teil durch enzymatische oder thermische Vorbehandlung wieder demaskiert werden, sind allerdings teilweise auch irreversibel beschädigt [57, 61, 99]. Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass eine verlängerte Verweildauer der Gewebe in Formalin zu falsch-negativen immunhistologischen Ergebnissen führen kann [56, 61, 98, 99].

Ethanol führt über Dehydrierung des Gewebes, und damit verbundener Umstrukturierung der Wasserstoffbrückenbindungen, zu einer Protein- und DNA-Ausflockung. Diese ist zum Teil durch rehydrierende Maßnahmen wieder reversibel [85, 87, 99], zum Teil jedoch auch irreversibel. Daher können die besonders in der Immunhistologie benötigten antigenen Bindungsstrukturen in ihrer Tertiärstruktur zerstört und auch durch demaskierende Maßnahmen (enzymatisch oder *heat-induced epitope retrieval*, *HIER*) nicht wiedergewinnbar sein [99]. Die makroskopische Struktur der Organe wird meist – abgesehen von einer stattfindenden Schrumpfung – gut erhalten, wohingegen die mikroskopische Struktur oft zerstört ist [87, 99].

Probleme bei der Fixierung ganzer Organe. Große Organe werden, im Gegensatz zu histologischen Blöcken, meist heterogen fixiert. Dies liegt an der Zeit, die ein Fixiermittel benötigt um das gesamte Organ zu penetrieren. Periphere Bereiche des Organs werden naturgemäß schneller vom Fixiermittel erreicht als zentrale Regionen, welche bis zum Vordringen des Fixiermittels weiter autolytischen Prozessen unterliegen [98]. Außerdem kann es zu einem Mix aus verschiedenen Fixierungsarten innerhalb eines Präparates kommen, wenn das Organ in eine z. B. Ethanol-basierte Konservierungsflüssigkeit überführt wird, obwohl zentrale Bereiche noch nicht ausreichend lange mit Formalin durchtränkt waren [57, 99]. Die Dauer zwischen Todeszeitpunkt (oder Organentnahme bei Operationspräparaten) und Beginn der Fixierung hat entscheidenden Einfluss auf die Qualität der DNA und der mikroskopischen Strukturen. Bereits nach 10 min Anoxie setzt eine enzymatische Degradation von Proteinen und Nukleinsäuren ein [85]. Eine zwei- bis sechsstündige Verzögerung des Fixierungsbeginns kann zu einem 30 - 50 %igen Verlust an mitotischen Strukturen, wie sie in der histologischen Beurteilung von Tumorpräparaten benötigt werden, führen [85]. Auch ziehen autolytische Prozesse einen Verlust von antigenen Bindungsstellen nach sich, so dass ein verzögerter Fixierbeginn in falsch-negativen immunhistologischen Färbeargebnissen münden kann [57, 61, 98].

Die Qualität der DNA aus alten Museumspräparaten hängt neben der Zeit vor der Fi-

xierung und der Größe und Art des Organs noch von weiteren Faktoren, wie dem pH-Wert der Fixierlösung, der Fixierdauer, der Temperatur während der Fixierung und der Dauer der Aufbewahrung, ab [38]. Da sich diese äußeren Umstände zwischen den pathologischen Sammlungen und sogar innerhalb einer Sammlung abhängig vom jeweiligen Entstehungszeitpunkt des Präparates stark unterscheiden können, ist der Vergleich von DNA-Extraktionsmethoden und histologischen Untersuchungen in alten Museumspräparaten oft schwierig [38].

1.3.2 Bisherige molekulargenetische, histologische und immunhistologische Untersuchungen an alten Präparaten

Bereits 1926 verifizierte Herbert Fox die originale Diagnose von alten Sammlungspräparaten mit histologischen Methoden. Er untersuchte die originalen Präparate von 1832, an denen Thomas Hodgkin zum ersten Mal das später nach ihm benannte Hodgkin-Lymphom beschrieb. Zu diesem Zeitpunkt waren diese Präparate bereits rund 80 Jahre in Alkohol und danach nochmal gute 10 Jahre in Formalin gelagert worden [68]. Es zeigte sich, dass lediglich die Präparate von zwei der drei Patienten von Hodgkin tatsächlich in die heutige histologisch definierte Gruppe der Hodgkin-Lymphome gehören (Nachweis von Reed-Sternberg-Zellen). Nach Fox litt der dritte Patient an einem Lymphosarcoma, welches heute in die Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome eingruppiert wird [88]. Diese Ergebnisse wurden rund 70 Jahre später durch erneute histologische sowie auch immunhistologische Untersuchungen an diesen Präparaten durch Poston bestätigt. Dabei fand sich in allen Präparaten eine immunhistologische Positivität für Leu-M1-Antikörper, wohingegen die übrigen verwendeten Antikörper (PD7/27 und CAM5.2) negative Färbungen erzielten [68]. Tsutsumi untersuchte 2003 die selben Präparate und konnte mittels Immunhistologie eine fokale Positivität für CD15 in Reed-Sternberg-Zellen sowie durch in-situ Hybridisierung EBBR-1 (Epstein-Barr virus-related small nuclear RNA) in diesen über 170 Jahre alten Präparaten nachweisen [90].

Verschiedene Gruppen haben sich bisher der Untersuchung von alten Amyloidose-Präparaten gewidmet. Mittels histologischer sowie molekulargenetischer Methoden wurden Gewebeschnitte der ersten, von Alois Alzheimer beschriebenen Patienten (Auguste D. und Johann F.) re-untersucht. Die Qualität der Schnitte ließ eine Verifizierung der Diagnose anhand typischer Amyloid-Plaques und Neurofibrillenbündel zu. Ebenso wurde mittels Proteinase K-Verdau und Phenol-Chloroform-Fällung amplifizierbare DNA gewonnen, anhand derer der Apolipoprotein E-Genotyp sowie Mutationen im *amyloid precursor protein* untersucht werden konnte [40, 63]. Am Berliner Medizinhistorischen Museum

der Charité wurde von 23 kompletten Amyloidose-Präparaten histologisch und immunhistologisch die Diagnose verifiziert. Lediglich im ältesten Präparat von 1866 war eine histologische Bestätigung der Diagnose nicht mehr möglich. Der Zustand der übrigen 22 Präparate, erstellt zwischen 1897 und 1987, lies jedoch sowohl eine histologische Verifizierung mittels Kongorot-Färbung als auch eine immunhistologische Zuordnung zu den Amyloid-Typen AA-Amyloid oder AL-Amyloid zu. Jedoch betonen die Autoren, dass die immunhistologischen Schnitte eine stärkere Hintergrundfärbung als üblich aufwiesen [72]. Auch Westermarck et al. gelangen erfolgreiche Amyloid-Nachweise in drei, zwischen 65 und 83 Jahre alten Museumspräparaten mittels Peroxidase-Antiperoxidase-Methode [100]. Ebenfalls histologisch näherten sich Sedivy und Patzak elf Präparaten mit Pankreas-Pathologien aus der *Collectio Rokitanisky* in Wien. Während ihre immunhistologischen Untersuchungen durchgängig ohne Färbeerfolg blieben, waren sie aufgrund der mikroskopischen Struktur in der Lage, für alle Präparate eine moderne Diagnose zu stellen. Dabei gelang ihnen u. a. der Nachweis, dass neuroendokrine und solid-pseudpapilläre Pankreastumore bereits lange vor ihrer histologischen Entdeckung unter anderen Diagnosen Eingang in pathologische Sammlungen fanden (siehe dazu auch Kapitel 4.3.1 auf S. 71) [80].

Molekulargenetische Untersuchungen an Formalin-fixierten Präparaten sind bisher lediglich in kleiner Zahl durchgeführt worden. Hauptaugenmerk wurde bisher auf die Untersuchung von Formalin-fixierten und anschließend in Paraffin eingebetteten Geweben gelegt und weniger auf komplette, Formalin-fixierte Organe (siehe z. B. [28, 33, 35, 38, 40, 65, 73, 82]). Verschiedene molekulargenetische Bemühungen wurden zudem an paleopathologischen Präparaten (Mumien, Trockenpräparate) getätigt, welche jedoch nicht Formalin-fixiert waren (siehe z. B. [18, 25]). Weiterhin beschäftigen sich die meisten Studien vor allem mit der Extraktion von DNA, jedoch nicht mit weiterführenden molekulargenetischen Analysen. Diese Analysen erfordern

- die Isolation von ausreichend großen Mengen an DNA,
- eine entsprechende Mindestlänge der DNA-Fragmente, abhängig von der Länge des jeweils angestrebten PCR-Produktes sowie
- eine möglichst geringe Verunreinigung durch Proteine.

Verschiedene Versuche zeigten bisher vor allem, dass sich aus Formalin-fixierten Geweben mit gängigen Methoden jedoch meist nur geringe Mengen von fragmentierter DNA

isolieren lassen [12, 20, 28, 48, 71]. Diese Tatsache ist auf die oben beschriebenen Veränderungen der DNA durch Formalin-induzierte Quervernetzungen und Hydrolyse zurückzuführen. Die geringe Qualität der isolierten DNA kann den Erfolg weitergehender Untersuchungen erheblich beeinträchtigen [34, 38, 104]. Allerdings wurden bereits verschiedene Methoden zur Gewinnung möglichst großer Mengen an amplifizierbarer DNA aus Formalin-fixierten Geweben vorgestellt. Gängige DNA-Isolierungsprotokolle wurden dabei entsprechend hinsichtlich einer höheren Konzentration der Proteinase K [33], einer veränderten Verdau-Dauer [38] oder einer erhöhten Verdau-Temperatur [33, 38, 74] modifiziert. Eine verlängerte Verdau-Dauer erwies sich dabei als besonders geeignet, um amplifizierbare DNA aus bis zu 50 Jahre alten Sammlungspräparaten zu isolieren [66].

1.3.3 Einschränkungen bei der Arbeit mit pathologischen Sammlungsobjekten

Natürlich unterliegt jede moderne Lehre und Forschung an alten Sammlungspräparaten auch Einschränkungen. Drei davon seien hier insbesondere aufgeführt:

(1) collection bias („Sammlungsfehler“)

In pathologischen Sammlungen wird zusammengetragen, was das Patientengut hergibt. Daher können auch mehrere Organe vom gleichen Patienten in einer Sammlung vertreten sein. Zudem finden Objekte Eingang in die Sammlung, die vor allem spannend und nicht unbedingt typisch sind. Aus diesen Gründen gibt eine pathologische Sammlung kein exaktes Abbild der Prävalenz einer Krankheit oder einer Erregers in früheren Populationen.

(2) Kontamination der Sammlungspräparate

Diese Einschränkung ist besonders relevant, wenn man an alten Sammlungspräparaten Erregernachweise durchführt. Auch wenn während der molekulargenetischen Untersuchungen mit der gebotenen Reinheit gearbeitet wird, kann eine vorherige Kontamination der Präparate während der zum Teil Jahrzehnte-langen Lagerungszeit nicht ausgeschlossen werden. Daher sollten Erregernachweise immer in der Zusammenschau aller Befunde bewertet werden. Eine Unterscheidung zwischen originaler Erreger-DNA und kontaminierter DNA kann durch die Sequenzierung der amplifizierten DNA gelingen, da Jahrzehnte-alte DNA ein typisches Degradierungsmuster zeigt [39]. Jedoch ist auch hier kritisch anzumerken, dass dies nur zwischen einer relativ jungen Kontamination und dem älteren, „echten“ Erreger unterscheiden würde. Hat die Kontamination bereits vor Jahrzehnten stattgefunden, ist auch durch Sequenzierungsmethoden keine abschließende Aussage mehr möglich [18].

(3) Falsche Sequenzen nach Amplifizierung von degradierter DNA.

Die in Kapitel 1.3.1 beschriebenen Effekte von Formalin und Ethanol auf DNA können während der PCR zum Einbau von artifiziellen Mutationen führen. Diese Mutationen sind insbesondere in der Arbeit mit alten Sammlungspräparaten ein Problem, da hier lediglich geringe Mengen von DNA isoliert und untersucht werden können. Daher können Einbaufehler zu Beginn der PCR schnell zu einer fast 100 %igen Abweichung aller Amplifikationssequenzen von der originalen Sequenz führen. Dieses Problem kann umgangen werden, indem alle Amplifikationen und die danach folgenden Untersuchungen mindestens einmal wiederholt werden. Artifizielle Mutationen zu Beginn der PCR entstehen zufällig und es ist äußerst unwahrscheinlich, dass die gleiche artifizielle Mutation in zwei verschiedenen Durchgängen detektierbar ist. Die Deaminierung von Cytosin zu Uracil führt zu G/C \rightarrow A/T Substitutionen aufgrund der unterschiedlichen Basenpaarung von Cytosin und Uracil. Durch den Einbau von Uracil werden die degradierten DNA-Stränge sensibel für den Verdau durch Uracil-N-Glycosylase (UNG). Durch einen der PCR vorgeschalteten UNG-Verdau lassen sich die G/C \rightarrow A/T Substitutionen daher deutlich reduzieren [30].

1.4 Fragestellung und Ziel der Studie

Neben den zu lösenden infrastrukturellen Problemen, müssen auch die fachlichen Voraussetzungen geschaffen werden, um einen modernen Einsatz einer pathologischen Sammlung in Lehre und Forschung zu ermöglichen. In diesem Zusammenhang wurden zwei Fragestellungen mit der vorliegenden Arbeit angegangen.

Histologische Verifizierung der Originaldiagnose. Es besteht der Verdacht, dass einige der originalen Diagnosen nicht mehr den heutigen Standards entsprechen. Die Rostocker Sammlung stammt aus einer Zeit, in der pathologische Diagnosen oft makroskopisch und ohne histologische Untersuchungen gestellt wurden. Aufgrund der fehlenden mikroskopischen Verifizierung der makroskopischen Verdachtsdiagnose können den damaligen Pathologen *Fehler nach heutigem Verständnis* unterlaufen sein. Auch existiert heute zum Teil eine andere Krankheitsterminologie als zu Beginn des 20. Jahrhunderts. Sollen die Präparate aber heutigen Medizinstudenten als Lehrbeispiele dienen sowie zur Beantwortung aktueller Forschungsfragen herangezogen werden, muss man sich zuerst sicher sein, mit welcher Krankheit man es eigentlich zu tun hat. Daher erfordert der Einsatz der Präparate in Lehre und Forschung eine vorherige Verifizierung der originalen Diagnose

mittels moderner histologischer und eventuell auch immunhistologischer Methoden. Inwieweit dies in einer zufriedenstellenden Qualität mit den alten Geweben möglich ist, soll in dieser Arbeit gezeigt werden.

Eignung langzeit-konservierter Gewebe für molekulargenetische Untersuchungen. In der heutigen pathologischen Diagnostik und Forschung sind molekulargenetische Methoden ein essentieller Bestandteil. Um eine pathologische Sammlung den aktuellen Fragestellungen zu öffnen, muss zuerst geklärt werden, ob sich die langzeit-konservierten Gewebe für eine molekulargenetische Untersuchung noch eignen. Daher wird in dieser Arbeit die Extrahierbarkeit, Amplifizierbarkeit und Sequenzierbarkeit von humaner, bakterieller und viraler DNA aus alten Feuchtpräparaten untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Verwendete Präparate.

Als Grundlage für diese Arbeiten dienten humane Feuchtpräparate der pathologisch-anatomischen Lehrsammlung der Universitätsmedizin Rostock. Grundsätzlich wurden in die Studie Vertreter der folgenden Krankheiten aufgenommen: *Bronchialkarzinom, Kolonkarzinom, Melanom, Gliom, Plattenepithelkarzinome des Mundraumes und des Genitale (männlich und weiblich), Tuberkulose*. Zusätzlich wurde ein mindestens mäßig guter Zustand des Präparates gefordert. Die zu zeigende Pathologie musste makroskopisch eindeutig zu erkennen sein. Zeichen von Schimmel oder Vertrocknung waren ein definitives Ausschlusskriterium. Anhand dieser Kriterien konnten 44 Präparate in die Studie aufgenommen werden.

Die Angaben zum Alter und zum Geschlecht der Präparate waren unvollständig. Die jeweilige Fixierungslösung konnte für kein Präparat zurückverfolgt und chemischen Analysen der Originallösung konnten nicht durchgeführt werden. Aufgrund der eigenen Sammlungsgeschichte ist es allerdings wahrscheinlich, dass auch die Präparate mit unbekanntem Entstehungsdatum nach 1900 gefertigt wurden. Aufgrund dessen ist eine Fixierung und Konservierung der Gewebe mit den gängigen Fixierungs- und Konservierungsmethoden des letzten Jahrhundert in Deutschland wahrscheinlich (auf Formalin- und / oder Alkoholbasis). Tabelle 1 zeigt die verwendeten Präparate mit entsprechenden Angaben, wie sie in der Sammlung geführt werden. Soweit bekannt, handelt es sich bei dem ältesten in der Studie verwendeten Präparat um ein Oberkieferkarzinom von 1902.

	Nr.	Originale Bezeichnung	Organ	Entität	FZ
1	Nn28	Nebennieren mit Metastasen eines Bronchialkarzinoms	Nebenniere	Bronchial-Ca	–
2	Lu176	Bronchialkarzinom	Lunge	Bronchial-Ca	–
3	Lu170	Bronchialkarzinom und chronische Pneumonie	Lunge	Bronchial-Ca	1927
4	Nn23	Metastase eines Bronchialkarzinoms	Nebenniere	Bronchial-Ca	1934
5	He146	Metastase eines Bronchialkarzinoms	Herz	Bronchial-Ca	–
6	Da236	Karzinom des Colon transversum	Kolon	Kolon-Ca	1923
7	Da274	Stenosierendes Kolonkarzinom	Kolon	Kolon-Ca	–

8	ZNS33	Glioblastoma multiforme	Gehirn	Gliom	–
9	ZNS270	Glioblastoma multiforme	Gehirn	Gliom	–
10	ZNS212	Stiftgliom	Rückenmark	Gliom	–
11	Da183	Metastase eines Melanosarkoms	Kolon	Melanom	–
12	Ht60	Melanosarkom des Fußrückens	Haut	Melanom	–
13	Ht13	Kutanes Melanom	Haut	Melanom	1964
14	HT9b	Melanomalignom	Haut	Melanom	–
15	WGt45	Melanosarkom-Metastasen	Uterus	Melanom	–
16	Ht15b	Malignes Melanom	Haut	Melanom	1940
17	Ht3	Melanosarkom	Haut	Melanom	–
18	Ht15a	Melanosarkom	Haut	Melanom	1925
19	Ht32	Melanosarkom am Ohr	Haut	Melanom	1924
20	WGt151	Zervixkarzinom	Zervix uteri	Zervix-Ca	1932
21	mGt26	Peniskarzinom	Penis	Penis-Ca	1924
22	Mu28	Lippenkarzinom	Lippe	Karzinom	1937
23	Mu7	Oberkieferkarzinom	Kiefer	Karzinom	1902
24	Md40	Karzinom des Zungengrundes	Mundboden	Karzinom	–
25	Mu17	Karzinom der Lippe	Lippe	Karzinom	–
26	Mu10	Kieferkarzinom	Kiefer	Karzinom	–
27	Mu37	Lippenkarzinom	Lippe	Karzinom	–
28	Mu31	Zungenkarzinom	Zunge	Karzinom	–
29	mGt103	Peniskarzinom	Penis	Penis-Ca	–
30	mGt91	Peniskarzinom	Penis	Penis-Ca	1937
31	Ni34	Nierentuberkulose	Niere	Tuberkulose	–
32	Mi133	Miliartuberkulose der Milz	Milz	Tuberkulose	–
33	Ke3	Tuberkulose im Kehlkopf	Kehlkopf	Tuberkulose	–
34	Thy3	Tuberkulose im Thymus	Thymus	Tuberkulose	–
35	Gf122	Thrombose der Vv. iliacae et V. cava inf. bei Lymphknotentuberkulose	Gefäße	Tuberkulose	–
36	Lu7.2	Käsige Pneumonie und Aussaat beim Kind	Lunge	Tuberkulose	–
37	Lu124	Tuberkulose-Empyem	Lunge	Tuberkulose	1923
38	Lu145	Steinhauerlunge / Oberlappen- Tuberkulose	Lunge	Tuberkulose	–
39	Lu30/10	Tuberkulose	Lunge	Tuberkulose	–
40	Kn322	Ausgedehnte käsige Tuberkulose der Wirbelsäule	Knochen	Tuberkulose	–

41	wGt200	Tuberkulose des Uterus und der Vagina	inneres weibl. Genitale	Tuberkulose	–
42	Lu180	Großknotige Miliartuberkulose	Lunge	Tuberkulose	–
43	Ni250	Käsige Tuberkulose des Nierenparenchyms	Niere	Tuberkulose	–
44	Lu217	Kavernös-zirrhotische Tuberkulose	Lunge	Tuberkulose	–

Tabelle 1: Für die Studie verwendete Präparate und sammlungsinterne Angaben.
(FZ ... Fixierzeitpunkt, Ca ... Karzinom)

2.1.2 Verwendete Antikörper für die immunhistologischen Färbungen.

Die für die immunhistologischen Färbungen verwendeten Antikörper gegen *TTF-1*, *GFAP*, *Zytokeratin AE1/AE3*, *Vimentin* und *CD56* sowie die entsprechenden Reaktionsbedingungen zeigt Tabelle 2.

Antikörper	Klon	Typ	Hersteller	Code	Verdünnung	Kontrolle	Inkubation
Vimentin	V9	Ms IgG ₁	DAKO, Germany	M0725	1:500	Blinddarm	30 min, RT
TTF-1	8G7G3/1	Ms IgG ₁	DAKO, Germany	M3575	1:100	Lungentumor	30 min, RT
CD56	1B6	Ms IgG ₁	Novacastra, Newcastle	RTU-CD56-1B6	1:50	Tonsille	15 min, 25°C
Zytokeratin AE1/AE3	AE1/AE3	Ms IgG ₁	DAKO, Germany	M3515	1:500	Ureter	30 min, RT
GFAP	–	Rb IgG	DAKO, Germany	Z0334	1:10.000	Gehirn	30 min, RT

Tabelle 2: Angaben zu den für die immunhistologischen Färbungen genutzten Antikörpern. (Ms ... Maus, Rb ... Kaninchen, RT ... Raumtemperatur)

2.1.3 Verwendete Chemikalien und Substanzen

Methode	Name	Herstellerfirma
Präparation	JORES-II 4% Formalin Bienenwachs	Herbeta, Berlin Apotheke Unimedizin Rostock Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe

	Kolophonium	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Kryostatschnitte	TissueTek® Stickstoff	Sakura Finetek Europe B.V. Linde AG, Deutschland
Entparaffinierung	Rotihistol Ethanol	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe Apotheke Unimedizin Rostock
Isolierung der DNA	Tris-Puffer EDTA Tween20 Proteinase K NaCl Phenol-Chloroform- Isoamyl-alkohol Natriumacetat	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe Roche Life Science, Deutschland Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
PCR	PCR-Primer 5x PCR Puffer MyTaq Polymerase	MWG-Biotech, Ebersberg Bioline, Luckenwalde Bioline, Luckenwalde
Gel-Elektrophorese	TAE-Puffer Agarose Midori Green DNA-loading dye 100bp gene ruler	selbst angesetzt Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe Biozym Scientific GmbH, Hes- sisch Oldendorf Thermo Scientific, Darmstadt Thermo Scientific, Darmstadt
Aufreinigung der PCR-Produkte	alkalische Phosphatase Exonuklease	Thermo Scientific, Darmstadt Thermo Scientific, Darmstadt
Sanger-Sequenzierung	5x PCR Puffer MyTaq Polymerase BigDye BDX64 SAM-Solution Xterminator	Bioline, Luckenwalde Bioline, Luckenwalde Applied Biosystems, Darmstadt NimaGen B.V., Niederlande Applied Biosystems, Darmstadt Applied Biosystems, Darmstadt

	HiDi™ Formamid	Applied Biosystems, Darmstadt
MGMT-Promotor-Methylierung	Epitect Bisulfite Kit SensiFast Probe Kit mit CpG Methylase (M. Sssl) behandelte humane DNA	Qiagen, Hilden Bioline, Darmstadt Thermo Scientific, Darmstadt
HPV-Untersuchung	HPV Type 3.5 LCD-Array Kit	Chipron GmbH, Berlin
UNG-Verdau	UNG Reaktionspuffer UNG	New England Biolabs GmbH, Frankfurt / Main
Mykobakterien-Untersuchung	MYCO Direct 1.7 LCD-Array Kit	Chipron GmbH, Berlin
H&E-Färbung	Objektträger Hämalaun Eosin Xylol	Instrumedics Inc, Hackensack, NJ, USA Sigma-Aldrich, Buchs Merck KgaA, Darmstadt Grimm MED Logistik GmbH, Torgelow
Ziehl-Neelsen-Färbung	Karbolfuchsin HCL	Merck KgaA, Darmstadt EMSURE®, Merck KgaA, Darmstadt
Gram-Färbung	Kernechtrot Kristallviolett-Lösung Lugol'scher Lösung	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster Merck KgaA, Darmstadt Merck KgaA, Darmstadt
Immunhistologie	Objektträger Diamonobenzidin EnVision™ FLEX, High pH, (Link)	Instrumedics Inc, Hackensack, NJ, USA DAKO, Germany DAKO, Germany

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.

2.2 Methoden

Eine schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte zeigt Abb. 1. Im folgenden Kapitel werden die Abläufe innerhalb der einzelnen Arbeitsschritte detailliert beschrieben.

Im weiteren Text werden folgende Krankheitsentitäten als “Tumorpräparate” zusammengefasst: Bronchialkarzinom, Kolonkarzinom, Melanom und Gliom. In die als “Infektionspräparate” bezeichnete Gruppe fallen sowohl Tuberkulose-Präparate als auch Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und Genitalregion, da diese auf ihre Assoziation mit Humanen Papillomaviren (HPV) untersucht wurden.

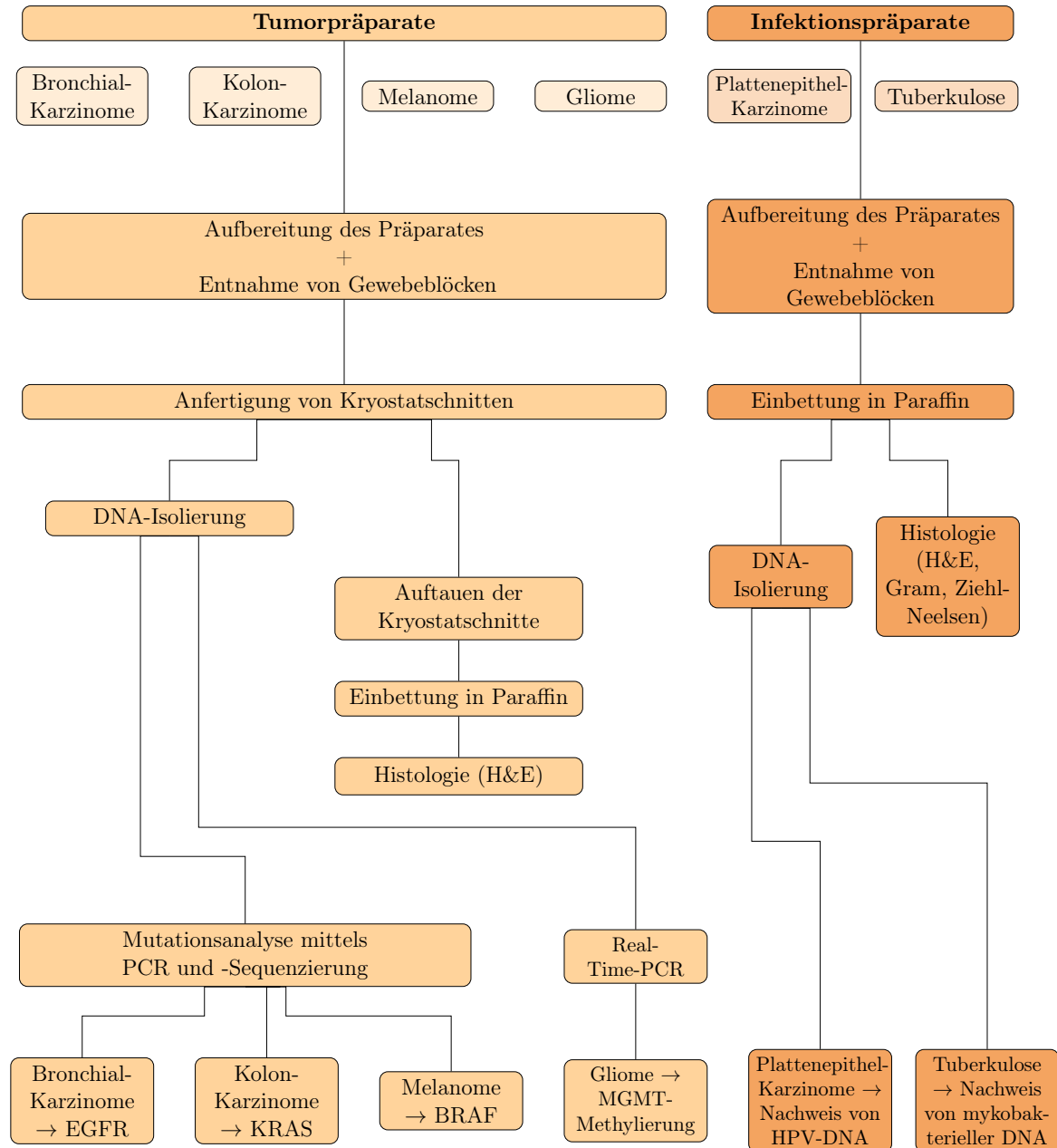


Abbildung 1: Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte.

2.2.1 Aufbereitung von alten Präparaten und Probengewinnung.

Das Präparat wurde aus dem ursprünglichen Glas entnommen und während der Reinigung des Glases und der Fertigung eines neuen Rahmens in langsam fließendem Wasser für max. 4 Stunden aufbewahrt. Zur Fertigung des Rahmens diente 1 mm starkes Plexiglas, in welches zur Befestigung des Präparates mithilfe eines Drehmels kleine Löcher an entsprechende Stellen gebohrt wurden.

Die Gewebprobe wurde an einer wenig sichtbaren, aber für die jeweilige Krankheitserregertät möglichst repräsentativen Stelle entweder mit einer Biopsienadel (Biopsiegröße ca. 1 mm x 8 mm) oder mit dem Skalpell (Biopsiegröße ca. 5 x 5 x 5 mm) entnommen. Die Gewebeproben wurden nach Entnahme in Eppendorfröhrchen in 4 % Formalin zwischengelagert.

Nach Gewebeentnahme wurden die Präparate an den vorbereiteten Plexiglasrahmen genäht und in das Originalglas zurückverbracht. Als Konservierungslösung diente JORES II-Konservierungslösung.

Die Gläser wurden mithilfe einer erwärmten Bienenwachs-Kolophonium-Masse nach Anders-Grünewald und Wechsler verschlossen [14].

1. Herstellung der Verschlussmasse

- Bienenwachs und Kolophonium im Wärmeschränk langsam auf 130 °C erhitzen
- Durchmischung der beiden heißen Flüssigkeiten in einem Verhältnis von Bienenwachs:Kolophonium 3:1
- Verteilen des Gemisches auf kleinere Gläser

2. Verschließen der Gläser

- Erwärmen der Verschlussmasse im Wasserbad
- Reinigung der Deckel und Auflageränder mit 96 % Ethanol
- Erwärmen der Deckel im Brutschrank bei 130 °C für 10 min
- Verteilen der Verschlussmasse auf die Auflageränder der Gläser mittels dünnem Pinsel
- Auflegen der warmen Deckel
- Beschweren der Deckel mit kleinen Gewichten für ca. 15 min bis zum Aushärten der Verschlussmasse

Um ein sauberes und anschauliches Bild der fertigen Präparate zu erreichen, wurde die Verschlusskante zwischen Glas und Deckel in einem letzten Schritt mit schwarzer Acrylfarbe verkleidet. Die Verkleidung mit Acrylfarbe sowie das Anbringen neuer Etiketten erfolgte teilweise erst nach Fertigstellung der schriftlichen Arbeit.

2.2.2 Histologische Färbungen

Paraffinschnitte à 4 μm wurden auf klebebeschichtete Objektträger aufgezogen und nach den unten genannten Protokollen gefärbt. Zu jedem Präparat wurde ein H&E-Schnitt (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) und von den Tuberkulosepräparaten zusätzlich je ein Schnitt nach Ziehl-Neelsen- und Gram-Färbung angefertigt.

1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

- Schnitt 5 min in Hämalalaun inkubieren
- Bläuen in warmen Wasser
- Inkubation für 2 min in Eosin
- 2 x Spülen in Wasser
- Schnitt in aufsteigender Alkoholreihe (70 % \rightarrow 80 % \rightarrow 90 % \rightarrow 100 %) entwässern
- in Xylol verbringen
- zum Schluss mittels eines Deckglases eindecken

2. Färbung nach Ziehl-Neelsen

- Schnitt in Aqua dest. wässern und gut abtropfen
- über der Flamme eines Spiritusbrenners erhitzen
- Karbolfuchsin auftropfen
- Schnitt 2 – 3 mal durch Flamme ziehen (nicht kochen!)
- in HCL-Alkohol (70 ml 100 % Ethanol + 15 ml Aqua dest. + 15 ml 1 N HCL) verbringen, bis der Schnitt fast farblos ist
- spülen in Aqua dest.
- 5 min in Hämalalaun inkubieren
- Schnitt in aufsteigender Alkoholreihe (70 % \rightarrow 80 % \rightarrow 90 % \rightarrow 100 %) entwässern

- in Xylol verbringen
- zum Schluss mittels eines Deckglases eindecken

3. Gram-Färbung

- 10 – 15 min in Kernechtrot inkubieren
- Spülen mit Aqua dest.
- Inkubation für 5 – 8 min in konzentrierter Kristallviolett-Lösung
- gründlich wässern
- Inkubation für 1 min in Lugol'scher Lösung
- Spülen mit Aqua dest.
- 10 s in HCL-Alkohol verbringen (70 ml 100 % Ethanol + 15 ml Aqua dest. + 15 ml 1 N HCL)
- kurz wässern
- kurz spülen mit 70 % Ethanol
- Differenzieren in frisch angesetzttem, 90 % Ethanol (dabei müssen die Schnitte eine rosa Färbung unter komplettem Verlust des blauen Farbtons annehmen)
- kurz spülen in 100 % Ethanol
- kurz mit Xylol spülen
- zum Schluss mittels eines Deckglases eindecken

2.2.3 Immunhistologische Verfahren

Zur Herstellung immunhistologischer Färbungen wurden zuerst Paraffinschnitte à 4 μ m auf klebebeschichtete Objektträger aufgezogen. Die Färbeprozedur fand mithilfe eines Autostainers (EnVision™ FLEX, High pH, (Link), DAKO, Germany) auf Basis der jeweiligen Herstellerprotokolle mit Antikörpern gegen *Vimentin*, *Zytokeratin AE1/AE3*, *CD56*, *GFAP* und *TTF-1* statt. In jedem Färbedurchlauf lief eine Positivkontrolle mit. Dabei handelte es sich um bekannt positive Gewebsschnitte aus dem Bestand des Institutes. Die primären Antikörper wurden mit DAKO Antibody Diluent (Code-Nr S 0809) verdünnt. Alle Angaben zu den entsprechenden Antikörpern siehe Tabelle 2 in Kapitel 2.1.2. Als Chromogen für alle Färbungen wurde Diaminobenzidin verwendet.

Probenvorbereitung und hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER). Vor jeder Färbung wurden die Schnitte mit der vom Hersteller empfohlenen 3-in-1-Technik entparaffiniert, rehydriert und anschließend hitzeinduziert epitopdemaskiert.

- Verdünnung der EnVisionTM FLEX Target Retrieval Solution mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:50
- Erhitzen der Lösung im Tank des PT Link auf 65 °C
- Inkubation der paraffineingebetteten Gewebeschnitte in der vorerwärmten Arbeitslösung bei 97 °C für 20 min
- Abkühlen der Lösung mit den sich darin befindenden Gewebeschnitten auf 65 °C und Entnehmen der Autostainer-Gestelle mit den Objektträgern aus dem PT Link-Tank
- Inkubation für ca. 5 min in einem Tank mit EnVisionTM FLEX Wash Buffer (20x) bei Raumtemperatur
- Beginn der jeweiligen FärbeprozEDUREN

FärbeprozEDURE. Nach der Probenvorbereitung und hitzeinduzierten Epitopdemaskierung in 3-in-1-Technik wurden die Schnitte mit den jeweiligen primären Antikörpern inkubiert (Inkubationsbedingungen siehe Tabelle 2).

Zur Detektierung diente Dako EnVisionTM FLEX/HRP Detection Reagent (SM802), bestehend aus einem Dextrane-Backbone, an welches mehrere Peroxidase-Moleküle und sekundäre Antikörper gekoppelt sind. Als Substratsystem diente ein Zwei-Komponenten-System aus EnVisionTM FLEX DAB + Chromogen (DM827) (konzentrierte Diaminobenzidininlösung) und wasserstoffperoxidhaltigem EnVisionTM FLEX Substrate Buffer (SM803). Das verwendete Substratsystem führte zu einer braunen Färbung am Ort des Zielantigen. Zur Kontrastanhebung wurden die Zellkerne mit EnVisionTM FLEX Hematoxylin blau angefärbt.

Auswertung der Immunhistologie. Die Auswertung der immunhistologischen Schnitte erfolgte mithilfe von Frau OÄ Dr. Anette Obliers und Herr Prof. Erbersdobler anhand des immunoreactive score (IRS) nach Remmele und Stegner [70]. In die Bewertung flossen die Anzahl der gefärbten Zellen in Prozent und die Intensität der Färbung wie in Tabelle 4 gezeigt ein. Gebildet wurde der IRS schließlich als Produkt der vorher ermittelten Einzelwerte.

% der positiven Zellen			Intensität der Färbung	
0 %	→	0	keine Farbreaktion	→ 0
< 10 %	→	1	milde Farbreaktion	→ 1
10 - 50 %	→	2	moderate Farbreaktion	→ 2
51 - 80 %	→	3	intensive Farbreaktion	→ 3
> 80 %	→	4		

Immunoreactive Score (IRS)			
0 - 1	→	negativ	
2 - 3	→	mild	
4 - 8	→	moderat	
9 - 12	→	stark positiv	

Tabelle 4: Bildung des IRS nach Remmele und Stegner [70].

2.2.4 DNA-Isolierung

Für die Tumorpräparate erfolgte die DNA-Isolierung aus vorher angefertigten Kryostatschnitten, für die Infektionspräparate aus vorher eingebetteten Paraffinschnitten.

Anfertigung von Kryostatschnitten.

- Aufbringen der Biopsien mit einer sterilen Pinzette auf entsprechende Metallblöcke
- Einbetten der Biopsien in TissueTek®
- Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -196 °C
- Schneiden von 60 Schnitten à 10 µm von jedem Gefrierblock
- Überführen der Schnitte in ein 1,5 ml-Eppendorfröhrchen

Anfertigung von Paraffinschnitten. Von den potentiell HPV-assoziierten Tumoren sowie von Biopsien der Tuberkulose-Präparate erfolgte die direkte Anfertigung von Paraffinblöcken nach Standard-Labormethoden. Aus diesen Paraffinblöcken konnten direkt Schnitte sowohl für die Histologie als auch für die Isolierung von DNA gewonnen werden. Die entnommenen Biopsien aus den Tumorpräparaten wurden erst nach Anfertigung von Kryostatschnitten in Paraffin eingebettet.

Entparaffinierung. Vor Isolierung der DNA musste das Gewebe der Infektionspräparate entparaffiniert werden. Dafür wurden 20 Paraffinschnitte à 10 μm verwendet.

- Erhitzen der Paraffinschnitte in einem Eppendorfröhrchen im Heizblock für 10 min bei 80,5 °C
- Zugabe von 1 ml Rotihistol
- Vortexen und 5-minütige Zentrifugation
- Verwerfen des Überstandes
- Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol
- Vortexen und 5-minütige Zentrifugation
- Verwerfen des Überstandes und Wiederholen des Ethanol-Schrittes
- Verdampfen des restlichen Flüssigkeit bei 60 °C im Heizblock (bei geöffnetem Eppendorf-Röhrchen)

Isolierung der DNA. Die DNA-Isolierung erfolgte aus den Kryostatschnitten wie aus dem entparaffiniertem Gewebe der Infektionspräparate auf gleiche Weise. In einem ersten Schritt wurde ein Verdaupuffer wie folgt frisch angesetzt:

	500 μl	Tris-Puffer
+	10 μl	EDTA
+	250 μl	Tween20
→ auf 50 ml mit sterilem H_2O auffüllen		
	<hr/>	
	50 ml	

Tabelle 5: Verdaupuffer

Für die DNA-Isolierung wurden dann (1) 60 Kryostatschnitte à 10 μm der Tumorpräparate und (2) 20 Paraffinschnitte à 10 μm der Infektionspräparate nach folgendem Protokoll verarbeitet.

- Inkubation des Gewebes mit 40 μl Proteinase K (in einer Konzentration von 20 mg/ml) und 400 μl Verdaupuffer (siehe Tabelle 5) für insgesamt 72 h bei 56 °C → nach 36 h Zugabe von 20 μl frischer Proteinase K (20 mg/ml)

- kurze Zentrifugation und Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorf-Röhrchen
- Inkubation in 5 M NaCl bei 60 °C für 4 h zum Lösen der Formalin-induzierten DNA-Quervernetzungen
- 5-minütige Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes
- Zugabe von 1 V Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
- Vortexen für 30 s und 5-minütige Zentrifugation
- vorsichtiges Abnehmen des weißen Überstandes (Proteinschicht)
- Wiederholen der Zentrifugation und Abnehmen des Überstandes bis sich keine Proteinschicht mehr bildet

Danach erfolgte die Gewinnung der DNA mittels einer Ethanolfällung.

- Zugabe von 2,5 V 100% Ethanol und $\frac{1}{10}$ V 3 M Natriumacetat (pH 4,8 – 5,2)
- Inkubation bei -20 °C über Nacht
- Zentrifugation bei 4 °C für 30 min und Verwerfen des Überstandes
- Zugabe von 200 μ l eisgekühltem 70 % Ethanol
- Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und Verwerfen des Überstandes
- Trocknen des zurückbleibenden Pellets
- Aufnehmen des Pellets in 30 μ l Wasser
- Vortexen
- Vollständiges Lösen der DNA während einer 5-minütigen Inkubation bei 60 °C

Nun konnte in einem letzten Schritt die DNA-Konzentration und die DNA-Reinheit als 260nm/280 nm Absorptionsquotient am Photometer (Nanodrop) in 2 μ l DNA-Lösung gemessen werden. Die DNA-Lösung wurde in 1,5 ml-Eppendorfröhrchen im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.5 Mutationsanalysen

Die Mutationsanalysen für die Gene EGFR (Bronchialkarzinome), KRAS (Kolonkarzinome) und BRAF (Melanome) erfolgten mittels Sanger-Sequenzierung nach vorangegangener Amplifizierung. Sowohl die Amplifizierung als auch die Sequenzierung wurde zur Verifizierung der Ergebnisse jeweils einmal wiederholt.

PCR-Protokoll. Jeweils 25 μl einer Reaktionslösung wurden für einen PCR-Durchgang in folgender Zusammensetzung hergestellt:

	0,2 μl	MyTaq Polymerase
+	5 μl	5x PCR Puffer
+	1 μM	entsprechende Primer-Substanz
+	75 ng	vorher isolierte DNA des jeweiligen Tumorpräparates
	→ mit H_2O auffüllen	
	<hr/> 25 μl	

Gen	Exon	Primer-Sequenz	Temp. [°C]	Produktgröße [bp]
EGFR	18	5'-GCATGGTGAGGGCTGAGGTGA-3'	61	234
		5'-CCCCACCAGACCATGAGAGGC-3'		
	19	5'-TGCCAGTTAACGTCTTCCTTCTCTC-3'	61	158
		5'-CCACACAGCAAAGCCACACTGA-3'		
	20	5'-CCACCATGCGAAGCCACACTGA-3'	61	268
		5'-TCCTTATCTCCCCCTCCCCGTATCTC-3'		
	21	5'-AGCTTCTTCCCATGATGATCTGTCC-3'	61	264
		5'-GGCAGCCTGGTCCCTGGTGTC-3'		
KRAS	2	5'-GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTGATTAA-3'	58	255
		5'-TCAAAGAATGGTCCTGCACC-3'		
	3	5'-CTTTGGAGCAGGAACAATGTCT-3'	58	270
		5'-TACACAAAGAAAGCCCTCCCC-3'		
	4	5'-TGGACAGGTTTTGAAAGATATTTG-3'	58	381
		5'-ATTAAGAAGCAATGCCCTCTCAAG-3'		
BRAF	15	5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3' 5'-CTTCTAGTAACTCAGCAGC-3'	60	251

Tabelle 6: Angaben zu den verwendeten PCR-Primern. (Temp. ... Hybridisierungstemperatur)

Nach einer kurzen Zentrifugation der Reaktionslösung erfolgte die PCR nach unten aufgezeigtem Protokoll.

- ⇒ Start bei 95 °C für 10 min
- | | |
|---|--------------------|
| <p>↔ Schmelzen der DNA bei 94 °C für 30 s</p> <p>↔ Primerhybridisierung für 30 s</p> <p>↔ Elongation bei 72 °C für 45 s</p> | <p>} 35 Zyklen</p> |
|---|--------------------|
- nochmalige Elongation bei 72 °C für 10 min
- Lagerung im Thermocycler bei 4 °C

Die Temperaturen für den Schritt der Primerhybridisierung variierten in Abhängigkeit der genutzten Primer und sind aus Tabelle 6 ersichtlich. Da bei den ersten Probedurchläufen lediglich ein schwaches Signal in der anschließenden Gelelektrophorese detektiert werden konnte, wurde nach jeder PCR eine Reamplifizierung nach gleichem Protokoll mit 1 μ l PCR-Produkt aus dem ersten Durchlauf durchgeführt.

Gel-Elektrophorese. Von den 25 μ l PCR-Produkt wurden 10 μ l für die Gel-Elektrophorese verwendet.

Herstellung eines Agarose-Gels:

- 2 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer
- Aufkochen
- Zugabe von 6 μ l Midori Green und Mischen auf dem Schüttler
- Gießen des Gels in Gelkammer und Aushärten für 30 min

Gelelektrophorese:

- Pipettieren von 10 μ l DNA-Marker (100 bp gene ruler) in die erste Tasche
- Vorlegen von 1 μ l DNA loading dye in ein leeres Eppendorfröhrchen
- Zugabe von 10 μ l PCR-Produkt und sorgfältiges Mischen durch mehrmaliges Hoch- und Runterpipettieren
- Pipettieren von 10 μ l dieses Gemisches jeweils in eine Tasche

- Elektrophorese in DNA-Laufrichtung für ca. 30 min bei 90 V und 0,28 A

Unter UV-Licht konnten die mit Hilfe des Midori Green-Farbstoffes im Agarose-Gel angefärbten DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden.

Aufreinigung der PCR-Produkte. Um eine möglichst fehlerfreie Sequenzierung zu erreichen, wurden nach Durchführung der PCR die entstandenen freien Enden der PCR-Produkte zunächst beseitigt. Am 5'-Ende erfolgte dies durch eine alkalische Phosphatase, am 3'-Ende mit Hilfe einer Exonuklease I.

- Zugabe von 3 μ l alkalischer Phosphatase und 1,5 μ l Exonuklease I
- Inkubation für 15 min bei 37 °C
- Inaktivierung der Enzyme bei 85 °C für 15 min

Sanger-Sequenzierung Verwendet wurde sowohl für KRAS, BRAF als auch für EGFR das BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany).

Zuerst wurde unter der Steril-Bank ein Mastermix folgender Zusammensetzung hergestellt:

+	0,875 μ l	BDX64
+	1,5 μ l	5x BD Puffer
+	0,125 μ l	BigDye
+	5,5 μ l	H_2O
	<hr/>	
	8 μ l	

Je 8 μ l dieses Mastermix wurden in einem Eppendorfröhrchen mit je 1 μ l des Vorwärts- oder Rückwärtsprimer des zu sequenzierenden Gens (siehe Tabelle 6) sowie mit 1 μ l des jeweiligen PCR-Produktes gemischt.

Die Sequenzierung wurde wie folgt durchgeführt:

⇒ Start bei 96 °C für 1 min	
↔ Schmelzen der DNA bei 96 °C für 10 s	} 25 Zyklen
↔ Primerhybridisierung bei 50 °C für 5 s	
↔ Elongation bei 60 °C für 4 min	

Danach erfolgte die Aufreinigung der Sequenzierungs-Produkte nach folgendem Protokoll:

- Überführen von 10 μ l Sequenzierungsprodukt in eine 96Well-Platte
- Vermischen mit 45 μ l SAM-Solution sowie 10 μ l XTerminator
- Schütteln der Platte auf einem passenden Schüttler für 30 min bei 2300 U/min
- Zentrifugation der gesamten Platte auf einer passenden Zentrifuge für 2 min

Danach konnten die so vorbereiteten Sequenzierungs-Produkte im 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) analysiert und mit einer Referenz-Sequenz unter Einsatz der SeqScape® Software v2.7 (Applied Biosystems, Darmstadt) verglichen werden (siehe Tabelle 7).

Gen	Referenzsequenz
KRAS	Genbank GI: ENSG00000133703
BRAF	Genbank GI: ENSG00000157764
EGFR	Genbank GI: ENSG00000146648

Tabelle 7: Referenzsequenzen.

2.2.6 MGMT-Promotormethylierung im Gliom

Die Bestimmung des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus erfolgte in den Gliom-Präparaten ZNS33, ZNS212 und ZNS270 mittels Methy-Light-Technik. Die folgenden Untersuchungen wurden zur Verifizierung der Ergebnisse mit der isolierten DNA jeweils einmal wiederholt.

Bisulfitreaktion. Die Konvertierung der DNA erfolgte mittels des Epitect Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Die Vorbereitungen der einzelnen Reagenzien wurden nach Herstellerangaben wie folgt durchgeführt:

- Lösen eines vom Hersteller bereitgestellten Aliquot Bisulfit Mix in 800 μ l RNase-freiem Wasser durch starkes Vortexen (eventuell Lösen bei 60 °C)
- Zusammenstellung des Reaktionsmixes in einem 200 μ l-Eppendorf-Röhrchen wie unten aufgeführt

	1 – 40 μ l	isolierte DNA (1 – 500 ng)
	bis 40 μ l auffüllen	mit RNase-freiem Wasser
+	85 μ M	Bisulfit-Mix
+	15 μ l	DNA Protect Buffer
	<hr/> <hr/>	
	140 μ l	

Ein Farbumschlag des grünen DNA Protect Buffer zu blau nach Zugabe von Bisulfit-Mix zeigt dabei ein korrektes Durchmischen sowie das Erreichen des optimalen pH-Wertes an. Die Bisulfit-Reaktion erfolgte danach im Thermo-Cycler nach folgendem Protokoll:

- Denaturierung bei 95 °C für 5 min
- Inkubation bei 60 °C für 25 min
- Denaturierung bei 95 °C für 5 min
- Inkubation bei 60 °C für 85 min
- Denaturierung bei 95 °C für 5 min
- Inkubation bei 60 °C für 175 min

Das Reaktionsprodukt konnte im Thermocycler bei 20 °C gelagert werden. Danach wurden folgende Schritte durchgeführt:

- kurze Zentrifugation der Eppendorf-Röhrchen
- Überführung des gesamten Inhaltes in ein sauberes 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen
- Zugabe von 560 μ l Puffer “BL”
- kurze Zentrifugation
- Überführung der Flüssigkeit auf eine vorbereitete EpiTect spin-Säule und Auffangen des Durchflusses in einem Sammelröhrchen während einer 1-minütigen Zentrifugation
- Verwerfen des Durchflusses
- Zugabe von 500 μ l Puffer “BW” auf die Säule und erneutes Auffangen des Durchflusses während einer 1-minütigen Zentrifugation in einem Sammelröhrchen
- Verwerfen des Durchflusses

- Inkubation der Säule in 500 μ l des Puffers “BD” für 15 min bei Raumtemperatur mit geschlossenem Deckel
- 1-minütige Zentrifugation und Verwerfen des Durchschlages
- zweimaliges Reinigen der Säule in 500 μ l Puffer “BW” mit jeweils 1-minütiger Zentrifugation und Verwerfen des Durchflusses
- Überführung der Säule in ein sauberes 2 ml-Sammelröhrchen
- Zentrifugation für 5 min
- Überführung der Säule in ein sauberes 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen
- Ablösung der DNA von der Säulenmembran mittels 20 μ l Puffer “EB” und 1-minütiger Zentrifugation. Der Puffer muss dabei vorsichtig direkt über die Mitte der Membran pipettiert werden.
- Zentrifugation für 1 min und Wiederholen der Elution

Die gelöste DNA konnte kurzzeitig bei 2 – 8 °C aufbewahrt und ansonsten bei -20 °C gelagert werden.

Real-Time-PCR. Nach Konvertierung der DNA folgte die eigentliche Messung des vorherigen Methylierungsstatus mittels real-time PCR unter Zuhilfenahme des SensiFast Probe Kit (Bioline, Luckenwalde, Germany). Eine mit CpG Methylase (M. SssI) behandelte, humane DNA diente als Positivkontrolle, da sie nach Inkubation mit der Methylase als voll-methyliert angesehen werden kann. Das Kollagenase-Gen 2A1 (Col2A1) wurde als endogene Kontrolle verwendet. Die Primersequenzen sowie die Sondensequenz zeigt Tabelle 8.

Primer	Sequenz
MGMT-1 (vorwärts)	5'- GCGTTTCGACGTTTCGTAGGT-3'
MGMT-2 (rückwärts)	5'-CACTCTTCCGAAAACGAAACG-3'
MGMT-3 (Sonde)	5'-6FAM-CGCAAACGATACGCACCGCGA -TMR-3'

Tabelle 8: Sequenz zum Nachweis des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus.

Nach Herstellen des folgenden Mastermixes:

	10 μ l	2x SensiFAST Probe Hi-ROX Mix (1x)
+	0,8 μ l	10 μ M Vorwärts-Primer (400 nM)
+	0,8 μ l	10 μ M Rückwärts-Primer (400 nM)
+	0,2 μ l	10 μ M Sonde (100 nM)
+	4,5 μ l	DNA-Template (0,7 μ l DNA verdünnt mit 3,8 μ l H_2O)
+	3,7 μ l	H_2O
	<u>20 μl</u>	

erfolgte die Durchführung der real-time PCR im StepOne Plus System (Applied Biosystems).

\Rightarrow Start bei 95 °C für 10 min
 \leftrightarrow Schmelzen der DNA bei 95 °C für 10 s
 \leftrightarrow Primerhybridisierung und Elongation für 20 s bei 60 °C
 $\left. \vphantom{\begin{matrix} \leftrightarrow \\ \leftrightarrow \end{matrix}} \right\} 40 \text{ Zyklen}$
 \rightarrow Lagerung im Thermocycler bei 4 °C

Die Berechnung des methylierten Referenzwertes in Prozent (*percentage of methylated reference, PMR*) erfolgte wie folgt:

$$PMR(Probe) = \frac{\frac{MGMT-Promotor-Gen(Probe)}{COL2A1-Gen}}{\frac{MGMT-Promotor-Gen(Sssl - behandelteDNA)}{COL2A1-Gen}} \cdot 100\%$$

Ab einem PMR > 4 % wurden die Proben als positiv methyliert gewertet.

2.2.7 DNA-basierte Bestimmung von HPV-Typen

Die Untersuchung der oropharyngealen und genitalen Karzinome auf HPV erfolgte mittels des HPV Type 3.5 LCD-Array Kit von Chipron GmbH, Berlin. Die zur Amplifikation genutzten Primer-Paare generierten ca. 450 bp und ca. 125 bp lange DNA-Fragmente, welche mit einer Sonde markiert wurden. Diese Sonden-markierten PCR-Fragmente hybridisierten an den entsprechenden Sequenzen eines DNA-Arrays und wurden Enzymvermittelt durch eine blaue Färbung sichtbar gemacht. Sowohl die Amplifizierung als auch die Hybridisierung wurde zur Verifizierung der Ergebnisse jeweils einmal wiederholt. Vor der Amplifizierung erfolgte ein UNG-Verdau der isolierten DNA nach folgendem

Protokoll:

- Zugabe von einem Aliquot des UNG Reaktionspuffers (*UDG reaction buffer*) sowie einer Einheit UNG direkt zur isolierten DNA
- Inkubation bei 37 °C für 30 min

Die auf diese Weise vorbehandelte DNA wurde dann direkt amplifiziert.

Amplifikation. Genutzt wurden die vom Hersteller bereitgestellten Primer-Paare im Primer Mix A: *My 11/09* (ca. 450 bp) als auch im Primer Mix B: *125* (ca. 125 bp). Die Amplifikation begann mit der Herstellung zweier Mastermixe nach folgender Zusammensetzung:

Primer-Mix A	Primer-Mix B	
12.5 μ l	12.5 μ l	Puffer (10 x, incl. 20 mM $MgCl_2$)
5.0 μ l	5.0 μ l	dNTP Mix (jeweils 10 mM)
5.0 μ l	10.0 μ l	Primer Mix A oder B
1.5 μ l	1.5 μ l	Taq-Polymerase (5 U/ μ l)
91.0 μ l	86.0 μ l	H_2O
115 μ l	115 μ l	

Jeweils 2 μ l DNA-Template wurden mit 23 μ l eines jeden Mastermixes versetzt und im Thermocycler nach folgendem Protokoll amplifiziert:

\Rightarrow Start bei 96 °C für 3 min
 \leftrightarrow Schmelzen der DNA bei 94 °C für 1 min
 \leftrightarrow Primerhybridisierung für 1,5 min bei 45 °C
 \leftrightarrow Elongation bei 72 °C für 1,5 min
 } 42 Zyklen

\rightarrow nochmalige Elongation bei 72 °C für 3 min
 \rightarrow Lagerung im Thermocycler bei 4 °C

Nach der ersten Amplifikation erfolgte eine Reamplifikation mit 2 μ l PCR-Protokoll als DNA-Template. Danach wurde zur Auftrennung der Reamplifikationsprodukte eine Gelelektrophorese wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben durchgeführt.

DNA-Array. Die vom Hersteller bereitgestellten LCD-Chips enthielten 8 Arrays mit jeweils 2 Hybridisierungsstellen für jeden HPV-Typ (genauer Aufbau siehe Abbildung 2).

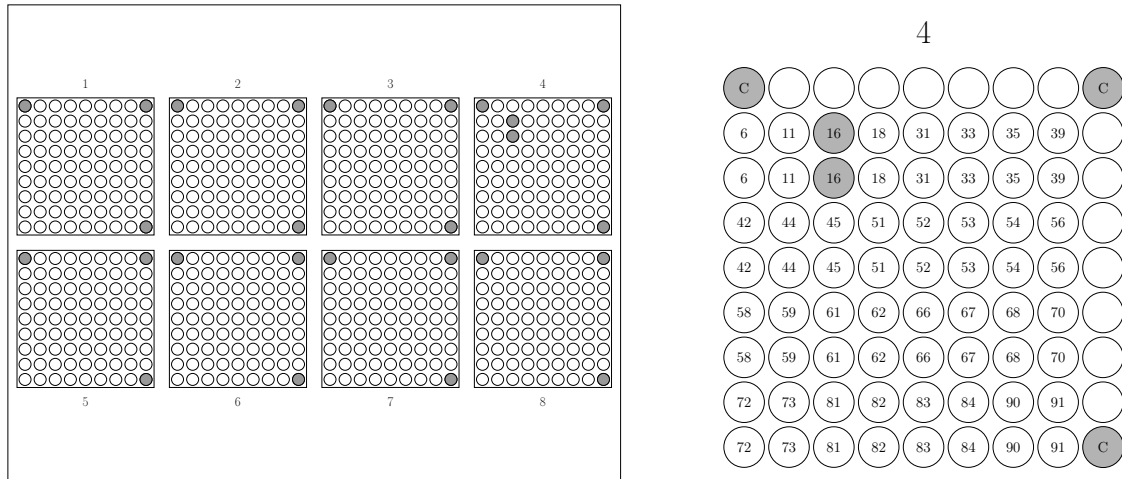


Abbildung 2: Aufbau eines LCD-Chips mit 8 Arrays und vergrößerte Darstellung eines DNA-Arrays zur HPV-Typen-Bestimmung (Exemplarisch Positivität für HPV Typ-16 auf Array 4).

Die Hybridisierung und Färbung auf dem LCD-Chip erfolgte gemäß den Hersteller-Angaben in folgenden Schritten:

1. Hybridisierung

- Erwärmen eines Wasserbades auf 35 °C
- Pipetieren von jeweils einem Tropfen Wasser in jede Ecke der Feuchtekammer
- Herstellen des Hybridisierungsmixes wie in Tabelle 9 und vorsichtiges Mischen durch Auf- und Abpipettieren
- Überführen des LCD-Chips in die bereitgestellte Feuchtekammer
- Vorsichtiges Pipettieren von jeweils 24 μl des Hybridisierungsmixes auf jedes der 8 Arrays pro LCD-Chip (ohne, dass die Pipettenspitze das Array direkt berührt)
- Zugabe von 5 μl entsprechendem PCR-Produkt aus PCR A und 5 μl entsprechendem PCR-Produkt aus PCR B in jedes der 8 Arrays
- Schließen der Feuchtekammer
- Auflegen der Feuchtekammer auf das erwärmte Wasserbad und Inkubation für 30 min bei 35 °C

- In der Zwischenzeit: Vorbereiten von drei Waschbädern mit jeweils 300 ml Waschlösung des Herstellers
- Herausnehmen des LCD-Chips aus der Feuchtekammer und Eintauchen des LCD-Chips in Waschkammer 1 für ca. 10 s, danach in Waschkammer 2 für ca. 10 s
- Inkubation des LCD-Chips in Waschkammer 3 für 1 min und anschließendes Abtropfen
- Trocknen des LCD-Chips in der vom Hersteller bereitgestellten Zentrifuge durch Zentrifugation für ca. 15 s

2. Markierung

- Herstellen des Markierungsmixes wie in Tabelle 9 und anschließendes Vortexen
- Vorsichtiges Pipettieren von 30 μ l des Markierungsmixes auf jedes Array (ohne, dass die Pipettenspitze das Array direkt berührt)
- Inkubation des LCD-Chips bei Raumtemperatur für 5 min
- Austauschen der Waschlösung in allen drei Waschbädern und Wiederholen des Wasch-Prozederes mit anschließendem Trocknen des LCD-Chips wie im Hybridisierungs-Schritt

3. Färbung

- Überführen von 300 μ l Färbelösung (*stain solution*) für 8 Arrays in ein neues Reaktionsgefäß (Vermeidung von Kontamination der Färbungslösung)
- Vorsichtiges Pipettieren von 30 μ l Färbungslösung auf jedes Array (ohne, dass die Pipettenspitze das Array direkt berührt)
- Inkubation bei Raumtemperatur für max. 3 min bis sich Typen-spezifische Spots deutlich abheben
- Spülen des LCD-Chips in der dritten Waschkammer aus dem Markierungs-Schritt
- Trocknen des LCD-Chips in der vom Hersteller bereitgestellten Zentrifuge durch Zentrifugation für ca. 15 s

Hybridisierungsmix		Markierungsmix	
220 μ l	Hybridisierungspuffer "A"	270 μ l	Dilution Buffer
20 μ l	Modulator	30 μ l	Modulator
		2 μ l	LABEL
240 μ l		302 μ l	

Tabelle 9: Zusammenstellung des Hybridisierungs- und Markierungsmixes für 8 Arrays.

Danach konnten die LCD-Chips im Analyse-Gerät ausgelesen und anschließend mehrere Monate im Dunkeln gelagert werden.

2.2.8 Nachweis mykobakterieller DNA

Die Identifikation von Mykobakterien erfolgte mittels des MYCO Direct 1.7 LCD-Array Kit von Chipron GmbH, Berlin. Nach Herstellung biotinylierter PCR-Produkte erfolgte die Hybridisierung dieser PCR-Produkte an Genus-spezifische Fängersonden auf dem DNA-Array. Daraufhin konnten gebundene PCR-Produkte Enzym-vermittelt sichtbar gemacht werden. Sowohl die Amplifizierung, Hybridisierung als auch die Sequenzierung des *pcnA*-Gens wurde zur Verifizierung der Ergebnisse jeweils einmal wiederholt. Vor der Amplifizierung erfolgte ein UNG-Verdau der isolierten DNA nach oben beschriebenen Protokoll (siehe Seite 42). Die auf diese Weise vorbehandelte DNA wurde dann direkt amplifiziert. Genutzt wurden zwei verschiedene Primer-Sets (siehe Tabelle 10):

	Genus-Mix	MTUB-Mix
Zielregion	rRNA Spacer-Region des Genus "Mycobacteria"	Element IS6110 des "MTUB"-Komplex
Größe des PCR-Produkts	225 – 265 bp	126 bp

Tabelle 10: Übersicht über die zur Bestimmung mykobakterieller DNA genutzten Primer-Sets.

PCR-Protokoll. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

- Herstellen der Mastermixe für insgesamt 4 Reaktionen wie unten aufgeführt
- Aufteilen des Mastermixes in 4 Aliquots à 23 μ l
- Hinzufügen von jeweils 2 μ l DNA-Template zu jedem Aliquot

(A) Genus-Mix	(B) MTUB-Mix	
12.5 μ l	12.5 μ l	Puffer (10 x, incl. 20 mM $MgCl_2$)
5.0 μ l	5.0 μ l	dNTP Mix (jeweils 10 mM)
5.0 μ l	5.0 μ l	Primer Mix A oder B
1.5 μ l	1.5 μ l	Taq-Polymerase (5 U/ μ l)
91.0 μ l	91.0 μ l	H_2O
115 μ l	115 μ l	

Anschließend erfolgte die Amplifikation nach folgendem Protokoll:

\Rightarrow Start bei 96 °C für 3 min
 \leftrightarrow Schmelzen der DNA bei 94 °C für 20 s
 \leftrightarrow Primerhybridisierung für 30 s bei 58 °C
 \leftrightarrow Elongation bei 72 °C für 30 s

} 35 Zyklen

\rightarrow nochmalige Elongation bei 72 °C für 3 min
 \rightarrow Lagerung im Thermocycler bei 4 °C

Nach der ersten Amplifikation erfolgte immer sofort eine Reamplifikation mit 2 μ l PCR-Produkt. Danach wurde zur Auftrennung der Reamplifikationsprodukte eine Gelelektrophorese wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben durchgeführt.

DNA-Array. Die Hybridisierung und Färbung auf dem LCD-Chip erfolgte gemäß den Hersteller-Angaben in derselben Art und Weise wie im Kapitel 2.2.7 zur Bestimmung von HPV-Typen beschrieben. Jedoch wurde pro LCD-Chip mit nur vier anstatt acht DNA-Arrays gearbeitet. Daher ergaben sich zur Herstellung des Hybridisierungs- und Markierungsmix folgende Mengenangaben:

Hybridisierungsmix		Markierungsmix	
110 μ l	Hybridisierungspuffer "A"	135 μ l	Verteilungspuffer
10 μ l	Modulator	15 μ l	Modulator
		1 μ l	LABEL
120 μ l		151 μ l	

Danach konnten die LCD-Chips im Analyse-Gerät ausgelesen und anschließend mehrere Monate im Dunkeln gelagert werden.

Sequenzierung des pcnA-Gens. Im Fall einer positiven Hybridisierungsreaktion für den MTUB-Komplex, bestimmten wir die Sequenz im pcnA-Gen der entsprechenden Probe. Dies diente der Differenzierung von *M.bovis* gegenüber anderen Vertretern des MTUB-Komplexes. Die verwendeten PCR- und Sequenzierungsprimer wurden mithilfe der Pyromark Assay Design 2.0 Software (Qiagen, Hilden), wie in Tabelle 11 angegeben, designt.

Primer	Sequenz
Vorwärtsprimer:	5'-GCAACCAAGGACTTCCACATC-3'
Rückwärtsprimer:	5'- ACGAGGAATAGTCCGGTGTGC-3'
Sequenzierungsprimer:	5'-ATCGACCCGGGTGAC-3'

Tabelle 11: PCR- und Sequenzierungsprimer für die Untersuchung des pcnA-Gens.

Mit diesen Primern erfolgte dann eine Pyrosequenzierung im PyroMark Q24 Instrument (Qiagen, Hilden) anhand der Herstellervorgaben (siehe dazu [11]). Im ersten Amplifizierungsschritt nutzen wir 50 ng DNA in 25 μ l PCR-Ansatz. Danach erfolgte die eigentliche Pyrosequenzierung mit 10 μ l PCR-Produkt.

2.2.9 Statistik

Zur statistischen Auswertung der DNA-Menge und -Reinheit von Tumor- und Infektionspräparaten wurde ein T-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Die Berechnung erfolgte in SPSS.

Die dargestellten Graphiken wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Autorin selbst in R (ggplot2) oder mithilfe von TikZ (L^AT_EX-basiert) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Verwendete Präparate

Insgesamt 44 Feuchtpräparate fanden Einzug in diese Arbeit. Dabei waren Lungen- und Hautpräparate am häufigsten vertreten. Die genaue Aufschlüsselung unterteilt nach einzelnen Krankheitsentitäten und verschiedenen Organen zeigt Abbildung 3.

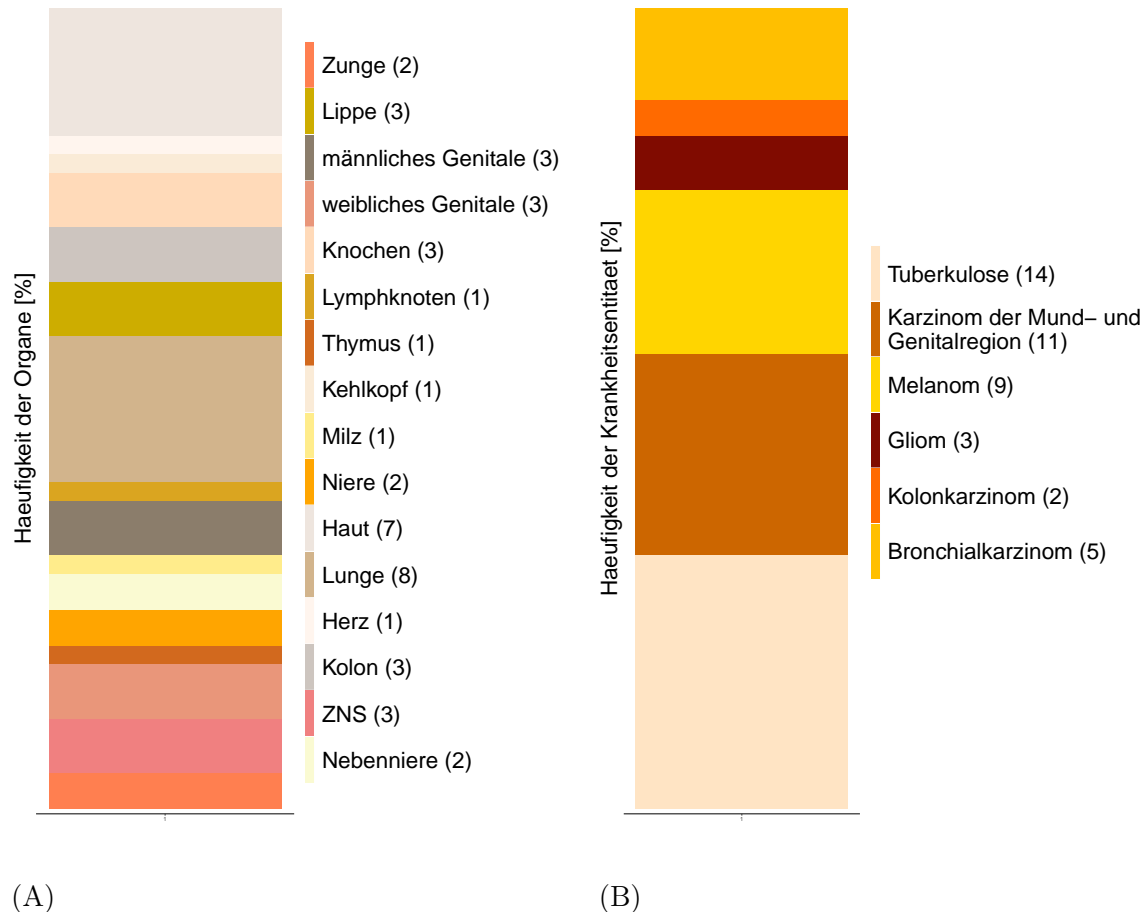


Abbildung 3: Häufigkeiten der einzelnen (A) Organ- und (B) Krankheitsentitäten innerhalb der verwendeten Feuchtpräparate. [Entität (absolute Anzahl)]

3.2 Makroskopische Aufarbeitung der Präparate

Die originalen Museumsgläser wurden nach gründlicher Reinigung beibehalten, um eine möglichst originalgetreue Darstellung der Präparate vor dem Hintergrund ihrer medizin-historischer Bedeutung zu erreichen. Die alten, schwarzen Hintergrundrahmen wurden

durchgängig durch neue, durchsichtige Plexiglasrahmen ersetzt. Dies ermöglicht dem Betrachter einen 360-Blick auf das Präparat. Weiterhin erfolgte – wo möglich – eine Anfrischung der Präparat-Schnittflächen. Dadurch wurde im Zusammenspiel mit der farbauffrischenden Wirkung der verwendeten Jores II-Konservierungslösung eine möglichst physiologische Farbgebung des Präparates wiederhergestellt. Eine Farbauffrischung konnte bereits nach 24 Stunden beobachtet werden. Neue Etiketten ersetzten die alten, teils in Sütterlinschrift handgeschriebenen, Beschriftungstafeln.



Abbildung 4: Ausgewählte Präparate vor und nach der präparatorischen Aufarbeitung.

Das Verschließen der Gläser erfolgte nach einem Vorschlag von Anders-Grünewald und Wechsler mit Bienenwachs und Kolofonium, um ein nachfolgendes Öffnen der Gläser für spätere Untersuchungen im Vergleich zur heute oft verwendeten Verschlussmethode mit Silikon zu erleichtern. Sechs Glasdeckel der insgesamt 44 verschlossenen Gläser zersprangen aufgrund der erhöhten Temperaturen im Brutschrank und mussten ersetzt werden. Fünf Gläser waren nach erstmaligem Verschließen noch undicht und mussten erneut verschlossen werden. Sonst ergaben sich keine Probleme. Langzeitdaten für die Verschlusssicherheit dieser Methoden konnten noch nicht erhoben werden.

Exemplarisch zeigt Abb. 4 das Ergebnis einiger Präparate-Aufarbeitungen an verschiedenen, für diese Studie verwendeten Präparaten.

3.3 (Immun-)Histologische Untersuchungen und Validierung der Diagnose

Von allen Präparaten wurden H&E gefärbte Paraffinschnitte zur Validierung der Diagnose angefertigt. Die Qualität der histologischen Färbungen variierte. Sie war jedoch in allen Schnitten mindestens ausreichend gut, um die Diagnose fundiert überprüfen zu können.

3.3.1 Histologische Untersuchung der Tumorpräparate.

Anhand des mikroskopischen Bildes mussten drei der insgesamt 19 Tumorpräparate mit einer neuen Diagnose versehen werden.

Dabei handelte es sich zum einen um die Präparate Nn28 und Lu176. Diese waren ursprünglich als Bronchialkarzinome gekennzeichnet worden, zeigten jedoch ein eindeutig spindelzelliges Fischgrätenmuster mit wenig kleinzelligen Anteilen und ohne Atypien. Dieses histologische Muster lässt sich besser mit einem Sarkom als mit einem Karzinom in Einklang bringen. Exemplarische Ausschnitte beider Schnitte zeigt Abb. 5.

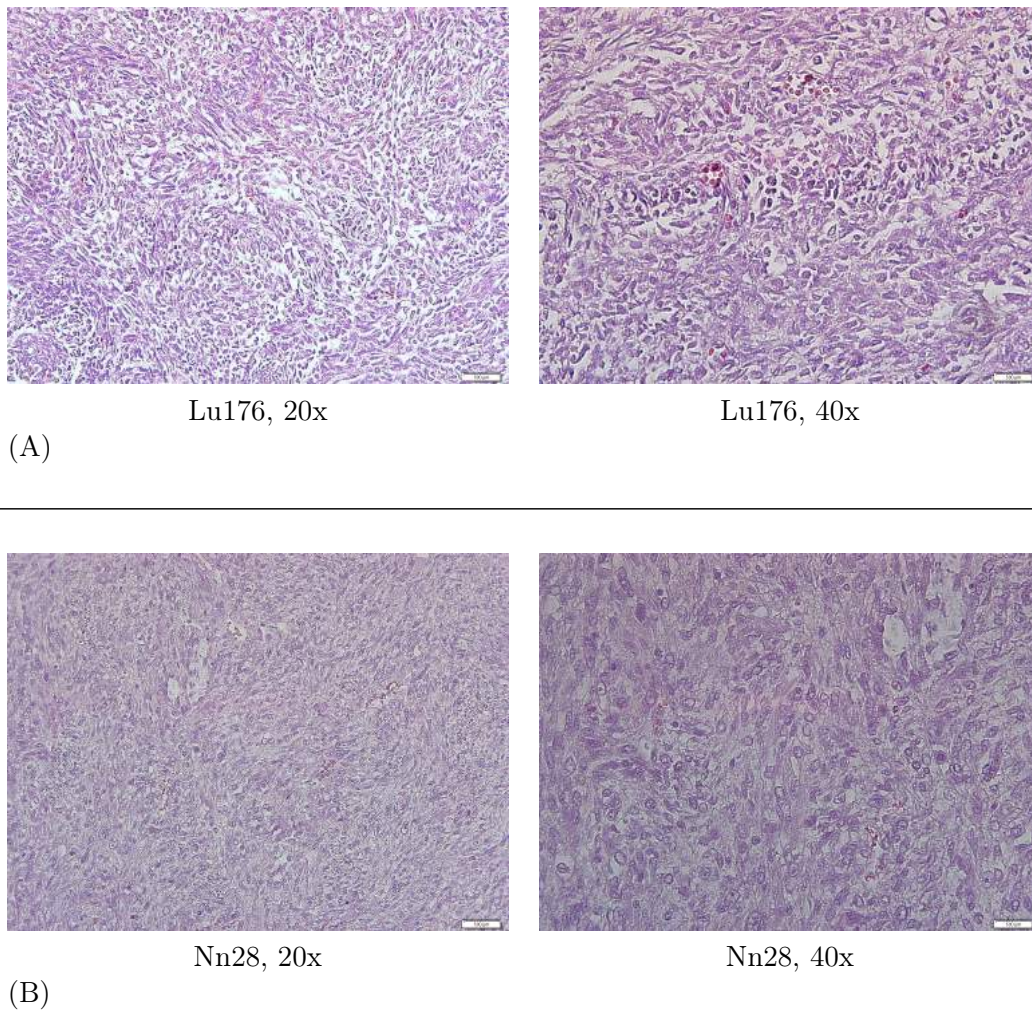


Abbildung 5: H&E Schnitte der Präparate (A) Lu176 und (B) Nn28 in jeweils 20- und 40-facher Vergrößerung.

Zum anderen zeigte das Präparat Ht32, Originaldiagnose malignes Melanom, keine atypischen Melanozyten. Dafür fanden sich jedoch atypische epitheliale Tumorzellen und Hornperlen sowie eine aufgehobene Struktur der Epidermis. Daher musste dieses Präparat zum Plattenepithelkarzinom umdiagnostiziert werden. Histologische Ausschnitte zeigt Abb. 6.

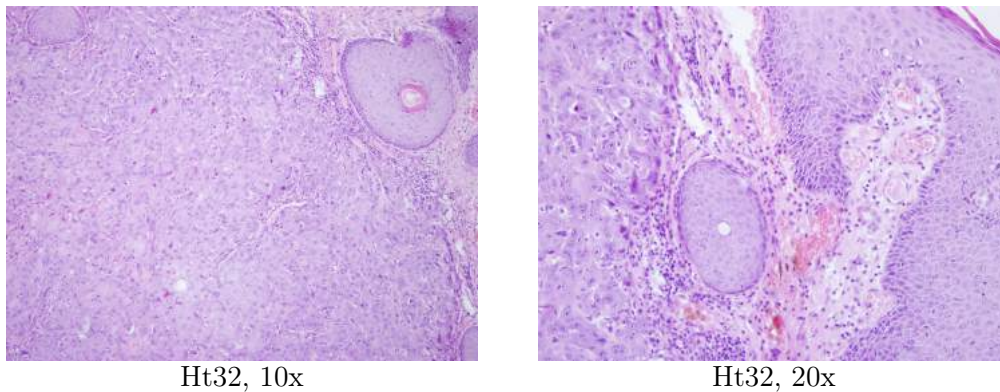


Abbildung 6: H&E Schnitte des Präparates Ht32 in 10- und 20-facher Vergrößerung.

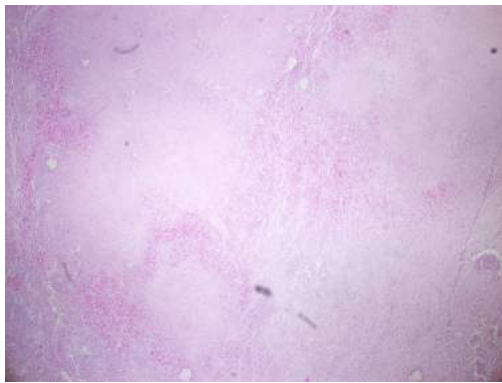
Im H&E-Schnitt des Präparates Da274 fanden sich keine Tumorzellen sondern lediglich gesundes Darmgewebe. In allen anderen Tumorpräparaten konnte die originale Diagnose anhand des histologischen Bildes bestätigt werden.

3.3.2 Histologische Untersuchungen der Infektionspräparate

H&E-Färbungen. Fast alle 25 Infektionspräparate zeigten eine gute Qualität der H&E-Schnitte, so dass eine Überprüfung der Originaldiagnose ohne Weiteres möglich war. Lediglich das Tuberkulosepräparat wGt200 war histologisch schlecht erhalten.

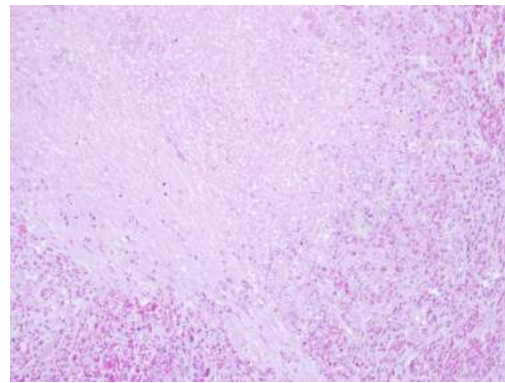
Für zehn der elf Plattenepithelkarzinome der Oropharyngeal- und Genitalregion bestätigte sich die Originaldiagnose. Im Präparat wGt151 fanden sich keine Tumorzellen, so dass die Richtigkeit der originalen Diagnose nicht überprüft werden konnte.

Die meisten Tuberkulose-Präparate präsentierten sich histologisch durch ein für die Tuberkulose typisches Bild mit entsprechenden verkäsenden Granulomen und Langerhans'schen Riesenzellen. Einige Beispiele zeigt die Abb. 7.

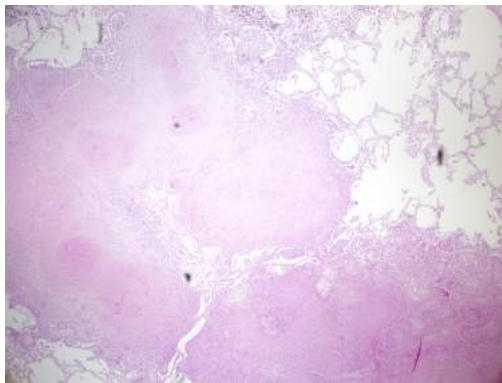


Mi133, 4x

(A)

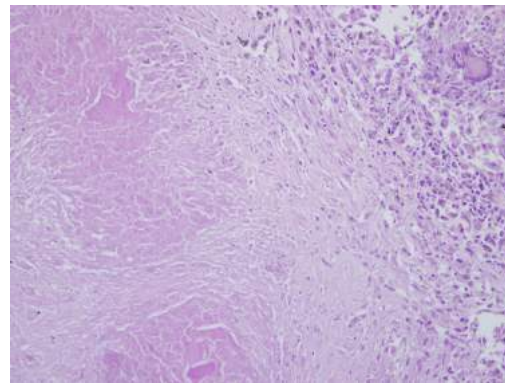


Mi133, 20x

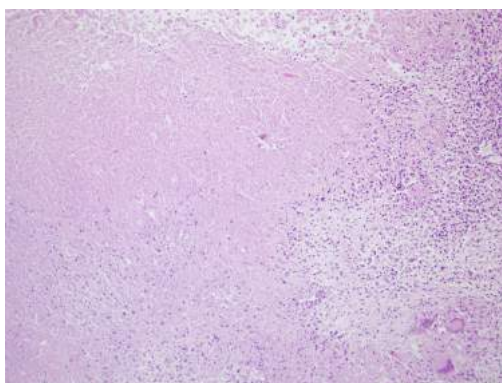


Lu180, 4x

(B)

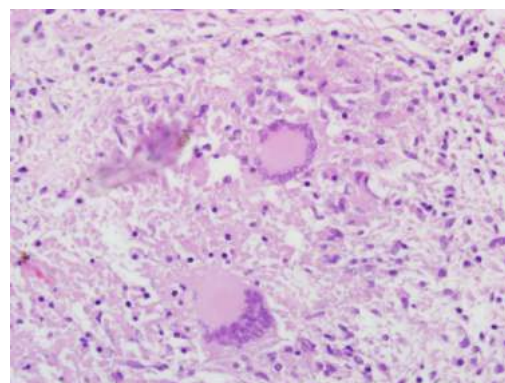


Lu180, 20x



Thy3, 10x

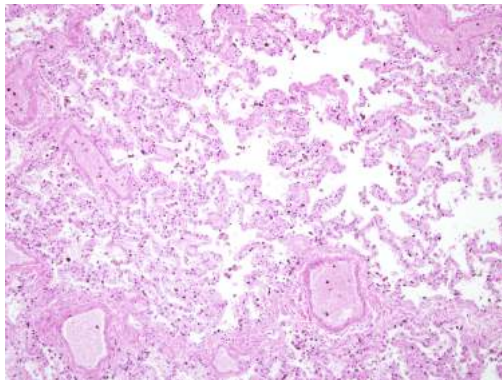
(C)



Thy3, 40x

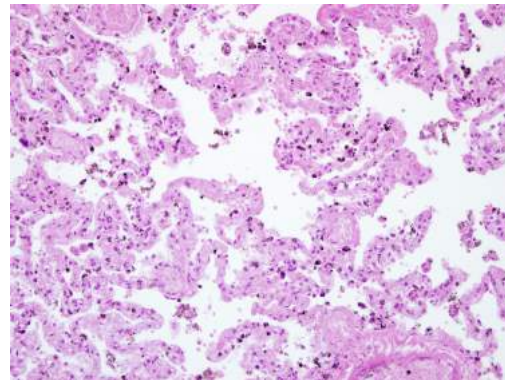
Abbildung 7: H&E Schnitte der Tuberkulosepräparate (A) Mi133, (B) Lu180 und (C) Thy3 in den jeweils angegebenen Vergrößerungen.

Jedoch konnte die Diagnose Tuberkulose in zwei Präparaten nicht einwandfrei bestätigt werden. Dabei handelte es sich zum einen um das Lungenpräparat Lu30/10, welches keinerlei Granulome oder Riesenzellen aufwies. Dafür fand sich normales, allerdings massiv blutgestautes, Lungengewebe (siehe Abb. 8). Zum anderen war das Wirbelsäulenpräparat Kn322 frei von Granulomen und Riesenzellen, zeigte jedoch das Erscheinungsbild einer unspezifischen, chronisch-lymphozytären Entzündung (siehe Abb. 8).

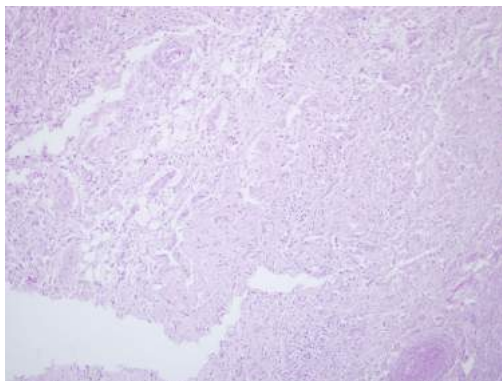


Lu30/10, 10x

(A)

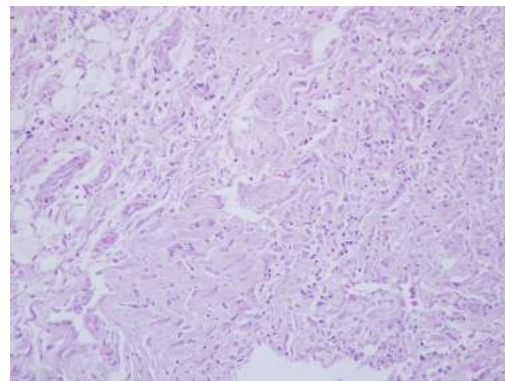


Lu30/10, 20x



Kn322, 10x

(B)



Kn322, 20x

Abbildung 8: H&E Schnitte der Tuberkulosepräparate (A) Lu30/10 und (B) Kn322 in jeweils 10- und 20-facher Vergrößerung.

Das Nierenpräparat Ni250 wies neben einem Tuberkulose-typischen Bild noch Merkmale einer bakteriellen Pyelonephritis, gekennzeichnet durch eine massive Ansammlung von

Granulozyten im Tubulussystem, auf. Daher liegt hier der Verdacht einer Misch- bzw. Superinfektion einer tuberkulösen Niere mit weiteren bakteriellen Erregern nahe (siehe Abb. 9).

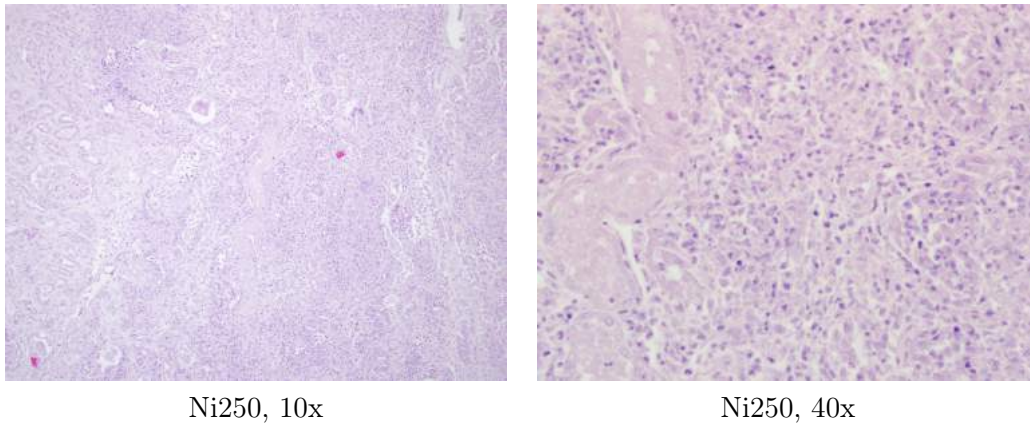


Abbildung 9: H&E Schnitte des Tuberkulosepräparate Ni250 in 10- und 40-facher Vergrößerung.

Ziehl-Neelsen- und Gram-Färbungen. Weder die durchgeführten Ziehl-Neelsen- noch die Gram-Färbungen zeigten sich ergiebig im Hinblick auf die Detektion von Bakterien. In keinem Präparat konnten säurefeste oder Gram-positive Stäbchen nachgewiesen werden. Eine Positivkontrolle konnte jeweils aufgrund fehlenden Materials im Institut nicht durchgeführt werden.

3.3.3 Immunhistologische Untersuchungsergebnisse

An sechs Tumorpräparaten wurden nach heutigen Standards immunhistologische Untersuchungen entsprechend der ursprünglichen Tumorklasse durchgeführt. Die detaillierten Ergebnisse lassen sich der Tabelle 12 entnehmen. Nur drei von insgesamt zwölf durchgeführten Färbungen zeigten eine positive Antigenität für den jeweiligen Antikörper.

Dabei handelte es sich zum einen um zwei Färbungen mit Antikörpern gegen Vimentin in den Präparaten Nn28 und Lu176. Davon präsentierte das Präparat Lu176 etwa 51 – 80 % moderat positiv gefärbte Zellen, woraus sich ein IRS von insgesamt 6 Punkten errechnete. Eine leichtgradige Antigenität war auch im Präparat Nn28 mit ca. 10 – 50 % mild angefärbter Zellen und einem IRS von 2 Punkten zu beobachten (siehe Abb. 10).

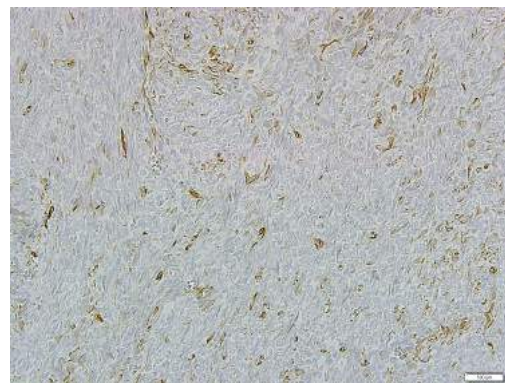
Nr.	Antikörper	positive Zellen [%]	Score	Intensität	Score	IRS	Bedeutung
Nn28	Vimentin AE1/AE3	10-50 0	2 0	mild -	1 0	2 0	mild negativ
Lu176	Vimentin	51-80	3	moderat	2	6	moderat
	AE1/AE3	0	0	-	0	0	negativ
	TTF-1	0	0	-	0	0	negativ
He146	TTF-1	0	0	-	0	0	negativ
	CD 56	0	0	-	0	0	negativ
Lu170	TTF-1	0	0	-	0	0	negativ
	AE1/AE3	0	0	-	0	0	negativ
Nn 23	TTF-1	0	0	-	0	0	negativ
	AE1/AE3	0	0	-	0	0	negativ
ZNS212	GFAP	> 80	4	moderat	2	8	moderat

Tabelle 12: Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen im Überblick.

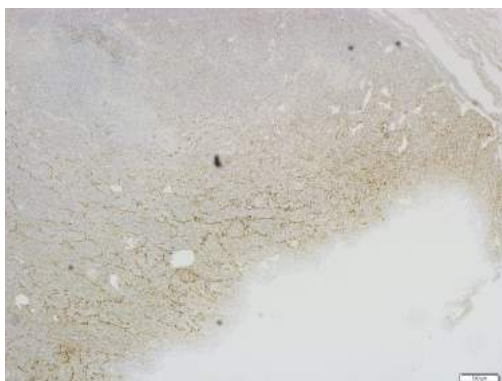


Lu176, 4x

(A)

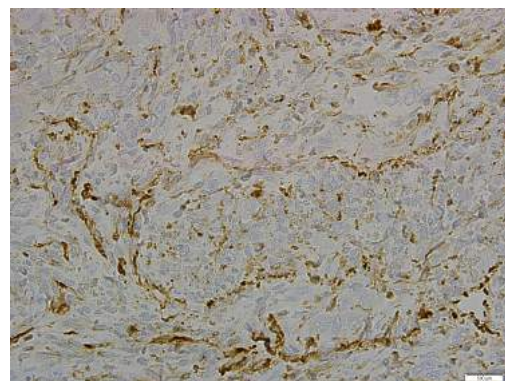


Lu176, 20x



Nn28, 4x

(B)



Nn28, 40x

Abbildung 10: Immunhistologische Färbungen⁵⁶ gegen Vimentin in den Präparaten (A) Lu176 und (B) Nn28 in den jeweils angegebenen Vergrößerungen.

Die stärkste immunhistologische Anfärbbarkeit fand sich mit Antikörpern gegen GFAP im Gliom-Präparat ZNS212 mit einem IRS von 8 Punkten. Dieser ergab sich aufgrund der großen Anzahl (über 80 %) an moderat gefärbten Zellen (siehe Abb. 11).

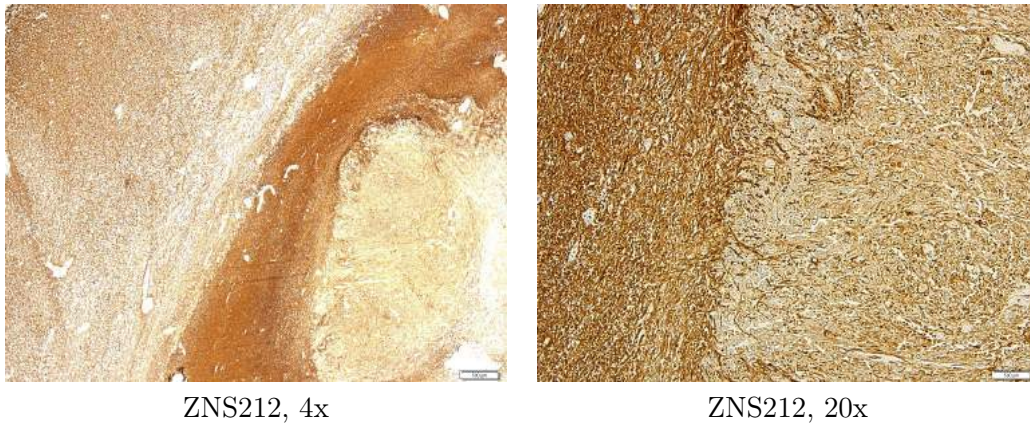


Abbildung 11: Immunhistologische Färbung gegen GFAP im Präparat ZNS212 in 4- und 20-facher Vergrößerung.

Keine der Färbungen für Zytokeratin AE1/AE3, TTF-1 oder CD56 erbrachte ein positives Ergebnis. In allen immunhistologischen Schnitten konnte zudem eine stärkere Hintergrundfärbung als in frischem Gewebe üblich beobachtet werden.

3.3.4 Validierung der Diagnose

Die ursprüngliche Bezeichnung des Präparates konnte in den meisten Fällen beibehalten werden. Lediglich für drei Präparate wurde eine Neudiagnostizierung nach histologischer Untersuchung notwendig.

- Nn28: Nebenniere mit Metastasen eines Bronchialkarzinoms → *Nebenniere mit Metastasen eines Lungsarkoms*
- Lu176: Bronchialkarzinom → *Lungsarkom*
- Ht32: Melanosarkom am Ohr → *Plattenepithelkarzinom am Ohr*

3.4 Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen

3.4.1 DNA-Isolierung

Menge und Reinheit der gewonnenen DNA. Von insgesamt 44 Präparaten erfolgte die Isolierung der DNA mittels Proteinase K-Verdau und Phenol-Chloroform-Extraktion mit Ethanol-Fällung. Dabei wurde die DNA der 19 Tumorpräparate aus Kryostatschnitten und die DNA der 25 Infektionspräparate aus Paraffinschnitten gewonnen. Aus allen Präparaten konnte DNA isoliert werden. Eine Übersicht über die gewonnene Gesamt-DNA-Menge der Probe und die DNA-Reinheit aufgeteilt nach Tumor- bzw. Infektionspräparaten gibt Abb. 12, die genauen Ergebnisse sind in den Tabellen 15 und 16 verzeichnet. Die gewonnenen Gesamt-DNA-Mengen unterschieden sich nicht-signifikant zwischen den Präparateklassen (durchschnittliche DNA-Menge der Tumorpräparate: $6,27 \mu\text{g} \pm 5,53 \mu\text{g}$ und der Infektionspräparate: $4,11 \mu\text{g} \pm 5,67 \mu\text{g}$, $p = 0,212$). Jedoch war der Unterschied in der Reinheit der isolierten DNA zwischen den Tumor- und Infektionspräparaten signifikant mit einer qualitativ hochwertigeren Reinheit der aus Paraffinschnitten gewonnenen DNA der Infektionspräparate (durchschnittliche DNA-Reinheit [gemessen mittels des Absorptionsquotient bei 260/280 nm] der Tumorpräparate: $1,45 \pm 0,11$ und der Infektionspräparate: $1,63 \pm 0,25$, $p = 0,008$).

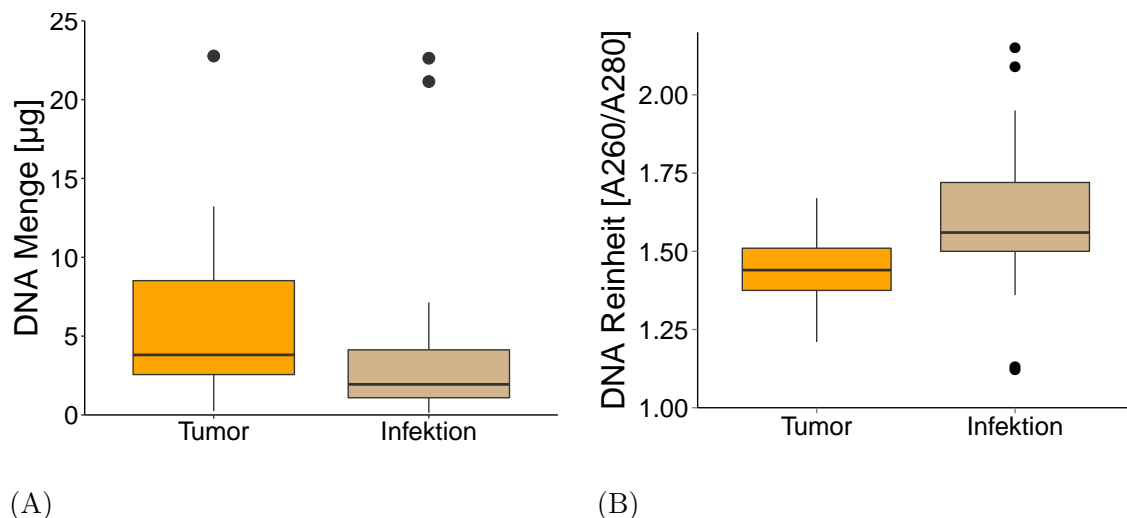


Abbildung 12: Boxplots der (A) DNA-Menge und (B) DNA-Reinheit aus den Tumor- bzw. Infektionspräparaten.

Eine hohe Menge an DNA bedeutete nicht automatisch auch eine hohe Reinheit des gewonnenen Erbmaterials. Im Gegenteil zeigte sich bei den Infektionspräparaten eine eher abnehmende Reinheit der DNA mit steigender Menge. Jedoch konnte weder bei den

Tumor- noch bei den Infektionspräparaten eine deutliche Korrelation zwischen DNA-Menge und -Reinheit gesehen werden. Der entsprechende Korrelationskoeffizient betrug für die Tumorpräparate -0,04 und für die Infektionspräparate -0,2 (siehe Abb. 13).

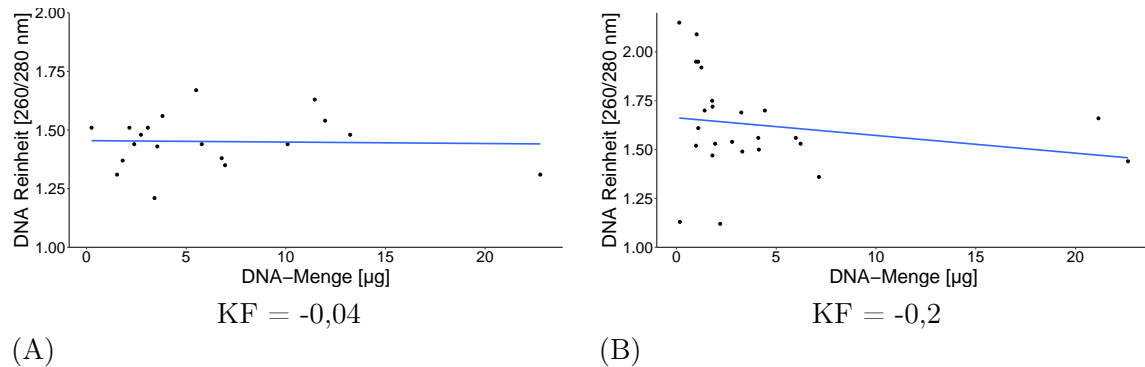


Abbildung 13: Beziehung zwischen DNA-Menge und -Reinheit der (A) Tumor- und (B) Infektionspräparate. (blaue Linie ... lineare Regressionsgerade, KF ... Korrelationskoeffizient)

Abhängigkeit der Menge und Qualität der DNA vom Präparatealter. Von nur 7/19 Tumor- und 6/25 Infektionspräparaten war das Entstehungsjahr überhaupt bekannt. Unter Betrachtung lediglich dieser Präparate zeigte sich keine Abhängigkeit zwischen dem Fixierzeitpunkt des Präparates und der Höhe der isolierten DNA-Menge. Der entsprechende Korrelationsfaktor betrug für die Tumorpräparate -0,07 und für die Infektionspräparate -0,03. Im Hinblick auf die Beziehung zwischen DNA-Reinheit und Fixierzeitpunkt präsentierten sich für die zwei verschiedenen Präparateklassen gegenläufige Trends. Für die Tumorpräparate zeigte sich: Je früher der Fixierzeitpunkt, umso niedriger der Absorptionskoeffizient der isolierten DNA. Dies verhielt sich für die Infektionspräparate genau andersherum. Der jeweilige Korrelationsfaktor errechnete sich für die Tumorpräparate mit 0,59 und für die Infektionspräparate mit -0,44. Einen Überblick gibt Abb. 14.

3.4.2 Amplifizierbarkeit der gewonnenen DNA

Detaillierte Angaben über die Amplifizierbarkeit der isolierten DNA zeigt die Tabelle 13.

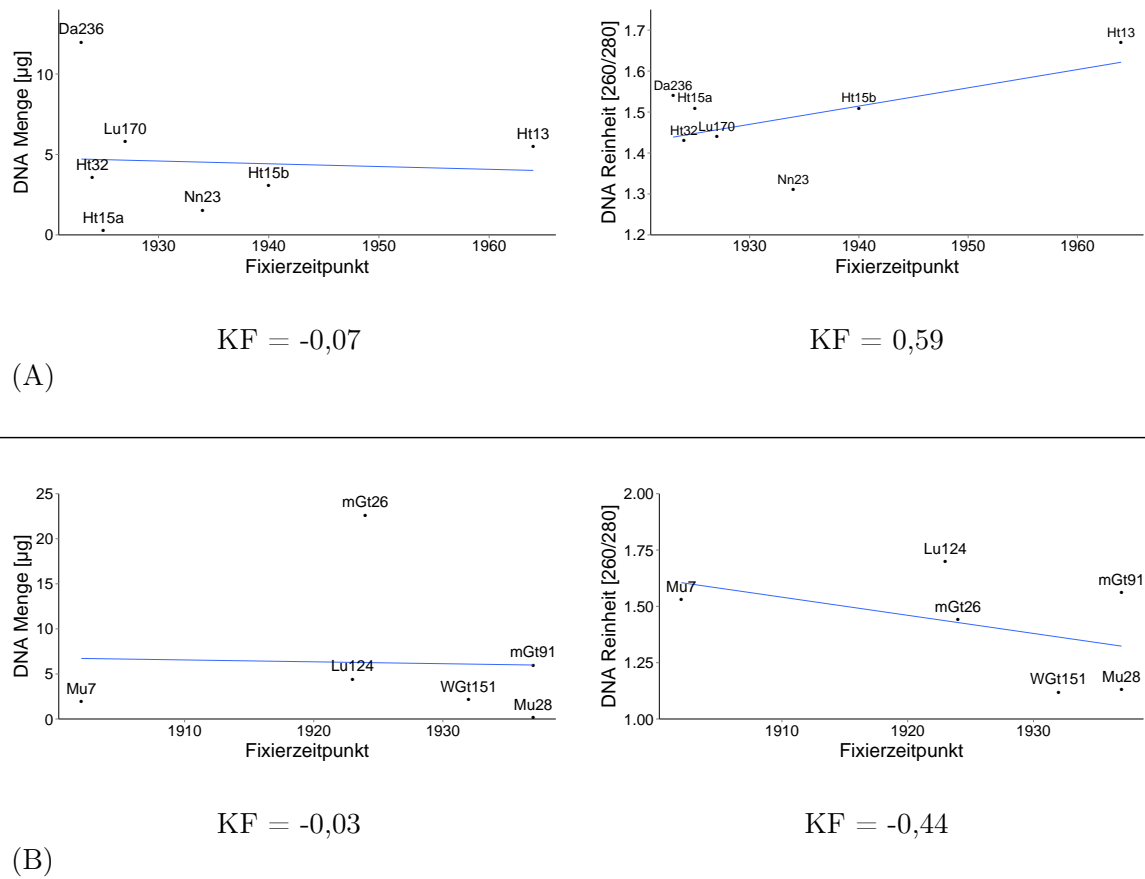


Abbildung 14: DNA-Menge und -Reinheit der (A) Tumor- und (B) Infektionspräparate in Abhängigkeit vom Fixierzeitpunkt mit Angabe des jeweiligen Korrelationsfaktors KF. (blaue Linie ... lineare Regressionsgerade; nur für Präparate mit bekanntem Fixierzeitpunkt angegeben)

Klasse	Probenanzahl	davon amplifizierbar	Länge der DNA-Sequenzen
Tumorpräparate			
EGFR	5	4	234 bp - 268 bp
KRAS	2	2	255 bp - 381 bp
BRAF	10	9	251 bp
MGMT	3	0	—
Infektionspräparate			
Tuberkulose-Präparate	14	13	126 bp - 265 bp
HPV-Präparate	11	10	125 bp - 450 bp

Tabelle 13: Erfolgsrate der DNA-Amplifizierung nach Präparateklassen.

Tumorpräparate. Pro Tumorerkrankung wurde jeweils ein Gen auf seine Amplifizierbarkeit und mögliche Mutationen in der Sequenz überprüft. Lediglich für das Präparat Nn23 wurden zwei verschiedene Gene (EGFR und BRAF) untersucht, da es zwar als Metastase eines Bronchialkarzinoms gekennzeichnet war, jedoch auch eine auffällig schwarze Färbung ähnlich der eines Melanoms aufwies. Insgesamt zeigte sich eine Amplifizierbarkeit des EGFR-Gens in 4/5 Präparaten, des KRAS-Gens in 2/2 Präparaten und des BRAF-Gens in 9/10 Fällen. Die DNA von keinem der drei auf MGMT-Promotor-Methylierung getesteten Gliom-Präparate war mit den verwendeten Methoden amplifizierbar. Damit ergab sich eine Gesamterfolgsquote innerhalb der Tumorpräparate von 75 % mit 15/20 amplifizierbaren DNA-Proben.

Infektionspräparate. Die DNA aus insgesamt 23/25 Infektionspräparaten lies sich mit den verwendeten Methoden amplifizieren. Lediglich die DNA der Präparate Mu31 und Ni34 konnte nicht weiterverwendet werden. Die Erfolgsquote innerhalb der Infektionspräparate lag damit bei ca. 92 %.

3.4.3 Ergebnisse der Mutationsanalysen

EGFR im Bronchialkarzinom. Insgesamt fünf Präparate wurden aufgrund ihrer originalen Bezeichnung als Bronchialkarzinom auf das EGFR-Gen Exon 18-21 getestet. Die entstandenen PCR-Fragmente der vier Exons waren zwischen 158 bp und 268 bp lang. Lediglich die DNA des Präparates He146, Metastase eines Bronchialkarzinoms im Herzmuskel, war nicht amplifizierbar. Von den anderen vier Präparaten zeigte keines in der Sanger-Sequenzierung eine Mutation. Alle Sequenzen entsprachen damit dem Wildtyp.

KRAS im Kolonkarzinom. Von beiden auf KRAS Exon 2-4 getesteten Kolonkarzinom-Präparaten lies sich die gewonnene DNA amplifizieren und sequenzieren. Die entstandenen PCR-Fragmente hatten eine Länge zwischen 255 bp und 381 bp.

Interessanterweise zeigte das Präparat Da236 von 1923 eine Punktmutation an der Stelle 96 mit Substitution von Guanin durch Adenin (siehe Abb. 15). Das Originaltriplett G-G-T wurde so zu G-A-T verändert. Dies ruft eine Substitution von Glycin (G) durch Asparaginsäure (D) an Position 12 hervor und wird damit als G12D Mutation klassifiziert.

Die Sequenz des zweiten Präparat Da274 entsprach dem Wildtyp.

BRAF im Melanom. Zehn als Melanom gekennzeichnete Präparate wurden auf das BRAF-Gen Exon 15 getestet. Das entsprechende PCR-Fragment hatte eine Länge von 251 bp. Von insgesamt neun Präparaten war die isolierte DNA amplifizierbar. Die Sequenz von sieben Präparaten entsprach dabei dem Wildtyp.

Im Präparat Ht13 wurde ein Austausch der Base Thymin durch Adenosin sichtbar. Diese Substitution führt zu einer Änderung des Codon 600 von G-T-G zu G-A-G, was wiederum den Austausch der Aminosäure Valin (V) mit Glutamat (E) hervorruft. Diese Mutation kann daher als V600E bezeichnet werden (siehe Abb. 15). Eine weitere V600E-Mutation konnte im Präparat Ht9b ebenfalls durch die Substitution von Thymin durch Adenosin gefunden werden.

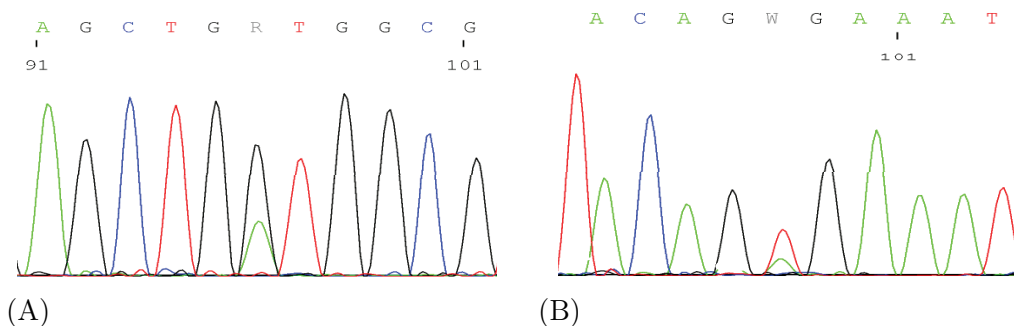


Abbildung 15: Elektropherogramm des (A) KRAS-Gens im Präparat Da236 (G12D) und (B) des BRAF-Gens im Präparat Ht13 (V600E).

Untersuchung der MGMT-Promotormethylierung im Gliom. In allen drei getesteten Gliom-Präparaten lies sich weder das MGMT-Gen noch das als endogene Kontrolle verwendete COL2A1-Gen amplifizieren. Somit war eine Untersuchung des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus nicht möglich. Das Versagen der Methode in unseren drei Präparaten kann nicht auf technische Fehler zurückgeführt werden, da die Amplifikation des MGMT- als auch des COL2A1-Gens in der mitgeführten Positivkontrolle einwandfrei funktionierte.

3.4.4 Nachweis viraler DNA des Humanen Papillomavirus

Insgesamt elf verschiedene Präparate wurden mit Hilfe des HPV Type 3.5 LCD-Array Kit auf das Vorhandensein von viraler DNA des humanen Papillomavirus getestet. Getestet wurden Plattenepithelkarzinome der Oropharyngeal- bzw. Genitalregion aufgrund deren

möglicher pathogenetischer Assoziation mit HPV. Die DNA von zehn dieser Präparate war mit den verwendeten Primern unter Entstehung von ca. 450 bp und ca. 125 bp langen PCR-Fragmenten amplifizierbar. Die Amplifikation der DNA des Präparates Mu31 gelang nicht.

Von den verbleibenden zehn Präparaten zeigten acht eine positive Hybridisierung auf den entsprechenden Array-Hybridisierungsstellen für HPV Typ-16. Die Fälle Mu7 und Mu10 präsentierten dabei lediglich ein schwaches Signal, welches jedoch noch als positiv gewertet werden konnte. Andere HPV-Typen außer HPV Typ-16 konnten in keinem Präparat nachgewiesen werden. Die Präparate Mu17 und Mu37 zeigten generell keine Positivität für HPV. In der Tabelle 16 sind die Ergebnisse im Detail verzeichnet. Alle Reaktionen können als verwertbar angesehen werden, da die vom Hersteller bereitgestellten drei Kontrollpunkte pro Array jeweils positiv wurden. Abb. 16 zeigt beispielhaft die LCD-Arrays der Präparate Mu7, Mu28 und Md40.

Hinsichtlich der Lokalisation des Karzinoms konnten in der verwendeten Gruppe oropharyngeale von genitalen Tumoren unterschieden werden. Die Assoziation der genitalen Karzinome ($n=4$) mit HPV betrug 100 %, die der oropharyngealen ($n=6$) Neoplasien 66,7 %.

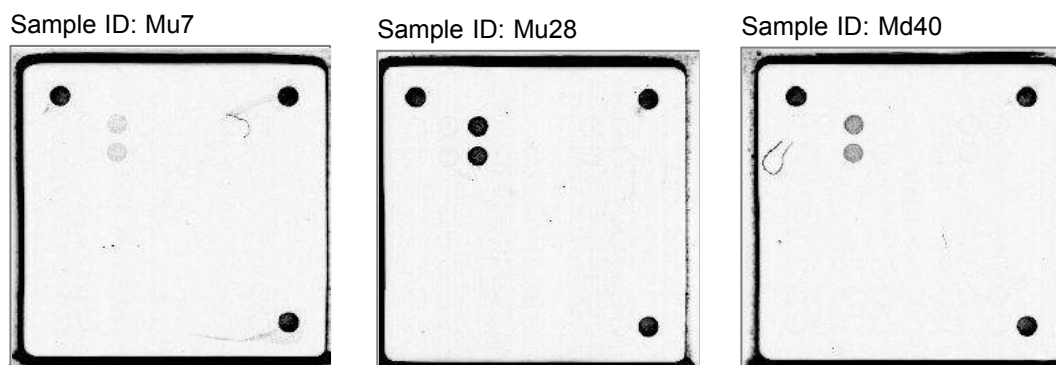


Abbildung 16: Ergebnisse der HPV LCD-Arrays für die Präparate Mu7, Mu28 und Md40.

3.4.5 Nachweis mykobakterieller DNA

Die Untersuchung der DNA aus den Tuberkulose-Präparaten erfolgte mittels Hybridisierung auf MYCO Direct 1.7 LCD-Arrays. Für 13 der 14 getesteten Tuberkulose-Präparate konnten vorher DNA-Fragmente mit einer Länge von 126 bp bzw. 225 - 265 bp amplifiziert werden. Lediglich die DNA des Präparates Ni34 ergab keine PCR-Produkte. In allen amplifizierbaren Proben konnte mykobakterielle DNA nachgewiesen werden. Dabei

handelte es sich entweder um DNA des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes (MTUB), *Mycobacterium avium*-Komplexes (MAC) oder *Mycobacterium other than tuberculosis*-Komplexes (MOT). MTUB konnte viermal detektiert werden, davon zweimal in Kombination mit MOT. Zusätzlich dazu wurde MOT noch in acht weiteren Präparaten nachgewiesen. MAC fand sich nur im Präparat Ke3. Eine Übersicht gibt Tabelle 14.

Präparat	DNA amplifizierbar	Mykobakterium-Spezies
Lu7.2	+	MOT
Lu30/10	+	MOT
Lu124	+	MTUB
Lu145	+	MTUB, MOT
Lu180	+	MOT
Lu217	+	MTUB
Kn322	+	MOT
Ni34	-	–
Ni250	+	MOT
Mi133	+	MOT
Thy3	+	MOT
Ke3	+	MAC
Gf122	+	MTUB, MOT
wGt200	+	MOT

Tabelle 14: Übersicht über Spezies-Zuordnung der isolierten mykobakteriellen DNA.

Wie bei den HPV-Arrays können auch hier alle Reaktionen als verwertbar angesehen werden, da die vom Hersteller bereitgestellten drei Kontrollpunkte pro Array jeweils positiv wurden (Beispiel-Arrays siehe Abb. 17).

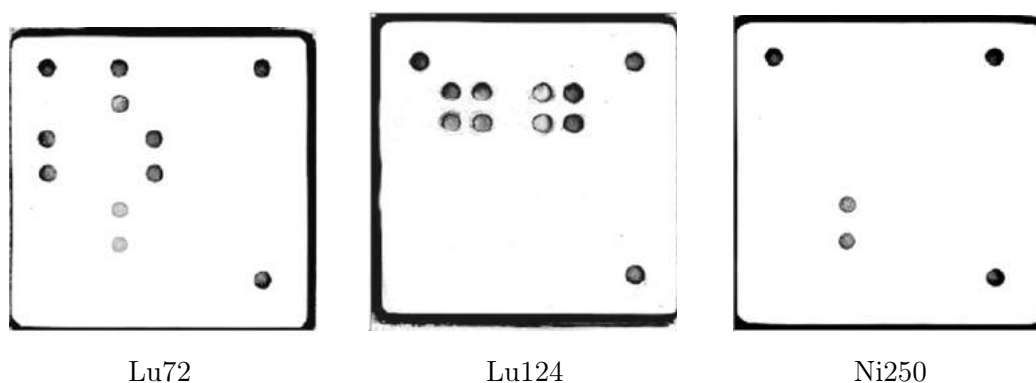


Abbildung 17: Ergebnisse der MYCO Direct 1.7 LCD-Arrays für die Präparate Lu7.2, Lu124 und Ni250.

Sequenzierung des *pncA* Gens. Vier unserer Tuberkulose-Präparate (Lu124, Lu145, Lu217 und Gf122) kamen aufgrund ihrer Positivität für den MTUB-Komplex für die Sequenzierung des *pcnA*-Gens in Frage. Dabei war für die Präparate Lu124, Lu217 and Gf122 die PCR erfolgreich. Die DNA des Präparates Lu145 konnte im PyroMark-Instrument nicht amplifiziert werden. In keiner der drei amplifizierbaren Proben zeigte sich die fragliche Mutation im Nukleotid 169 (C>G). Somit konnte *M. bovis* für diese drei Präparate ausgeschlossen werden.

3.5 Übersicht über die Untersuchungsergebnisse

Eine detaillierte Übersicht über die Untersuchungsergebnisse getrennt nach Tumor- und Infektionspräparaten zeigen die Tabellen 15 und 16.

Molekulargenetische Ergebnisse der Tumorpräparate

	Nr.	Originale Bezeichnung	DNA-Menge [μ g]	A260/A280	Gen	Amplif.	Sequenz.	Immun.	IRS	Validierte Diagnose
1	Nn28	Nebennieren mit Metastasen eines Bronchialkarzinoms	3,81	1,56	EGFR	+	wt	Vimentin AE1/AE3	2 0	Metastase eines Lungsarkom
2	Lu176	Bronchialkarzinom	2,73	1,48	EGFR	+	wt	Vimentin AE1/AE3 TTF-1	6 0 0	Lungsarkom
3	Lu170	Bronchialkarzinom und chronische Pneumonie	5,78	1,44	EGFR	+	wt	TTF-1 AE1/AE3	0 0	Bronchial-Ca
4	Nn23	Metastase eines Bronchialkarzinoms	1,53	1,31	EGFR BRAF	+	wt	TTF-1 AE1/AE3	0 0	Metastase eines Bronchial-Ca
5	He146	Metastase eines Bronchialkarzinoms	2,15	1,51	EGFR	-	-	TTF-1 CD56	0 0	Metastase eines Bronchial-Ca
6	Da236	Karzinom des Colon transversum	11,97	1,54	KRAS	+	G12D			Kolon-Ca
7	Da274	Stenosierendes Kolonkarzinom	6,78	1,38	KRAS	+	wt			Kolon-Ca
8	ZNS33	Glioblastoma multiforme	22,77	1,31	MGMT	-	-			Glioblastom
9	ZNS270	Glioblastoma multiforme	2,39	1,44	MGMT	-	-			Glioblastom
10	ZNS212	Stiftgliom	1,81	1,37	MGMT	-	-	GFAP	8	Pilozytisches Astrozytom
11	Da183	Metastase eines Melanosarkoms	6,95	1,35	BRAF	+	wt			Metastase eines malignen Melanoms
12	Ht60	Melanosarkom des Fußrückens	11,45	1,63	BRAF	+	wt			malignes Melanom
13	Ht13	Kutanes Melanom	5,5	1,67	BRAF	+	V600E			malignes Melanom
14	HT9b	Melanomaligom	10,09	1,44	BRAF	+	V600E			malignes Melanom
15	WGt45	Melanosarkom-Metastasen	3,41	1,21	BRAF	-	-			Metastase eines malignen Melanoms
16	Ht15b	Malignes Melanom	3,07	1,51	BRAF	+	wt			malignes Melanom

17	Ht3	Melanosarkom	13,23	1,48	BRAF	+	wt		malignes Melanom
18	Ht15a	Melanosarkom	0,25	1,51	BRAF	+	wt		malignes Melanom
19	<i>Ht32</i>	<i>Melanosarkom am Ohr</i>	3,55	1,43	BRAF	+	wt		<i>Plattenepithelkarzinom</i>

Tabelle 15: Ergebnisse der molekulargenetischen, histologischen und immunhistologischen Untersuchungen an den Tumorpräparaten. Kursiv hervorgehoben wurden die neu-validierten geänderten Diagnosen. (Ca ... Karzinom, A260/A280 ... DNA-Reinheit, Amplif. ... Amplifizierbarkeit, Sequenz. ... Sequenzierung, Immun. ... Immunhistologie)

Molekulargenetische Ergebnisse der Infektionspräparate

	Nr.	Originale Bezeichnung	DNA-Menge [μ g]	A260/A280	Untersucht auf ...	Amplif.	Nachweis von ...
1	WGt151	Zervixkarzinom	2,19	1,12	HPV	+	HPV Typ-16
2	mGt26	Peniskarzinom	22,63	1,44	HPV	+	HPV Typ-16
3	Mu28	Lippenkarzinom	0,17	1,13	HPV	+	HPV Typ-16
4	Mu7	Oberkieferkarzinom	1,94	1,53	HPV	+	HPV Typ-16 (schwach)
5	Md40	Karzinom des Zungengrundes	1,8	1,47	HPV	+	HPV Typ-16
6	Mu17	Karzinom der Lippe	6,22	1,53	HPV	+	–
7	Mu10	Kieferkarzinom	0,98	1,52	HPV	+	HPV Typ-16 (schwach)
8	Mu37	Lippenkarzinom	2,79	1,54	HPV	+	–
9	Mu31	Zungenkarzinom	3,3	1,49	HPV	–	–
10	mGt103	Peniskarzinom	21,15	1,66	HPV	+	HPV Typ-16
11	mGt91	Peniskarzinom	5,98	1,56	HPV	+	HPV Typ-16
12	Ni34	Nierentuberkulose	1,25	1,92	Mykobakterien	–	–
13	Mi133	Miliartuberkulose der Milz	7,14	1,36	Mykobakterien	+	MOT
14	Ke3	Tuberkulose im Kehlkopf	1,01	2,09	Mykobakterien	+	MAC
15	Thy3	Tuberkulose im Thymus	1,79	1,75	Mykobakterien	+	MOT
16	Gf122	Thrombose der Vv. iliacae et V. cava inf. bei Lymphknotentuberkulose	1,09	1,95	Mykobakterien	+	MTUB, MOT
17	Lu7.2	Käsige Pneumonie und Aussaat beim Kind	4,13	1,5	Mykobakterien	+	MOT
18	Lu124	Tuberkulose-Empyem	4,43	1,7	Mykobakterien	+	MTUB

19	Lu145	Steinhauerlunge / Oberlappen-Tuberkulose	0,98	1.95	Mykobakterien	+	MOT, MTUB
20	Lu30/10	Tuberkulose	1,81	1,72	Mykobakterien	+	MOT
21	Kn322	Ausgedehnte käsige Tuberkulose der Wirbelsäule	1,41	1,7	Mykobakterien	+	MOT
22	wGt200	Tuberkulose des Uterus und der Vagina	1,09	1,61	Mykobakterien	+	MOT
23	Lu180	Großknotige Miliartuberkulose	4,1	1,56	Mykobakterien	+	MOT
24	Ni250	Käsige Tuberkulose des Nierenparenchyms	0,14	2,15	Mykobakterien	+	MOT
25	Lu217	Kavernös-zirrhotische Tuberkulose	3,25	1,69	Mykobakterien	+	MTUB

Tabelle 16: Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen an den Infektionspräparaten. (A260/A280 ...DNA-Reinheit, Amplif. ... Amplifizierbarkeit)

4 Diskussion

Da nur noch weniger als 20 pathologische Universitätsammlungen in Deutschland existieren [52], ist die aktive Erhaltung der verbliebenen Sammlungen zu Lehr- und Forschungszwecken sowie aus wissenschaftshistorischen Gründen erstrebenswert. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Öffnung dieses großen Fundus an menschlichem Material für histologische und molekulargenetische Untersuchungen einen realistischen Weg darstellt, die Existenzberichtigung solcher Sammlungen in der heutigen Zeit zu begründen.

4.1 Ausgewählte Präparate und Krankheitsentitäten

In die vorliegende Studie wurden 44 Präparate der Klassen „Tumorpräparate“ und „Infektionspräparate“ aufgenommen. Anhand der Auswahl der Präparate wird deutlich, dass der Bestand einer pathologischen Sammlung einen Bogen von historisch relevanten Krankheiten zu aktuell weit verbreiteten Pathologien spannen kann¹¹.

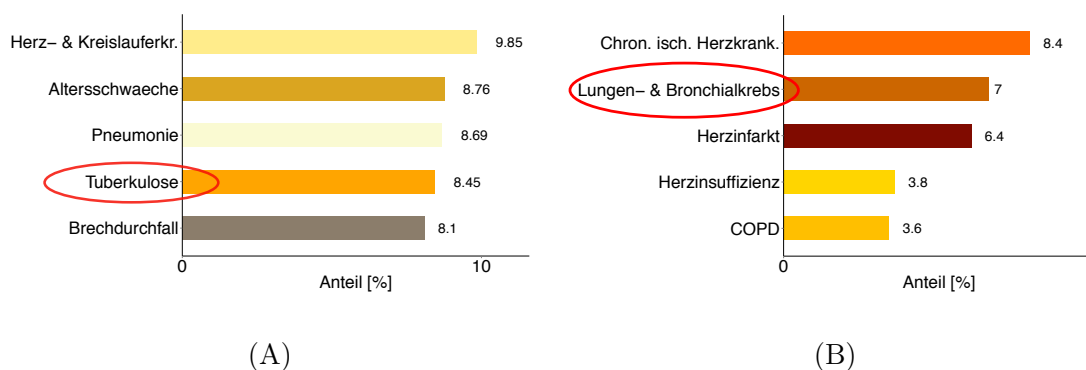


Abbildung 18: Die fünf häufigsten Todesursachen 1916 (A) und 2014 (B) unter Männern in Deutschland im Vergleich (rot markiert ... Vertreter dieser Entität fanden Eingang in diese Arbeit), nach (A) [9], S. 478f. und (B) [2].

Innerhalb der letzten 100 Jahre wurden Infektionskrankheiten als häufige Todesursache immer mehr durch Tumorleiden abgelöst (siehe Abb. 18). So stehen maligne Erkrankungen heute an zweiter Stelle der häufigsten Todesursachen in Deutschland [19]. Drei der häufig zum Tode führenden Krebserkrankungen fanden Eingang in diese Arbeit¹².

¹¹Diese Aussage bezieht sich auf die gesellschaftliche Relevanz von Krankheitsentitäten in der Region der Sammlung. In anderen Regionen der Erde können selbstverständlich andere Verbreitungsmuster vorliegen.

¹²Die zehn häufigsten Krebs-Todesursachen nach Primärorgan sind: Lunge & Bronchien (19,5 %), Mamma (7,7 %), Kolon (7,3 %), Pankreas (7,2 %), ohne Lokalisationsangabe (4,2 %), Leber &

Wie aus Abb. 18 ersichtlich, finden sich in dieser Studie jeweils Vertreter der häufigsten Todesursachen von Männern in Deutschland im Jahre 1916 (Tuberkulose) und 2014 (Lungen- und Bronchialkrebs). Es wird deutlich, dass in einer pathologischen Sammlung, auch wenn sie aus der ersten Hälfte des vorherigen Jahrhunderts stammt, aktuell relevante Erkrankungen erforscht werden können. Ebenfalls eignet sich eine historische Sammlung zur Exploration der heute seltener gewordenen Pathologien wie der Tuberkulose, da sie aufgrund ihres Entstehungszeitraumes weit mehr Präparate in späteren Krankheitsstadien, als glücklicherweise heutzutage üblich, enthält.

4.2 Makroskopische Bearbeitung der Präparate

Die Restauration der verwendeten pathologischen Feuchtpräparate erfolgte unter der Maßgabe, sie wieder einer fachlichen Öffentlichkeit zugänglich zu machen. Bei der Aufarbeitung historischer Präparate muss eine Balance zwischen *Erhalt des historischen Zeugnisses* und *Anpassen des Präparates an moderne Standards* gefunden werden. Ausdrückliches Ziel dieser Arbeit war es, die alten Präparate nach modernen medizinischen und ästhetischen Standards aufzuarbeiten, um den Studierenden und Forschern den Umgang mit ihnen zu erleichtern. Dazu wurden die alten Gläser beibehalten, die schwarzen Rahmen jedoch durch durchsichtige Plexiglasscheiben ersetzt. Weiterhin ersetzen nun gedruckte Schilder die alten (teils handschriftlichen und für in Sütterlinschrift Ungeübte schwer lesbare) Beschriftungen.

4.2.1 Auswirkungen der Biopsieentnahme auf den Gesamteindruck

Die Zahl der Präparate in pathologischen Sammlungen ist endlich und diese sind oft nicht mehr zu ersetzen¹³. Daher sollte die Forschung an Sammlungspräparaten bedacht erfolgen, um möglichst viel Material für kommende Generationen zu erhalten. Außerdem darf durch die Biopsieentnahme das äußere Erscheinungsbild des Präparates nicht zerstört werden. Daher erfolgte die Entnahme an nicht direkt ersichtlichen Stellen, die die entsprechende Pathologie trotzdem erfassen. Bei diesem Vorgehen besteht jedoch die Gefahr, eine nicht-repräsentative Stelle des Präparates zu treffen und so eventuell in der Histologie falsch-negative Ergebnisse zu erzielen. Dies könnte eine Erklärung für die fehlenden Tumorzellen in den Präparaten wGt151 und Da274 sein.

intrahepatische Gallenwege (3,3 %), Rektum (3,3 %), Gehirn (2,6 %) und Harnblase (2,5 %) [2]. Vertreter der rot-markierten Entitäten fanden Eingang in diese Arbeit.

¹³Zum einen, weil sich aufgrund des medizinischen Fortschritts bestimmte Krankheitsstadien nur noch sehr selten ausbilden, zum anderen aufgrund der rückläufigen Sektions- und Präparationskultur.

4.3 (Immun-)histologische Diagnoseverifizierung

4.3.1 Notwendigkeit der Diagnoseverifizierung

Am Anfang von Forschung und Lehre mit alten Sammlungspräparaten muss die histologische Diagnoseverifizierung stehen, damit die weitere Arbeit mit dem Präparat nicht auf einer heute unhaltbaren Grundannahme fußt. Von den hier untersuchten 44 Präparaten mussten drei aufgrund der Histologie in ihrer Diagnose abgeändert werden. Dies entspricht einer Quote von rund 7 % und zeigt die Dringlichkeit der vorhergehenden Diagnoseverifizierung. Auch andere Autoren konnten zeigen, dass Präparate in pathologischen Sammlungen in der Mehrzahl der Fälle zwar nach heutigen Standards „richtig“ klassifiziert sind. Jedoch finden sich in nicht zu vernachlässigender Zahl immer wieder einzelne Präparate mit abweichenden Bezeichnungen.

Dies fiel schon 1926 Herbert Fox sowie seinem Nachfolger Poston bei ihren Untersuchungen an originalen Lymphom-Präparaten von Thomas Hodgkin auf (siehe dazu auch Kapitel 1.3.2 auf Seite 17) [68,88]. Deren Befunde sind exemplarisch für den Fortgang der Medizin und die Notwendigkeit, Diagnosen an aktuelle Standards anzupassen. Als Hodgkin 1832 seine Präparate vorstellte, verzichtete er auf histologische Untersuchungen [44]. Auch als 1865 der Name *Hodgkin'sche Krankheit* von Samuel Wilks vorgeschlagen wurde, wurden keine histologischen Untersuchungen angefertigt [101]. Die Unterscheidung in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphom wurde mikroskopisch erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts durch Reed und Sternberg eingeführt [69,86], so dass eine Einordnung in diese Klassen vorher nicht möglich war und damit von den heutigen Nutzern einer Sammlung nachträglich getroffen werden muss. Sedivy und Patzak untersuchten elf Pankreas-Präparate mittels H&E-Färbung und konnten vier Präparaten neue Diagnosen zuordnen. Dies entspricht einer Quote von sogar 36 %¹⁴.

In Zusammenschau mit unseren Befunden verdeutlichen diese Beispiele die Notwendigkeit, abweichend diagnostizierte Präparate bei einer ersten histologischen Sichtung zu finden und umzubenennen. Nur so können nachfolgende Schritte gezielt und korrekt ausgeführt werden und es ist weiterhin eine nach heutigem Wissen korrekte Lehre für Studenten möglich.

¹⁴In zwei Fällen (MN 1937 und MN 1943) handelte es sich um duktales Adenocarcinome, wobei die originalen Diagnosen eine nicht-maligne Pathologie ausgaben (Originale Diagnosen lauteten MN 1937: *Hydrops ductus Wirsingiani* und MN 1943: *Cystadenoma pancreatis*). In zwei weiteren Fällen hielten die Autoren einen neuroendokrinen Tumor (MN 3494, Originale Diagnose: *Carcinoma solidum capitis pancreatis subsequente hydrope ductus Wirsingiani*) sowie einen solid-pseudopapillären Pankreastumor (MN 2757, Originale Diagnose: *Carcinoma scirrhosum capitis pancreatis*) für die wahrscheinlichste Diagnose. Beide Pathologien waren zum Zeitpunkt der Präparatherstellung noch nicht beschrieben [80].

4.3.2 Durchführbarkeit histologischer Färbungen

H&E-Schnitte. Histologische Untersuchungen im H&E-Schnitt konnten in dieser Studie in einer guten Qualität durchgeführt werden. Lediglich die mikroskopische Struktur des Präparates wGt200 war schlecht bis gar nicht erhalten. Von diesem Präparat ist der Entstehungszeitraum nicht bekannt. Es zeigte sich jedoch auch bei den Präparaten mit bekannten Fixierzeitpunkten keine Korrelation zwischen Alter der Präparate und Qualität der histologischen Schnitte. Unsere Beobachtungen über die erstaunlich gut erhaltene mikroskopische Struktur der alten Sammlungspräparate teilen auch Röcken et al. Lediglich das älteste ihrer 23 Amyloidose-Präparate wies schlecht erhaltene Gewebe- und Zellgrenzen auf [72]. Auch Poston bestätigt die durchgängig zufriedenstellende Qualität der H&E-Schnitte in den Hodgkin-Präparaten aus der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts [68]. Die Einschätzung, dass Sammlungspräparate sehr gut mittels H&E-Färbung histologisch beurteilt werden können, teilen auch Sedivy und Patzak. In ihren elf Pankreas-Präparaten im Alter von 109 - 188 Jahren stellten sie lediglich leichte autolytische Veränderungen sowie Abschuppungen des Endothels fest. Abgesehen davon war die organische Struktur gut erhalten [80]. Interessanterweise fanden Barne et al. in Präparaten der *Hunterian Collection* in London aus dem 18. Jahrhundert ebenfalls eine gut erhaltene histologische Struktur, obwohl diese Präparate wahrscheinlich ausschließlich in Ethanol und nicht in Formalin gelagert worden waren [17].

Unsere Untersuchungen sowie die beispielhaft erwähnten Studien ermutigen, alte Sammlungspräparate mittels H&E-Färbung histologisch zu untersuchen. Es kann im Vorhinein davon ausgegangen werden, dass in einem Großteil der Präparate die mikroskopische Struktur eine Beurteilung in zufriedenstellendem Ausmaß erlauben wird und die Mühe der histologischen Aufarbeitung im Hinblick auf die Diagnoseverifizierung daher lohnend ist.

Ziehl-Neelsen- und Gram-Färbungen. In keinem der untersuchten Tuberkulose-Präparate ließen sich mit diesen histologischen Färbungen Mykobakterien darstellen. Dies kann mehrere Ursachen haben:

- Die Biopsien enthielten keine Bakterien (eventuell wurde mit der Biopsie eine nicht-repräsentative Stelle getroffen, siehe dazu auch Kapitel 4.2.1 auf S. 70).
- Die Integrität und damit die Anfärbbarkeit der Bakterien ist durch die Fixier- und Lagerungsbedingungen zerstört worden.

Obwohl die Ziehl-Neelsen-Färbung speziell zur Anfärbung von säurefesten Stäbchen ent-

wickelt wurde, stellt sie – insbesondere verglichen mit molekulargenetischen Methoden – keine zuverlässige Nachweismethode für Mykobakterien dar¹⁵. Noch schwieriger ist das Anfärben von Mykobakterien mit der Gram-Färbung, da die verwendeten Farbstoffe nur schwer durch die mit Mykolsäuren angereicherte Zellwand der Mykobakterien dringen [89]. Jedoch erfordern beide Färbungen eine erhaltene Integrität der Zellwand, da sonst die Farbstoffe nicht im Bakterium bleiben und dieses sich folglich nicht darstellen lässt. Da sich molekulargenetisch mykobakterielle DNA nachweisen ließ und außerdem histologisch in fast allen Präparaten Tuberkulose-typische Strukturen zu finden waren, ist ein reines Fehlen von Bakterien nicht anzunehmen (siehe dazu Kapitel 3.4.5 auf S. 63). Somit ist es wahrscheinlicher, dass die Zellwand der vorhandenen Mykobakterien durch die genutzten Fixier- und Konservierungslösungen sowie die lange Lagerungsdauer zerstört wurde und sich diese daher durch die ohnehin schon zu falsch-negativen Ergebnissen neigenden Färbemethoden nicht mehr darstellen ließen. Dafür spricht auch die allgemein anerkannte tuberkulozide Eigenschaft von Formalin, welches für die in vitro Desinfektion gegen Mykobakterien eingesetzt werden kann [51]. Obwohl die bakterizide Effektivität von Formalin gegenüber Mykobakterien noch immer unklar ist¹⁶, wird von einigen Autoren bereits eine Lagerung des tuberkulösen Materials in 10 % Formalin über 24 h als ausreichend zur Abtötung der Bakterien angesehen [42]. Daher scheint bei einer Lagerung von mehreren Jahrzehnten in Formalin- und Ethanol-haltigen Lösungen ein vollständiges Absterben und konsekutives Zersetzen der Bakterien wahrscheinlich.

Diese Annahme wird auch durch Ergebnisse von Walker und Baron unterstützt. Sie untersuchten ventrikuläre und ösophageale Ulcera-Präparate aus dem 18. Jhr. mittels H&E-Färbung auf *Helicobacter*-ähnliche Organismen. Obwohl alle Präparate histologisch auffällig gut erhalten waren, ließen sich in keinem der Präparate *Helicobacter*-ähnliche Organismen darstellen [93]. Aufgrund der negativen Färbeargebnisse sowie bereits publizierter Beobachtungen von Kappel et al., wonach Mykobakterien nach einer Lagerung von drei Tagen in Formalin nicht mehr anzüchtbar waren, verzichteten wir auf eine Kultivierung von Mykobakterien aus den alten Sammlungspräparaten [51].

4.3.3 Durchführbarkeit immunhistologischer Färbungen

Im Gegensatz zu den histologischen Färbungen brachten die immunhistologischen Untersuchungen nur einen geringen Erkenntnisgewinn. Lediglich die Färbungen gegen Vimen-

¹⁵Siehe dazu z. B. Zink et al. 2004: Von den 20 Proben (Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Gewebeblöcke), in welchem sich molekulargenetisch *Mycobacterium-complex*-DNA nachweisen ließ, zeigten nur acht positive Färbeargebnisse in der Ziehl-Neelsen-Färbung [106].

¹⁶Siehe dazu die Literaturrecherche von Kappel et al. [51].

tin und GFAP erbrachten überhaupt positive Ergebnisse. Dies steht im Einklang mit mehreren Arbeiten, die zeigten, dass antigene Bindungsstellen empfindlich gegenüber den üblichen Fixier- und Konservierungsmitteln Formalin und Ethanol sind. Eine Lagerung in diesen Substanzen von wenigen Wochen kann bereits zu falsch-negativen immunhistologischen Ergebnissen führen [61, 98, 99]. Problematisch für die immunhistologische Untersuchung alter Sammlungspräparate ist außerdem die Veränderung der antigenen Bindungsstellen durch autolytische Prozesse bei verzögert einsetzender Fixierung [57]. Zusätzlich stellten wir bei unseren positiven Schnitten eine deutlichere Hintergrundfärbung als bei immunhistologischen Schnitten aus frischen Präparaten fest.

Diese Beobachtung ist konsistent mit Aussagen von Röcken et al. und deren immunhistologischen Untersuchungen an alten Amyloidose-Präparaten. Dort konnte bei den untersuchten Färbungen u. A. gegen AA-Amyloid eine Positivität in 19 von 23 Präparaten detektiert werden [72]. Die hohe Erfolgsquote immunhistologischer Färbungen in alten Sammlungspräparaten bei Röcken et al. steht im Gegensatz zu weniger ermutigenden Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Poston detektierte in seinen Untersuchungen an den originalen Hodgkin-Präparaten lediglich eine Positivität für Färbungen mit Leu-M1-Antikörpern, nicht jedoch für PD7/27- und CAM5.2-Antikörper. Er schloss, dass Kohlenhydrat-haltige antigene Bindungsstellen (wie die antigene Struktur für den Leu-M1-Antikörper) unempfindlicher gegenüber Fixierungsmitteln und Lagerungsbedingungen sind als eiweißhaltige Strukturen (wie die antigenen Bindungsstellen der anderen von ihm getesteten Antikörper) [68]. Allerdings kann die Zusammensetzung des Antigens nicht der einzige Einflussfaktor auf die Haltbarkeit antigener Strukturen in alten Sammlungspräparaten sein, da z. B. GFAP eine proteinhaltige Struktur ist und trotzdem hervorragende Färbeergebnisse in unserer Studie sowie auch bei Lyck et al. lieferte. Lyck et al. untersuchten Gewebe von unterschiedlich lange in Formalin gelagerten Gehirnen mit 29 verschiedenen Antikörpern. 20 Antikörper zeigten in Geweben, welche 24 h in Formalin gelagert wurden, eine positive Reaktion, aber in 10 Jahre in Formalin gelagerten Proben negative Färbungen. Konsistent zu unseren Ergebnissen erwies sich jedoch GFAP als ein besonders robuster immunhistologischer Marker, welcher auch nach 10 Jahren noch ein Färbeergebnis von 3/4 erbrachte [56]. Sowohl Lyck et al., Röcken et al. als auch wir nutzten im Gegensatz zu Poston vorgeschaltete antigene Rückgewinnungsverfahren (*antigene retrieval methods*), um die Ausbeute der immunhistologischen Färbungen zu erhöhen. Diese Verfahren, wie die in dieser Studie verwendete hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (*HIER*), tragen besonders zur Wiederherstellung der Sekundär- und Tertiärstruktur nach Quervernetzung der Proteine bei¹⁷ und scheinen daher eine

¹⁷Siehe dazu z.B. [1].

sinnvolle Maßnahme vor der immunhistologischen Färbung archivierter Gewebe zu sein. Insgesamt lässt sich jedoch feststellen, dass bisher keine Methodik besteht, alte pathologische Feuchtpräparate unter zuverlässigem Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse immunhistologisch zu untersuchen. Zusätzlich sind auch falsch-positive Färbeergebnisse aufgrund der stärker ausgeprägten Hintergrundfärbung eine Gefahr. Damit ist die Aussagekraft immunhistologischer Untersuchungen in pathologischen Feuchtpräparaten zum jetzigen Zeitpunkt begrenzt.

4.4 Erfolg der molekulargenetischen Untersuchungen

4.4.1 Isolierbarkeit von amplifizierbarer DNA

Aus allen 44 Präparaten konnte mittels Proteinase K-Verdau und Phenolchloroform-/Ethanol-fällung DNA isoliert werden. Die isolierte DNA wies meist Reinheits-Werte unterhalb des optimalen Bereichs von 1,8 - 2,0 (A260/A280) auf, so dass von einer deutlichen Verunreinigung der DNA mit Eiweißen ausgegangen werden kann. Dies kann mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Formalin-induzierten Quervernetzungen zwischen DNA und Proteinen zurückgeführt werden. Dabei unterschied sich die DNA der Tumorpräparate, welche aus Kryoschnitten extrahiert wurde, hinsichtlich der Menge nicht von der aus Paraffinschnitten isolierten DNA der Infektionspräparate. Allerdings zeigte sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der Reinheit, mit einer besseren Qualität der aus Paraffinschnitten gewonnenen DNA der Infektionspräparate.

Abhängigkeit der DNA-Menge und -Reinheit vom Präparatealter. Es ließ sich keine Korrelation zwischen Präparatealter und DNA-Menge oder -Reinheit feststellen. Dies gilt allerdings mit der Einschränkung, dass lediglich für rund 37 % der Tumor- und 25 % der Infektionspräparate das Alter bekannt war. Weiterhin wiesen beide Gruppen sowohl für DNA-Menge als auch für die Reinheit eine große Standardabweichung auf, so dass die Aussagekraft dieser Daten insgesamt gering ist.

Amplifizierbarkeit der isolierten DNA. Interessanter und bedeutungsvoller als die pure Menge an DNA ist die Amplifizierbarkeit, da diese für weiterführende Untersuchungen unerlässlich ist. Die durch Formalin herbeigeführte Quervernetzung und Degradierung der DNA schränkt ihre Amplifizierbarkeit erheblich ein. Gilbert et al. wiesen darauf hin, dass die erhöhte Zufuhr von thermaler Energie (entweder mittels verlängerter Inkubationsdauer oder höheren Temperaturen) zu einem verstärkten Aufbrechen von Quervernetzungen führt und somit die Menge an amplifizierbarer DNA erhöhen kann. Allerdings führen

Temperaturen über 85 °C zu einer verstärkten Fragmentierung der DNA [38]. Daher entschieden wir uns für eine verlängerte Verdau-Dauer über insgesamt 72 h bei 56 °C, ähnlich einem erfolgreichen Protokoll von Paireder et al. [66]. Es zeigte sich, dass mit unserer Methodik die Vervielfältigung von DNA-Sequenzen zwischen 125 bp - 450 bp in 38 von 45 Fällen gelang (siehe Tabelle 13 in Kapitel 3.4.2). Da sich in den Testdurchläufen vor Beginn der eigentlichen Studie oftmals nach dem ersten PCR-Durchgang meist nur schwache Banden in der Gelelektrophorese darstellten, entschieden wir uns generell, eine verschachtelte PCR mit zwei Durchgängen durchzuführen. Dieses Verfahren erwies sich als erfolgreich in der Herstellung von ausreichenden Mengen an PCR-Produkt.

Allerdings wurde im Falle der MGMT-Methylierungsuntersuchungen an den ZNS-Präparaten keine Reamplifizierung durchgeführt. Dies könnte eine Ursache für die erfolglose Amplifizierung der DNA aller drei ZNS-Präparate sein. Jedoch ist fraglich, ob eine Reamplifizierung an den Gliom-Präparaten zum Erfolg geführt hätte. Gehirn- und Rückenmarksgewebe ist aufgrund seines hohen Fettgehaltes besonders empfindlich gegenüber einer Fixierung mit Formalin. ZNS-Präparate aus alten Sammlungen sind daher für molekulargenetische Untersuchungen nur schwer verwertbar. Beispielsweise konnten Ferrer et al. zeigen, dass sich Punktmutationen, Tripletvervielfältigungen oder Deletionen in Hirngewebe, welches mehrere Jahre in ungepuffertem Formalin gelagert wurde, nahezu unmöglich noch detektieren lassen [35]. Jedoch konnten Savioz et al. aus bis zu 46 Jahre alten, Formalin-gelagerten Gehirnen amplifizierbare DNA isolieren. Dies gelang ihnen mit einer besonders schonenden Agarose-Plug-Technik, welche eine weitere Degradierung der DNA während des Isolierungsvorganges vermeidet [75]. Auch Hassani et al. konnten amplifizierbare humane sowie virale DNA aus bis zu 22 Jahre alten Gehirnpräparaten gewinnen. Dies gelang ihnen unter Verwendung hoher Proteinase K-Mengen sowie einer Verdau-Dauer von 68 h. Zusätzlich führten sie eine 6-10malige Waschung der Proben in PBS vor der Inkubation mit Proteinase K durch, um die Gewebe so weit wie möglich von Formalin zu befreien [43]. Allerdings führten auch sie, ebenso wie Savioz et al., nach der PCR keine weiterführenden Untersuchungen durch, so dass die Eignung von DNA aus Hirngewebe für umfassende molekulargenetische Methoden weiterhin fraglich erscheint.

Vergleich zu vorhergehenden Studien. Einen Überblick über bisher durchgeführte DNA-Isolierungsmethoden an alten Sammlungspräparaten zeigt Tabelle 17. In der Zusammenschau mit unseren Ergebnissen lässt sich feststellen, dass amplifizierbare DNA aus Sammlungspräparaten des 20. Jahrhunderts mittels Proteinase K-Verdau und Phenol-chloroform-Fällung sicher isoliert werden kann. Dabei erhält man in der Regel - verglichen mit Frischproben - zwar geringere Mengen an fragmentierter und leichtgradig verunrei-

nigter DNA, welche sich jedoch gut in einer verschachtelten PCR vervielfältigen lässt. Eine verlängerte Verdau-Dauer, mindestens jedoch 24 h, sowie eine leicht erhöhte Inkubationstemperatur wirken sich dabei positiv auf die DNA-Isolierung aus.

Neben der hier verwendeten manuellen Phenol-Chloroform-Extraktion mit Ethanol-fällung können auch verschiedene kommerziell verfügbare DNA-Extraktionskits zur DNA-Isolierung aus Formalin-fixiertem Gewebe genutzt werden. Diese Kits isolieren DNA aus Formalin-fixierten Proben in unterschiedlicher Quantität und Qualität, werden jedoch vor allem zur DNA-Isolierung aus nur kurzfristig in Formalin fixierten und anschließend in Paraffin eingebetteten Patientenproben verwendet [49].

Methode	Alter [Jahre]	Ablauf			DNA-Menge [μ g]	Reinheit [A260/A280]	Ampl.
Eigene [47]	50 - 112	Gewebemenge: 60 Schnitte à 10 μ m	800 μ g Proteinase K, 72 h, 56 °C	Phenolchloroform / Ethanol	5,09 \pm 5,71	1,55 \pm 0,22	+
Paireder 2013 (CTAB V7) [66]	62 - 200	Gewebemenge: 100 mg	375 μ g Proteinase K, 72 h, 65 °C	Phenolchloroform / Ethanol	1951: 2,4 \pm 0,9 1934: 1,4 1914: 1,2 \pm 0,3 1893: – 1850: – 1820: –	1951: 1,5 \pm 0,2 1934: 1,7 1914: 1,6 \pm 0,1 1893: – 1850: – 1820: –	+
Barnes 2000 [17]	> 200	Gewebemenge: 20 mg	100 μ g Proteinase K, 24 h, keine Temp.-Angabe	Phenolchloroform / Isopropanol	keine Angabe	keine Angabe	+
Santos 2008 [73]	19	Gewebemenge: 5 Schnitte à 10 μ m	200 μ g Proteinase K, 24 h, 55 °C	Phenolchloroform / Isopropanol	0,41	1,55	+
Hassani 2015 [43]	2 - 22	Gewebemenge: 500 mg	1000 μ g Proteinase K, 68 h, 55 °C	Phenolchloroform / Ethanol	keine Angabe	keine Angabe	+
Savioz 1997 [75]	3 - 46	Gewebemenge: 200 mg (in Agarose eingebettet)	250-500 μ g Proteinase K, 24 h, 50 °C	Auswaschung der DNA aus Agarose-Gel	1954: 23,2 1960: 45,12 \pm 25,32 1975: 15,1 \pm 10,98 1993: 26	1,2 1,33 \pm 0,21 1,35 \pm 0,19 1,4	+
Ferrer 2007 [35]	10 - 20	(1) Übliche Phenolchloroform / Ethanol-Isolierung	(2) DNeasy® Tissue	(3) QIAmp DNA Micro	keine Angabe	keine Angabe	(+)

Tabelle 17: Übersicht über vorherige molekulargenetische Untersuchungen an alten Sammlungspräparaten.

Mögliche Kontamination durch eigene DNA. Alle Versuche wurden in einem molekulargenetischen Arbeitslabor unter Beachtung üblicher Vorsichtsmaßnahmen (steriles Werkzeug, Handschuhe etc.) durchgeführt, um eine Eigenkontamination zu vermeiden. Wenn es der Versuchsaufbau zuließ, führten wir die Versuche unter der Sterilbank durch. Außerdem fand die Aufarbeitung der Proben räumlich getrennt von der PCR statt. Zusätzlich lief in jeder PCR eine Negativkontrolle mit.

4.4.2 Ergebnisse der Mutationsanalysen

Alle Mutationsanalysen wurden in zweifacher Ausführung durchgeführt und ein Ergebnis wurde erst in diese Studie aufgenommen, wenn es in beiden Durchläufen sicher zu detektieren war. Dieses Vorgehen war angezeigt, da zum einen keine Positivkontrollen in Form von frischem Tumorgewebe durchgeführt wurden und zum anderen, um Formalin-induzierte Sequenzfehler auszuschließen.

Von den insgesamt 15 amplifizierbaren DNA-Proben der Tumorpräparate konnte in allen Fällen eine Sanger-Sequenzierung durchgeführt werden.

Von den vier amplifizierbaren Präparaten, welche auf EGFR getestet wurden, zeigten alle die Wildtyp-Sequenz.

Interessanterweise ließ sich in einem der beiden Kolonkarzinome (Da236) die Mutation KRAS^{G12D} detektieren. KRAS-Mutationen führen heute zu einem verminderten Ansprechen auf eine Therapie mit anti-EGFR-Antikörpern wie Cetuximab. In rund einem Drittel aller KRAS-mutierten Kolonkarzinome findet man heute diese G12D-Mutation [26]. Größere Stichproben wären nötig, um die Prävalenz dieser Mutation in früheren Populationen verlässlich zu untersuchen und z. B. der Frage nachzugehen, ob diese Mutationen als Reaktion auf neu eingeführte Therapien heute häufiger auftreten.

Auch in zwei der auf BRAF getesteten Melanom-Präparaten fanden sich Mutationen. In beiden Fällen (HT13 und Ht9) handelte es sich um die auch heute weit verbreitete BRAF^{V600E}-Mutation. 37 - 50 % aller Melanome sind heutzutage im BRAF-Gen mutiert. 80 - 90 % dieser mutierten Tumore tragen dabei die BRAF^{V600E}-Mutation [55]. In der in dieser Studie getesteten Stichprobe von neun amplifizierbaren Melanomen lag die Rate an mutierten Melanomen mit 22 % deutlich darunter. Auch hier sind weitere Untersuchungen nötig, um eine abschließende Aussage über die Häufigkeit von BRAF-Mutationen in Melanomen im 20. Jahrhundert tätigen zu können.

4.4.3 Ergebnisse der Erregernachweise

Alle Erregernachweise wurden in zweifacher Ausführung durchgeführt und ein Ergebnis wurde erst in diese Studie aufgenommen, wenn es in beiden Durchläufen sicher zu detektieren war. Alle Hybridisierungs- und Sequenzierungsergebnisse können daher als echt angesehen werden, da sie zum einen reproduzierbar waren und zum anderen nach vorgeschaltetem UNG-Verdau detektiert wurden.

HPV. Von zehn der elf auf HPV getesteten Präparate ließ sich amplifizierbare DNA isolieren. Davon waren alle vier genitalen Karzinome positiv für HPV-Typ 16, ebenso

wie vier der sechs oro-pharyngealen Karzinome. Neben HPV-Typ 16 konnten keine anderen HPV-Typen detektiert werden. Daher ist eine Kontamination der Präparate mit HPV-DNA während ihrer Lagerungszeit unwahrscheinlich, da diese verschiedene HPV-Typen erwarten ließe.

Der Nachweis des Karzinom-induzierenden HPV-Typ 16 in den genitalen Karzinomen passt zur heute etablierten Theorie, dass HPV hauptverantwortlich in der Ätiologie dieser Tumore ist [22]. Allerdings konnte auch in 66,7 % der oro-pharyngealen Tumore HPV-DNA des Typ 16 detektiert werden. Humane Papillomaviren wurden erst in den 1970er Jahren entdeckt. Daher fehlen verlässliche Daten über ihre Prävalenz in Kopf-Hals-Tumoren in der ersten Hälfte des 20. Jahrhundert [107]. In einer schwedischen Studie konnte in den 1970er Jahren eine HPV-Prävalenz in Kopf-Hals-Tumoren von 23 % gefunden werden. Diese stieg bis in die 2000er Jahre auf bis zu 93 % an. Daher ist unsere Quote von 66,7 % in Präparaten aus der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts bemerkenswert. Kopf-Hals-Tumore wurden im 20. Jahrhundert ätiologisch vor allem auf Alkohol und Rauchen zurückgeführt [67]. Erst seit einigen Jahren werden, auch aufgrund geänderter Sexualpraktiken, für die Entstehung dieser Karzinom-Gruppe verstärkt humane Papillomaviren verantwortlich gemacht. Allerdings entstammten alle unsere Kopf-Hals-Tumore der oro-pharyngealen Region, welche generell anfälliger für HPV als laryngeale und hypopharyngeale Bereiche ist [27]. Daher weisen diese Karzinome im Allgemeinen eine höhere HPV-Prävalenz als die Gesamtheit der Kopf-Hals-Karzinome auf [60]. Eine generelle Aussage über die HPV-Prävalenz in genitalen und oro-pharyngealen Karzinomen in früheren Populationen kann allein aus unseren Daten aufgrund der relativ kleinen Stichprobe und des *collection bias* nicht getroffen werden. Jedoch sind unsere Befunde interessant und regen zu einer weiteren Untersuchung auf HPV-DNA in Sammlungspräparaten an.

Mykobakterien. Aus 14 Tuberkulose-Präparaten ließ sich in 13 Fällen amplifizierbare DNA isolieren. Vier unserer Proben (31 %) reagierten positiv für den MTUB-Komplex. Dieser MTUB-Komplex erfasst verschiedene Spezies, unter anderem *M. tuberculosis* und *M. bovis*¹⁸. Klinisch ist eine Unterscheidung zwischen Infektionen mit beiden Bakterien nicht möglich, jedoch lassen sie sich molekulargenetisch mithilfe der Sequenz im *pncA*-Gen differenzieren [83]. Das *pncA*-Gen codiert für das Enzym *Pyrazinamidase*, welches das Antibiotikum Pyrazinamid in die eigentlich wirksame Variante Pyrazincarbonsäu-

¹⁸Ob es sich bei diesen beiden Varianten um verschiedene Vertreter derselben Spezies oder zwei eigenständige Spezies handelt, ist immer wieder Gegenstand von Diskussionen und bis heute nicht abschließend geklärt [62].

re umwandelt [105]. Klinisch können Mutationen im *pcnA*-Gen in einer verminderten Ansprechrate auf Pyrazinamid imponieren [105]. Weiterhin wird die Sequenz im *pcnA*-Gen im klinisch-diagnostischen Alltag häufig zur molekulargenetischen Differenzierung zwischen *M. bovis* und *M. tuberculosis* genutzt, da nur *M. bovis* im Nukleotid 169 die Punktmutation C>G besitzt [83]. Für 75 % der fraglichen Proben konnten mithilfe der Sequenz im *pcnA*-Gen *M. bovis* ausgeschlossen werden. Zwar ist dies noch kein abschließender Beweis für das Vorliegen von DNA von *M. tuberculosis*, da der MTUB-Komplex neben *M. tuberculosis* und *M. bovis* noch weitere Vertreter enthält¹⁹. Jedoch ist *M. tuberculosis* darunter der häufigste humanpathogene Vertreter [83]. Dies macht *M. tuberculosis* gerade auch vor dem Hintergrund der für Tuberkulose typischen mikroskopischen und makroskopischen Befunde sehr wahrscheinlich.

Das Präparat Ke3 zeigte als einziges eine positive Hybridisierung für den MAC-Komplex. Vertreter des MAC-Komplexes lösen in der Regel pulmonale Erkrankungen aus [76]. Jedoch finden sich in der Literatur auch Fälle von MAC-Infektionen des oberen Respirationstraktes, inklusive speziell des Kehlkopfes (z. B. [94]).

Im deutlich größeren Teil unserer Tuberkulose-Präparate fanden wir eine Positivität für den MOT-Komplex, welcher mehr als 120 verschiedene Mykobakterien abdeckt [15]. In zwei Präparaten (Lu145 und Gf122) fand sich eine Koinzidenz von MTUB und MOT. Dieses parallele Auftreten ist nicht selten. Damaraju et al. fanden z. B. in 11 % ihrer Patienten mit Lungentuberkulose eine parallele Besiedlung mit Vertretern des MOT-Komplexes [29].

Die Überlegenheit von MOT gegenüber MTUB ist jedoch überraschend, da die typische Tuberkulose des Menschen durch *M. tuberculosis* ausgelöst wird und Vertreter des MOT-Komplexes nicht zu Tuberkulose führen. Jedoch können diese Erreger in aller Regel Auslöser für chronische Erkrankungen sein, welche der Tuberkulose sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch ähneln (z. B. indem sie auch verkäsende Granulome mit Riesenzellen ausprägen) [103]. Auch klinisch können durch Vertreter des MOT-Komplexes ausgelöste Infektionen ähnlich einer Tuberkulose verlaufen²⁰. Die überraschend hohe Prävalenz von MOT in unseren Proben muss vor dem Hintergrund zweier Einschränkungen in der Arbeit mit pathologischen Sammlungsobjekten diskutiert werden: (1) *collection bias* („*Sammlungsfehler*“) und (2) Kontamination (siehe dazu auch Kapitel 1.3.3 auf Seite 19). Da zu keinem der MOT positiven Präparate weitere Angaben bekannt waren, ist es durchaus denkbar, dass die vorhandenen Organe nicht von verschiedenen Patienten stammen.

¹⁹u. a. die Spezies *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii* and *M. pinnipedi* [83]

²⁰Sie befallen vornehmlich Lunge, Haut, Weichteile und Knochen, können jedoch in allen Organen des Körpers auftreten. Außerdem führen sie zu Schwäche, Gewichtsverlust, Nachtschweiß und bei Befall der Lunge auch zu (blutigem) chronischen Husten [50].

Es ist möglich, dass sie zum Beispiel zwei verschiedenen Verstorbenen²¹ mit multiplem Organbefall entnommen wurden. Dies würde erklären, warum die eigentlich selteneren, durch MOT ausgelösten Erkrankungen in unserer Stichprobe so überdurchschnittlich häufig anzutreffen waren. Zum anderen muss aber jeder Erregernachweis in pathologischen Präparaten auch auf die Möglichkeit einer Kontamination überprüft werden. Da alle Arbeiten in entsprechend angelegten Laboren und unter möglichst sterilen Bedingungen durchgeführt wurden sowie aufgrund der mitgeführten Negativkontrollen, ist eine Kontamination während der molekulargenetischen Untersuchungen unwahrscheinlich. Vertreter des MOT-Komplexes sind in unserer Umgebung jedoch allgegenwärtig [15] und eine Kontamination mit ihnen während der Lagerungszeit der Präparate ist durchaus denkbar und nicht auszuschließen. Weiterhin sollte bedacht werden, dass auch heutzutage der bloße Nachweis von MOT nicht mit einer tatsächlichen durch MOT-ausgelösten Erkrankung gleichzusetzen ist [50]. Tatsächlich detektieren heute viele Labore in westlichen Ländern eine weit höhere Inzidenz von Vertretern des MOT-Komplexes als des MTUB-Komplexes fest. Jedoch liegt nur in 50 % dieser Fälle eine wirkliche Infektion durch MOT-Vertreter vor [50]. Allein durch unsere LCD Chip-Daten ist eine Unterscheidung zwischen einer nachträglichen Kontamination und einem „echten“ Erreger im Falle der MOT-positiven Präparate nicht zu treffen. Dies zeigt umso deutlicher, dass die Untersuchungen an alten Sammlungspräparaten mehrgleisig und die Diagnostik in Zusammenschau der verschiedenen Befunde erfolgen sollte.

4.5 Schlussfolgerungen

Pathologische Sammlungen erlauben uns, die medizinischen Folgen früherer Lebensumstände mit anderen Umwelt- und kulturellen Einflüssen zu studieren. Dieses Erforschen historischer Gegebenheiten mit modernen Mitteln ist sonst eher naturwissenschaftlichen Disziplinen wie z. B. der Archäologie vorbehalten. Dabei kann das Forschen in pathologischen Sammlungen im Sinne einer Känopathologie (griech.: *καινός*, kainos - neu) von der Paleopathologie (griech.: *Παλαιός*, palaios - alt), welche sich mit frühzeitlichen pathologischen Veränderungen z. B. an Mumien befasst, abgegrenzt werden [79]. Allerdings ist die Forschung in alten Sammlungsbeständen mit einigen Problemen behaftet. Diese stellen keinen Hinderungsgrund für moderne Forschung dar, der Wissenschaftler sollte sich ihrer aber bewusst sein.

²¹Es muss sich im mindestens zwei Verstorbene gehandelt haben, da zwei komplette Lungen vorliegen.

Zum einen muss in einer pathologischen Sammlung mit einem gewissen Anteil an falsch klassifizierten Präparaten gerechnet werden. Eine histologische Diagnoseverifizierung ist daher vor jedem nächsten Arbeitsschritt unerlässlich.

Zum anderen stellt der Inhalt einer pathologischen Sammlung keinen repräsentativen Querschnitt durch damalige Krankheitshäufigkeiten dar. Daher können seltene Krankheiten, verglichen mit den tatsächlichen Prävalenzen zur damaligen Zeit, in einer Sammlung viel zu stark vertreten sein. Dass wir z. B. in unserer Studie zweimal auf ein Lungsarkom oder mehrfach auf Vertreter des MOT-Komplexes stießen, kann der Tatsache geschuldet sein, dass wir vielleicht mehrere Organe von einem Individuum haben und es nicht wissen. Dies ist auch dem Umstand geschuldet, dass Informationen über Entstehung und Vorgeschichte der Präparate zum größten Teil nicht mehr auffindbar sind.

Zum Schluss sollte man beim Arbeiten mit pathologischen Feuchtpräparaten immer bedenken, dass es sich nicht nur um medizinische Präparate, sondern auch um historische Zeugnisse handelt. Ein sorgfältiger Umgang mit diesen endlichen Ressourcen und ein angemessener Respekt vor der Geschichte dieser Präparate ist daher immer geboten.

5 Anhang

5.1 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie wurde an 44 Präparaten der Pathologisch-anatomischen Lehrsammlung der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt. Ungefähr seit dem 18. Jahrhundert wurden pathologische Universitätsammlungen im Unterschied zu klassischen Museen für Forschung und Ausbildung der Studenten konzipiert. Auch heute sind pathologische Präparate für die Lehre noch wertvoll, da in den begreifbaren klinischen Fächern wie Pathologie und Anatomie ein Sinn für dreidimensionale Strukturen des menschlichen Körpers ausgebildet werden muss. Für die Forschung ist der Bestand an menschlichen Präparaten in pathologischen Sammlungen interessant, da sich hier sowohl Krankheiten vergangener Populationen sowie auch pathologische Befunde von heutiger Relevanz finden lassen. Die Sammlungen haben zusätzlich einen wissenschaftshistorischen Wert, da sie zur Ausbildung der heute gültigen pathologischen Klassifikationen entscheidend beigetragen haben. Jedoch ist dieser historische Wert nicht allein ausreichend, damit pathologische Sammlungen auf Dauer bestehen können. Um im universitären Alltag weiterhin eine Existenzberechtigung zu haben, müssen sie permanent an neue Bedürfnisse ihres fachlichen Publikums angepasst und modernen wissenschaftlichen Fragestellungen zugänglich gemacht werden. Ziel dieser Studie war es daher, langjährig gelagerte Feuchtpräparate auf ihre Eignung für moderne pathologische Untersuchungsmethoden zu testen. Bei der Verwendung einer pathologischen Sammlung für aktuelle Forschung und Lehre ergeben sich u. a. zwei Schwierigkeiten: (1) Gefahr einer inkorrekten Klassifizierung der Präparate nach heutigen Maßstäben durch die damaligen Pathologen und (2) Veränderung der histologischen und molekularen Strukturen durch die langjährige Lagerung in Fixier- und Konservierungsmitteln wie z. B. Formalin und Ethanol, was moderne pathologische Untersuchungsmethoden eventuell erschwert. Besonders Formalin führt zu z. T. irreversiblen Quervernetzungen zwischen Proteinen und DNA. Daher lassen sich aus lange in Formalin gelagerten Geweben vornehmlich nur geringe Mengen an fragmentierter DNA isolieren. Außerdem kann Formalin zur Maskierung von antigenen Bindungsstellen führen, weshalb immunhistologische Untersuchungen zu falsch-negativen Ergebnissen neigen. Als mögliche Lösungsansätze dieser Probleme wurden (1) in dieser Studie zuerst eine histologische Diagnoseverifizierung durchgeführt sowie (2) ein verlängerter Proteinase K-Verdau der DNA-Isolierung, ein UNG-Verdau der Amplifizierung sowie eine Hitze-induzierte Epitopdemaskierung den immunhistologischen Färbungen vorgeschaltet.

Die verwendeten 44 Feuchtpräparate gliederten sich in 19 „Tumorpräparate“ (Lungenkarzinome, Kolonkarzinome, Gliome und Melanome) sowie 25 „Infektionspräparate“ (11 po-

tentiell HPV-assoziierte Plattenepithelkarzinome und 14 Tuberkulose-Präparate). Die Präparate entstanden, sofern bekannt, zwischen 1902 und 1964. An allen Präparaten fand eine histologische Diagnoseverifizierung anhand von H&E-Schnitten statt. Von ausgewählten Tumorpräparaten konnten zusätzlich immunhistologische Schnitte und von allen Tuberkulose-Präparaten außerdem Ziehl-Neelsen- und Gram-Färbungen angefertigt werden. An den Tumorpräparaten wurden Mutationsanalysen und an den Infektionspräparaten molekulargenetische Erregernachweise durchgeführt.

Im Gegensatz zu den qualitativ guten H&E-Schnitten erbrachten die immunhistologischen Färbungen eher mäßige Färbeergebnisse. Durchweg negativ waren die bakteriellen Färbungen. Aus allen Präparaten ließ sich DNA isolieren, die in 86 % der Fälle amplifizierbar war. Interessanterweise fanden wir in einem Kolon-Karzinom die Mutation KRAS^{G12D} sowie in zwei Melanom-Präparaten die BRAF^{V600E}-Mutation. 100 % der genitalen Plattenepithelkarzinome zeigten eine positive Hybridisierung für HPV Typ 16. 66,7 % der oro-pharyngealen Karzinome waren ebenfalls positiv für diesen HPV-Typ. In rund einem Drittel der Tuberkulose-Präparate fanden wir DNA von *M. tuberculosis* und gut 75 % unserer Präparate zeigten eine positive Hybridisierungsreaktion für den *mycobacteria-other-than-tuberculosis* (MOT)-Komplex.

In dieser Studie wird deutlich, dass alte pathologische Sammlungen auch heute noch großes Potential bergen. Es konnte gezeigt werden, dass moderne pathologische Untersuchungsmethoden an bis zu 100 Jahre alten Feuchtpräparaten durchführbar sind. Durch die Öffnung pathologischer Sammlungen für moderne Untersuchungsmethoden werden enorme Bestände an menschlichen Material für neue Forschungsfragen nutzbar. Zusätzlich ergeben sich neue Wege, alten pathologischen Sammlungen eine realistische Daseinsberechtigung im heutigen Universitätsgeschehen zu sichern.

5.2 Thesen

1. Pathologische Sammlungen beherbergen einen enormen Bestand an menschlichen Präparaten, welche nicht nur Krankheiten aus vergangenen Zeiten, sondern auch hoch-aktuelle pathologische Befunde in zum Teil heutzutage nur noch wenig gesehenen Stadien abbilden. Sie sind daher nicht nur von wissenschaftshistorischem Wert, sondern sind auch für aktuelle Forschung und Lehre enorm relevant.
2. Geschaffen primär für Forschung und Lehre, hatten pathologische Sammlungen ihre Blütezeit zu Beginn des 20. Jahrhunderts. Jedoch sind sie heute vielfach ungepflegt, vergessen und ungenutzt, da ihr Potential oft nicht erkannt wird.
3. Die Daseinsberechtigung einer pathologischen Sammlung kann nicht allein in ihrem wissenschaftshistorischen Wert begründen werden. Um bestehen zu können, muss eine Sammlung lebendig bleiben und sich ständig einem neuen Publikum sowie modernen ethischen Bedenken und wissenschaftlichen Fragestellungen anpassen und öffnen.
4. Grundvoraussetzung für das Arbeiten mit alten Sammlungspräparaten ist die vorhergehende Diagnoseverifizierung, da immer die Gefahr einer nach heutigen Maßstäben inkorrekten Diagnosestellung durch die alten Pathologen besteht.
5. Das Gewebe alter Sammlungspräparate kann sowohl histologisch als auch immunhistologisch qualitativ zufriedenstellend untersucht werden, um für aktuelle Forschung interessant zu sein und eine einfache Diagnoseverifizierung zu ermöglichen.
6. Molekulargenetische Untersuchungen sind an alten Sammlungspräparaten ebenfalls möglich, jedoch kann die lange Lagerungsdauer in z. B. Formalin oder Ethanol die Isolierung von amplifizierbarer DNA erschweren.
7. Es lässt sich sowohl humane als auch bakterielle und virale DNA aus den alten Geweben in solch einer ausreichenden Qualität gewinnen, dass sie sich für weiterführende Untersuchungen wie Mutationsanalysen und molekulargenetische Erregernachweise nutzen lässt.
8. Während der Arbeit mit alten pathologischen Sammlungspräparaten sollte besonders auf folgende Probleme geachtet werden: (1) collection bias, (2) vorangegangene Kontamination während der Lagerung der Präparate sowie (3) artifizielle Mutationen nach der Amplifizierung. Um dadurch hervorgerufenen Fehler zu minimieren,

sollten entsprechende Maßnahmen, z. B. sammlungsübergreifende Studien, zusammenfassendes Befunden verschiedener Untersuchungen sowie Wiederholungen positiver Mutationsanalysen, ergriffen werden.

9. Das Gewebe alter Sammlungspräparate kann sowohl histologisch als auch molekulargenetisch qualitativ zufriedenstellend untersucht werden, um für aktuelle Forschung interessant zu sein und eine einfache Diagnoseverifizierung zu ermöglichen. Daher können pathologische Sammlungen auch heute noch in aktuelle Lehr- und Forschungsfragen eingebunden werden.

5.3 Abbildungen der Präparate

Gezeigt werden alle für die Studie verwendeten Präparate im Zustand nach der präparatorischen Aufarbeitung bis zum März 2015.



Nn28



Lu176



Lu170



Nn23



He146



Da236



Da274



ZNS33



ZNS270



ZNS212



Da183



Ht60



Ht13



Ht9b



wGt45



Ht15b



Ht3



Ht15a



Ht32



wGt151



mGt26



Mu7



Md40



Mu17



Mu10



Mu37



mGt103



Ni34



Ni250



Mi133



Ke3



Thy3



Lu7.2



Lu124



Lu145



Lu30/10



Kn322



wGt200



Lu180



Mu31



mGt191



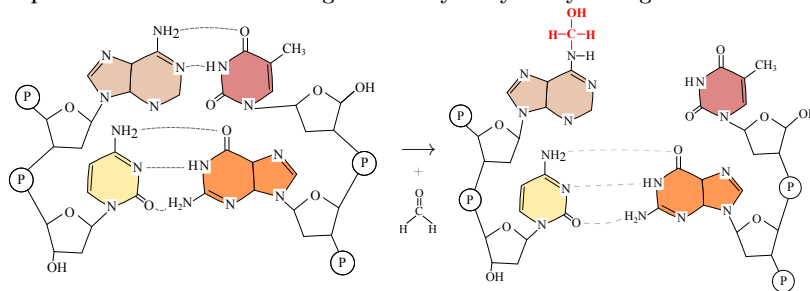
Mu28



Gf122

5.4 Effekte von Formalin auf DNA

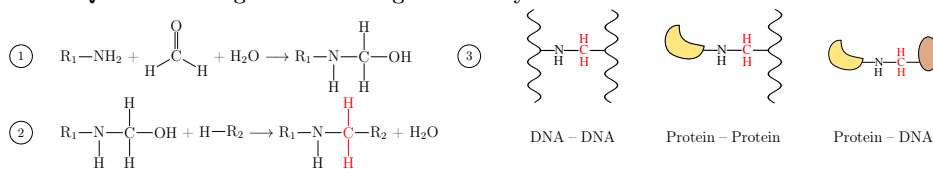
1) Reversible Separation beider DNA-Stränge durch Hydroxymethylierung



Hydroxymethylierung von Amino- und Iminogruppen nach transienter Öffnung der DNA-Stränge

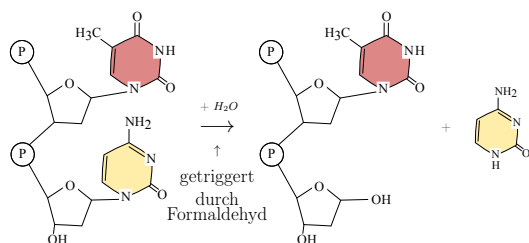
- Schwächung der Wasserstoffbrückenbindungen durch Auseinanderweichen der DNA-Stränge
- Freigabe weiterer reaktiver Gruppen und weitere Hydroxymethylierung
- Schrittweise Separation beider DNA-Stränge

2) Irreversible Quervernetzung durch Bildung von Methylenbrücken

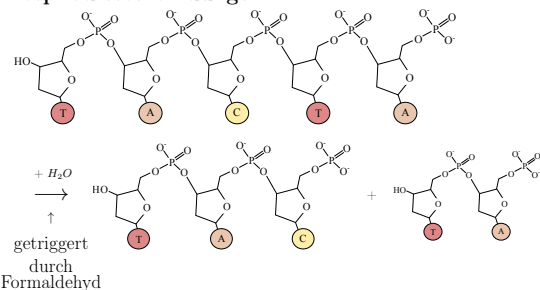


- ① Hydroxymethylierung durch Addition von Formaldehyd an Amino- und Iminogruppen
- ② Bildung einer Methylenbrücke zwischen zwei Molekülen
- ③ die Vernetzung kann zwischen zwei DNA-Strängen (Brückenbildung zwischen zwei Basen), zwei Proteinen (Brückenbildung zwischen Aminosäureresten) oder zwischen DNA-Strängen und Proteinen erfolgen

3) Verlust von Basen durch Hydrolyse der N-glykosidischen Bindungen

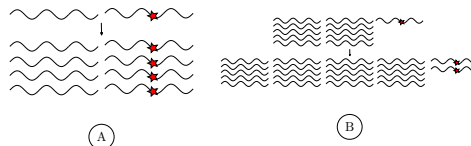


4) Fragmentierung der DNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen



5) Einbau von artifiziellen Mutationen

- während der PCR baut die Polymerase artifizielle Mutationen in basenlose bzw. vernetzte Bereiche ein
- vorhergehende Behandlung mit Formalin kann zu einer artifiziellen Mutation pro 500 Basen führen



- die Relevanz dieser Mutationen hängt von der Anfangszahl der DNA-Templates vor der PCR ab

- Ⓐ bei wenigen Templates fallen die artifiziell mutierten Bereiche bei nachfolgenden Konsensussequenzbildung stark ins Gewicht
- Ⓑ bei vielen Templates finden die artifiziell mutierten Bereiche keinen Eingang in die Konsensussequenz

Abbildung 19: Effekte von Formaldehyd auf DNA.

5.5 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die eingereichte Dissertationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht genutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Untersuchungen, die zu dieser Dissertationsschrift beigetragen haben, fanden im Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock an Präparaten der dortigen Feuchtpräparatesammlung statt. Sie wurden durchgeführt von

- Konzeption und Idee der Studie: Prof. Andreas Erbersdobler, Dr. Maja Hühns, Paula Rocktäschel
- Auswahl der Präparate und makroskopische Aufarbeitung: Paula Rocktäschel
- Anfertigung der histologischen Schnitte: Frau Susanne Höffer
- Anfertigung der immunhistologischen Schnitte: Immunhistologisches Labor unter Leitung von Frau Kerstin Westphal
- Auswertung der (immun-)histologischen Schnitte: Prof. Andreas Erbersdobler, Dr. Annette Obliers, Paula Rocktäschel
- Durchführung und Auswertung der molekulargenetischen Untersuchungen (Tumorpräparate): Dr. Maja Hühns, Paula Rocktäschel
- Durchführung und Auswertung der molekulargenetischen Nachweise von HPV und Mykobakterien: Dr. Maja Hühns, Paula Rocktäschel
- Unterscheidung verschiedener Typen des MTUB-Komplexes mittels pncA-Genes: Dr. Maja Hühns
- Statistik: Paula Rocktäschel

Rostock, 20. Dezember 2017

Paula Rocktäschel

5.6 Danksagung

Zuallererst möchte Prof. Erbersdobler danken – für die Begeisterung für meine Ideen, die Ermöglichung sowie engagierte Begleitung dieses Projektes und den enormen Vertrauensvorschuss, den ich von ihm immer wieder erfahren durfte. Außerdem danke ich Dr. Maja Hühns für die umsichtige, geduldige und engagierte Betreuung im Labor sowie die schöne und produktive Zusammenarbeit beim Verfassen unserer wissenschaftlichen Publikationen. Weiterhin danke ich Susanne Höffer sowie dem Team des immunhistologischen Labors unter Leitung von Kerstin Westphal für die Herstellung der (immun-)histologischen Schnitte und ihre Geduld mit meinen immer neuen Anfragen. Außerdem möchte ich Dr. Annette Obliers für ihr Engagement in der Rostocker Feuchtpräparatesammlung danken.

Auch außerhalb des Rostocker Instituts für Pathologie habe ich viel universitäre Unterstützung beim Erlernen des wissenschaftlichen und klinischen Handwerks erhalten. Besonders möchte ich dafür Dr. Anica Eschler, PD Dr. Timo Kirschstein, Dr. Dr. Johannes Rösche sowie Dr. Sven Diederichs herzlich danken. Ich danke Navena Widulin vom Berliner Medizinhistorischen Museum, dass sie mich in vielen Praktika an die pathologischen Präparation herangeführt und mich einen respektvollen Umgang mit diesen Präparaten gelehrt hat. Von ganzem Herzen danke ich meinem Opa für die vielen Stunden, in denen er mir zuhört oder ich ihm zuhören darf. Weiterhin möchte ich meiner Schwester Clara, Oma Christa und Oma Annelies sowie Sabine und Lutz für die Begeisterung für meine Arbeit sowie die hilfreichen Tips zum Text und zu vielen mehr danken. Viel Liebe und Dank gehört meinen Eltern, die all meine Unternehmungen und Ideen nie blockieren, sondern immer ermöglichen und mit Liebe und Verstand begleiten. Zum Schluss möchte ich diese Arbeit meinem Verlobten Tim widmen – dafür, dass er mich als Rastloser in der Wissenschaft, aber als Ruhepol im Privaten begleitet.

Literatur

- [1] Antigen Retrieval Methods. Bio-Techne Ltd (2016). url: <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/antigen-retrieval-methods>. Stand: 28.06.2016.
- [2] Die 10 häufigsten Todesfälle durch Krebserkrankungen – Sterbefälle insgesamt 2014. DESTATIS Statistisches Bundesamt (2016). url: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Krebserkrankungen.html>. Stand: 01.06.2016.
- [3] Dokumentation zum Projekt „Universitätsammlungen in Deutschland: Untersuchungen zu Bestand und Geschichte“. (2015). url: <http://www.universitaetssammlungen.de/download/Projektdokumentation.pdf>. Stand: 14.09.2015.
- [4] Empfehlungen zu wissenschaftlichen Sammlungen als Forschungsinfrastrukturen. Der Wissenschaftsrat, Berlin (2011). url: www.wissenschaftsrat.de/download/archiv/10464-11.pdf. Stand: 09.09.2015.
- [5] Empfehlungen zum Umgang mit menschlichen Überresten in Museen und Sammlungen. Deutscher Museumsbund e.V. (2013). url: http://www.museumsbund.de/fileadmin/geschaefts/dokumente/Leitfaeden_und_anderes/2013_Empfehlungen_zum_Umgang_mit_menschl_Ueberresten.pdf. Stand = 26.04.2014.
- [6] HISTOIRE DU MUSÉE. L'histoire du musée en quelques mots. Musée de l'Ecole nationale vétérinaire Maisons-Alfort (2016). url: http://musee.vet-alfort.fr/web/Musee_Fragonard/151-copie-de-le-musee-fragonard.php. Stand: 28.08.2016.
- [7] History of the College museums. The Royal College of Surgeons of England (2016). url: <https://www.rcseng.ac.uk/museums/hunterian/about-us/history>. Stand: 28.08.2016.
- [8] Minimum Requirements for Preservation and Access of Recent Heritage of Science. UNIVERSEUM Working Group on Recent Heritage of Science (2014). url: http://universeum.it/docs/UNIVERSEUM-WG-RHS_MinimumRequirements.pdf. Stand: 15.09.2015.
- [9] Statistisches Jahrbuch für das Deutsche Reich. Puttkammer & Mühlbrecht (1916). url: http://www.digizeitschriften.de/dms/img/?PID=PPN514401303_1915%7C1og2. Stand: 01.06.2016.
- [10] UMAC Resolution on Protection of University Collections. UMAC - University Museums And Collections Committee of ICOM (International Council of Museums) (2013). url: <http://publicus.culture.hu-berlin.de/umac/pdf/UMAC%20Resolution%20on%20protection%20of%20University%20collections%20final%20version.pdf>. Stand: 15.09.2015.

-
- [11] *PyroMark®Q24 User Manual*, volume 5. Qiagen®, Januar 2016.
- [12] A Akalu and J K Reichardt. A reliable PCR amplification method for microdissected tumor cells obtained from paraffin-embedded tissue. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 15(6):229–233, 1999.
- [13] S J M M Alberti. Anatomical craft: A history of medical museum practice. In R Knoeff and R Zwijnenberg, editors, *The Fate of Anatomical Collections*, The History of Medicine in Context, pages 231–246. Ashgate Publishing Limited, Surrey, 2015.
- [14] Anders-Grünewald, K and Wechsler, K. Verschiedene Methoden zum Verschließen von Naßpräparate-Gläsern. *Der Präparator*, 46(4):171–186, 2000.
- [15] S M Arend, D van Soolingen, and T H M Ottenhoff. Diagnosis and treatment of lung infection with nontuberculous mycobacteria. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 15:201–208, 2009.
- [16] B Barbian. Begreifbare Dimensionalität(en) anatomischer Objekte. Mikro- und Makroebenen einer Anatomischen Sammlung. In S Knöll, editor, *Universitäts-sammlungen, Bewahren - Forschen - Vermitteln*, pages 41–48. düsseldorf university press, Düsseldorf, 2015.
- [17] I Barnes, J Holton, D Vaira, M Spigelman, and M G Thomas. An assessment of the long-term preservation of the DNA of a bacterial pathogen in ethanol-preserved archival material. *Journal of Pathology*, 192(4):554–559, 2000.
- [18] I Barnes and M G Thomas. Evaluating bacterial pathogen DNA preservation in museum osteological collections. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 273(1587):645–653, 2006.
- [19] N Becker and S Holzmeier. Die häufigsten Todesursachengruppen in Deutschland 2012. Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg – Abteilung Epidemiologie von Krebserkrankungen (2012). url: <http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/download/kuchen.pdf>. Stand: 01.06.2016.
- [20] J Ben-Ezra, DA Johnson, J Rossi, N Cook, and A Wu. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 39(3):351–354, 1991.
- [21] T Bohnuud, D Beglov, C H Ngan, B Zerbe, D R Hall, R Brenke, S Vajda, M D Frank-Kamenetskii, and D Kozakov. Computational mapping reveals dramatic effect of Hoogsteen breathing on duplex DNA reactivity with formaldehyde. *Nucleic Acids Research*, 40(16):7644–7652, 2012.
- [22] Muñoz N Sherman M Jansen AM Peto J Schiffman MH Moreno V Kurman R Shah KV Bosch FX, Manos MM. Prevalence of human papillomavirus in cervical

- cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *Journal of the National Cancer Institute*, 87(11):796–802, 1995.
- [23] B Brinkmann, A Du Chesne, and B Vennemann. Aktuelle Daten zur Obduktionsfrequenz in Deutschland. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 127(15):791–795, 2002.
- [24] RW Byard. The use of archival tissues, organs and pathology museums: "mortui vivos docent"(let the dead teach the living). *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 3(3):175–176, 2007.
- [25] S Calvignac, J M Terme, S M Hensley, P Jalinot, A D Greenwood, and C Hänni. Ancient DNA Identification of Early 20th Century Simian T-Cell Leukemia Virus Type 1. *Molecular Biology and Evolution*, 25(6):1093–1098, 2008.
- [26] E Chan. Molecular Profiling of Colorectal Cancer. My Cancer Genome (2014). url: <https://www.mycancergenome.org/content/disease/colorectal-cancer/kras/34/>. Stand: 15.10.2015.
- [27] A K Chaturvedi, E A Engels, W F Anderson, and M L Gillison. Incidence trends for human papillomavirus – related and – unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *Journal of Clinical Oncology*, 26(4):612–619, 2008.
- [28] N J Coombs, A C Gough, and J N Primrose. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Research*, 27(16):e12–i, 1999.
- [29] D Damaraju, F Jamieson, P Chedore, and K Marras. Isolation of non-tuberculous mycobacteria among patients with pulmonary tuberculosis in Ontario, Canada. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 17(5):676–681, 2013.
- [30] H Do and A Dobrovic. Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil-DNA glycosylase. *Oncotarget*, 3(5):546–558, 2012.
- [31] M P Douglas and S O Rogers. DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 401(1-2):77–88, 1998.
- [32] J Duffin. *History of Medicine – A Scandalously Short Introduction*. Basingstoke Macmillan, 2000.
- [33] K Duval, R A Aubin, J Elliott, I Gorn-Hondermann, H C Birnboim, D Jonker, R M Fournery, and C J Fregeau. Optimized manual and automated recovery of amplifiable DNA from tissues preserved in buffered formalin and alcohol-based fixative. *Forensic Science International: Genetics*, 4(2):80–88, 2010.

-
- [34] M Y Feldman. Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 13(1):1–49, 1973.
- [35] I Ferrer, J Armstrong, S Capellari, P Parchi, Th Arzberger, J Bell, H Budka, Th Ströbel, G Giaccone, G Rossi, N Bogdanovic, P Falkai, A Schmitt, P Riederer, S Al-Sarraj, R Ravid, and H Kretzschmar. Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a BrainNet Europe study. *Brain Pathology*, 17(3):297–303, 2007.
- [36] C Fox, F Johnson, J Whiting, and P P Roller. Formaldehyde fixation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 33(8):845–853, 1985.
- [37] R French. The Anatomical Tradition. In W F Bynum and R Porter, editors, *Companion Encyclopedia of the History of Medicine*, pages 81–101. Routledge, London, 1993.
- [38] M T Gilbert, T Haselkorn, M Bunce, J J Sanchez, S B Lucas, L D Jewell, E van Marck, and M Worobey. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when. *PLoS One*, 2(6):e537, 2007.
- [39] M T Gilbert, E Willerslev, A J Hansen, I Barnes, L Rudbeck, N Lynnerup, and A Cooper. Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA. *The American Journal of Human Genetics*, 72:32–47, 2003.
- [40] M B Graeber, S Kösel, E Grasbon-Frodl, H J Möller, and P Mehraein. Histopathology and APOE genotype of the first Alzheimer disease patient, Auguste D. *Neurogenetics*, 1(3):223–228, 1998.
- [41] E Hallam and SJJM Alberti. Bodies in museums. In SJJM Alberti and E Hallam, editors, *Medical Museums: Past, Present, Future.*, pages 1–15. The Royal College of Surgeons of England, London, 2013.
- [42] N J Hardin. Infection control at autopsy: a guide for pathologists and autopsy personnel. *Current Diagnostic Pathology*, 6(2):75–83, 2000.
- [43] A Hassani and G Khan. A simple procedure for the extraction of DNA from long-term formalin-preserved brain tissues for the detection of EBV by PCR. *Experimental and Molecular Pathology*, 99(3):558–563, 2015.
- [44] Th Hodgkin. On some morbid appearances of the spleen and the absorbent glands. *Medico-Chirurgical Transactions*, 17:68–114, 1832.
- [45] M Hofreiter, V Jaenicke, D Serre, A von Haeseler, and S Pääbo. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Research*, 29(23):4793–4799, 2001.

-
- [46] Lisa Holper. *Mutationsanalysen von K-ras und p53 bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus*. PhD thesis, Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin, 2006.
- [47] M Hühns, P Röpenack, and A Erbersdobler. Molecular and Immunohistochemical Characterization of Historical Long-Term Preserved Fixed Tissues from Different Human Organs. *PloS one*, 10(8):e0135297, 2015.
- [48] D P Jackson, F A Lewis, G R Taylor, A W Boylston, and P Quirke. Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Pathology*, 43(6):499–504, 1990.
- [49] Gasińska A, Janecka A, Adamczyk A. Comparison of eight commercially available kits for DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Anal Biochem*, 476:8–10, 2015.
- [50] M M Johnson and J A Odell. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *Journal of Thoracic Disease*, 6(3):210–220, 2014.
- [51] T J Kappel, J J Reinartz, J L Schmid, J J Holter, and M M Azar. The viability of Mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed pulmonary autopsy tissue: Review of the literature and brief report. *Human Pathology*, 27(12):1361–1364, 1996.
- [52] F Lasitschka and P Schirmacher. Universitäre pathologisch-anatomische Sammlungen in Deutschland – Ergebnisse einer bundesweiten Umfrage (in: Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie). *Der Pathologe*, 35(5):529–531, 2014.
- [53] E R Long. *A History of Pathology*. Dover Publications, 1965.
- [54] M C Lourenço. Are university collections and museums still meaningful? Outline of a research project. *Museologia - An International Journal of Museology*, 2(1-2):51–60, 2002.
- [55] C Lovly, W Pao, and J Sosman. BRAF c.1799T>A (V600E) Mutation in Melanoma. My Cancer Genome (2015). url: <https://www.mycancergenome.org/content/disease/melanoma/braf/54/>. Stand: 15.10.2015.
- [56] L Lyck, I Dalmau, J Chemnitz, B Finsen, and H D Schröder. Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56(3):201–221, 2008.
- [57] S Masood, R Wasielewski, M Mengel, M Nolte, and M Werner. Influence of fixation, antibody clones, and signal amplification on steroid receptor analysis. *The Breast Journal*, 4(1):33–40, 1998.

-
- [58] A Matyssek. *Rudolph Virchow Das pathologische Museum. Geschichte einer wissenschaftlichen Sammlung um 1900*, volume 1 of *Schriften aus dem Berliner Medizinhistorischen Museum*. Steinkopff-Verlag Heidelberg, 2002.
- [59] R C Mauritz. The Pathological Tradition. In W F Bynum and R Porter, editors, *Companion Encyclopedia of the History of Medicine*, pages 169–191. Routledge, London, 1993.
- [60] H Mehanna, T Beech, T Nicholson, I El-Hariry, Ch McConkey, V Paleri, and S Roberts. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer - systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head & Neck*, 35(5):747–755, 2013.
- [61] M A Miller, J A Ramos-Vara, S B Kleiboeker, and R L Larson. Effects of delayed or prolonged fixation on immunohistochemical detection of bovine viral diarrhea virus type I in skin of two persistently infected calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(5):461–463, 2005.
- [62] I Moser, H Köhler, and C Menge. Die Tuberkulose des Rindes — überraschend wieder oder immer noch präsent? *Tierärztliche Praxis Großtiere*, 4:240–249, 2014.
- [63] H-J Möller and M B Graeber. The case described by alois alzheimer in 1911. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 248(3):111–122, 1998.
- [64] H Nizze. Pathologie in Rostock. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*, 88:10–25, 2004. url: https://pathologie.med.uni-rostock.de/fileadmin/Institute/patho/Pathologie_in_Rostock.pdf. Stand: 07.10.2015.
- [65] J B A Okello, J Zurek, A M Devault, M Kuch, A L Okwi, N K Sewankambo, G S Bimenya, D Poinar, and H N Poinar. Comparison of methods in the recovery of nucleic acids from archival formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues. *Analytical Biochemistry*, 400(1):110–117, 2010.
- [66] S Paireder, B Werner, J Bailer, W Werther, E Schmid, B Patzak, and M Cichna-Markl. Comparison of protocols for DNA extraction from long-term preserved formalin fixed tissues. *Analytical Biochemistry*, 439(2):152–160, 2013.
- [67] D M Parkin. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer*, 118(12):3030–3044, 2006.
- [68] R N Poston. A new look at the original cases of Hodgkin’s disease. *Cancer Treatment Reviews*, 25(3):151–155, 1999.
- [69] D M Reed. On the pathological changes in Hodgkin’s disease, with especial reference to tuberculosis. *Johns Hopkins Hospital Reports*, 10:133–196, 1902.

-
- [70] H E Remmele W, Stegner. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Der Pathologe*, 8:138–140, 1987.
- [71] D Rodríguez, R Bastida, and P E Olsson. DNA extraction from formalin-fixed Franciscana tissues. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 1(1):123–128, 2002.
- [72] C Röcken, N Widulin, and T Schnalke. Die Amyloidosen des Berliner Medizinhistorischen Museums der Charité. *Der Pathologe*, 30(3):226–234, 2009.
- [73] M C L G Santos, C P B Saito, and S R P Line. Extraction of genomic DNA from paraffin-embedded tissue sections of human fetuses fixed and stored in formalin for long periods. *Pathology-Research and Practice*, 204(9):633–636, 2008.
- [74] S Santos, D Sa, E Bastos, H Guedes-Pinto, I Gut, F Gärtner, and R Chaves. An efficient protocol for genomic DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Research in Veterinary Science*, 86(3):421–426, 2009.
- [75] A Savioz, J-L Blouin, S Guidi, S E Antonarakis, and C Bouras. A method for the extraction of genomic DNA from human brain tissue fixed and stored in formalin for many years. *Acta Neuropathologica*, 93(4):408–413, 1997.
- [76] N W Schluger. Tuberculosis and Non-tuberculous Mycobacterial Infections in Older Adults. *Clinics in Chest Medicine*, 28(4):773–vi, 2007.
- [77] Schreiber, F. Zur Historie und Lehrwirksamkeit pathologischer Sammlungen. (einzusehen im Institut für Pathologie, Universität Rostock).
- [78] E W Schwarze and J Pawlitschko. Autopsie in Deutschland. Derzeitiger Stand, Gründe für den Rückgang der Obduktionszahlen und deren Folgen. *Deutsches Ärzteblatt*, 100(43):2802–2808, 2003.
- [79] R. Sedivy, T. Kolomaznik, A. Uhl, and B. Patzak. *Pathologie in Fallstudien: Historische Präparate neu betrachtet*. SpringerLink: Springer e-Books. Springer-Verlag, 2007.
- [80] R Sedivy and B Patzak. Pancreatic diseases past and present: a historical examination of exhibition specimens from the Collectio Rokitansky in Vienna. *Virchows Archiv*, 441(1):12–18, 2002.
- [81] E Seidl. Laboratorien des Wissens. Die Sammlungen des Museums der Universität Tübingen MUT. In S Knöll, editor, *Universitätsammlungen, Bewahren - Forschen - Vermitteln*, pages 27 – 40. düsseldorf university press, Düsseldorf, 2015.
- [82] Sh Shi, R J Cote, L Wu, Ch Liu, R Datar, Y Shi, D Liu, H Lim, and C R Taylor. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based

- on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 50(8):1005–1011, 2002.
- [83] F L E Sposito, P A Z Campanerut, L D Ghiraldi, C Q F Leite, M H Hirata, R D C Hirata, V L D Siqueira, and R F Cardoso. Multiplex-PCR for differentiation of *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3):841–843, 2014.
- [84] E C Spray. Health and Medicine in the Enlightenment. In M Jackson, editor, *The Oxford Handbook of the History of Medicine*. Oxford University Press, 2011.
- [85] M Srinivasan, D Sedmak, and S Jewell. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *The American Journal of Pathology*, 161(6):1961–1971, 2002.
- [86] C Sternberg. Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberculose des lymphatischen Apparates. *Zeitschrift für Heilkunde*, 19:21–90, 1898.
- [87] R W Stoddart. Fixatives and Preservatives: Their Effects on Tissue. In C V Horie, editor, *Conservation of natural history specimens spirit collections*, pages 1–26. The Manchester Museum and Department of Environmental Biology, The University of Manchester, 1989.
- [88] M J Stone. Thomas Hodgkin: medical immortal and uncompromising idealist. *Proceedings (Baylor University Medical Center)*, 18(4):368, 2005.
- [89] G J Tortora, B R Funke, and C L Case, editors. *Microbiology. An Introduction*, volume 11. Pearson, 2013.
- [90] Y Tsutsumi. Demonstration of Epstein-Barr virus genome in archival paraffin sections of Hodgkin’s lymphoma autopsied by Dr. Thomas Hodgkin nearly 170 years ago. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 36(6):511–514, 2003.
- [91] Ph van der Eijk. Medicine and Health in the Graeco-Roman World. In M Jackson, editor, *The Oxford Handbook of the History of Medicine*. Oxford University Press, 2011.
- [92] D Vershelde. The university museum: respecting old values, embracing new directions. In *Encountering Limits: The University Museum Proceedings of the 12th Conference of the International Committee of ICOM for University Museums and Collections (UMAC) Singapore, 10st-12th October 2012*, pages 69–74. International Committee for University Museums and Collections (UMAC), 2014.
- [93] M M Walker and J H Barn. Hunterian peptic ulcers and *Helicobacter pylori*. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 79(5):368–371, 1997.

-
- [94] B Y Wang, M J Amolat, P Woo, and M Brandwein-Gensler. Atypical mycobacteriosis of the larynx: an unusual clinical presentation secondary to steroids inhalation. *Annals of Diagnostic Pathology*, 12(6):426–429, 2008.
- [95] C Weber. Zur gegenwärtigen Situation der universitären Sammlungen. In C Weber and K Mauersberger, editors, *Universitätsmuseen und -sammlungen im Hochschulalltag. Aufgaben, Konzepte, Perspektiven. Beiträge zum Symposium des Hermann von Helmholtz-Zentrums für Kulturtechnik in Zusammenarbeit mit dem Berliner Medizinhistorischen Museum der Charité 18. - 20. Februar 2010*, pages 3–9, 2010.
- [96] C Weber. Universitätssammlungen. In Mainz Leibniz-Institut für Europäische Geschichte (IEG), editor, *Europäische Geschichte Online (EGO)*. 2012. Stand: 09.09.2015.
- [97] C Weber and K Mauersberger. *Universitätsmuseen und -sammlungen im Hochschulalltag. Aufgaben, Konzepte, Perspektiven. Beiträge zum Symposium des Hermann von Helmholtz-Zentrums für Kulturtechnik in Zusammenarbeit mit dem Berliner Medizinhistorischen Museum der Charité 18. - 20. Februar 2010*, chapter Vorwort. 2010.
- [98] J D Webster, M A Miller, D DuSold, and J Ramos-Vara. Effects of prolonged formalin fixation on diagnostic immunohistochemistry in domestic animals. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 57(8):753–761, 2009.
- [99] M Werner, A Chott, A Fabiano, and H Battifora. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *The American Journal of Surgical Pathology*, 24(7):1016–1019, 2000.
- [100] G Westermarck, P and Nilsson. Demonstration of amyloid A protein in old museum specimens. *Archives of Pathology Laboratory Medicine*, 108(3):217–219, 1984.
- [101] S Wilks. Cases of enlargement of the lymphatic glands and spleen (or Hodgkin’s disease) with remarks. *Guy’s Hospital Reports*, 11:56–67, 1865.
- [102] C Williams, F Pontén, C Moberg, P Söderkvist, M Uhlén, J Pontén, G Sitbon, and J Lundeberg. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *American Journal of Pathology*, 155(5):1467–1471, 1999.
- [103] G L Woods and J A Washington. Mycobacteria other than mycobacterium tuberculosis: Review of microbiologic and clinical aspects. *Review of Infectious Diseases*, 9(2):275–293, 1987.
- [104] M Yasui, S Matsui, M Ihara, Y R S Laxmi, S Shibutani, and T Matsuda. Translesional synthesis on a DNA template containing N2-methyl-2,-deoxyguanosine catalyzed by the Klenow fragment of Escherichia coli DNA polymerase I. *Nucleic Acids Research*, 29(9):1994–2001, 2001.

- [105] Ying Zhang, Mary Margaret Wade, Angelo Scorpio, Hao Zhang, and Zhonghe Sun. Mode of action of pyrazinamide: disruption of mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(5):790–795, 2003.
- [106] A R Zink and A G Nerlich. Molecular strain identification of the Mycobacterium tuberculosis complex in archival tissue samples. *Journal of Clinical Pathology*, 57(11):1185–1192, 2004.
- [107] H zur Hausen. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. In W Arber, W Henle, P H Hofschneider, J H Humphrey, J Klein, P Koldovsky, H Koprowski, O Maaløe, F Melchers, R Rott, H G Schweiger, L Syruček, and P K Vogt, editors, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, volume 78, pages 1–30. Springer, Berlin, Heidelberg, 1977.