

DEPARTEMENT PATHOLOGIE
DER UNIVERSITÄT ZÜRICH

ALLGEMEINE PATHOLOGIE

Auflage 2006/2007

www.pathol.unizh.ch/histologiekurs

Inhaltsverzeichnis

I	Lernziele und Stoffkatalog	1
	Lernziele	2
	Stoffkatalog	2
II	Begriffe.....	5
III	Aufgaben und Untersuchungsmethoden der Pathologie	15
	Aufgaben der Pathologie.....	16
	Untersuchungsmethoden der Pathologie.....	17
IV	Mikroskopischer Kurs.....	38
	1. Systematisches Vorgehen.....	39
	2. Liste der Präparate.....	40
	3. Glossar der verwendeten Färbungen	46
	4. Beschreibung der Präparate	50
	Zell- und Gewebsreaktionen	51
	Zelluläre Adaptation von Wachstum und Differenzierung	68
	Extrazelluläre Matrix.....	78
	Weitere zelluläre und extrazelluläre Veränderungen	89
	Kreislaufstörungen	95
	Entzündung	107
	Tumoren	124
	Genetische Krankheiten.....	157

Siehe auch online Histopathologiekurs unter
www.pathol.unizh.ch/histologiekurs

Lernziele und Stoffkatalog

Lernziele

Vermittlung pathogenetischer Prinzipien auf der Ebene von Zellen, Geweben und des Organismus

Schulung des biologischen Denkens, der Beobachtung, des Erkennens wichtiger Zusammenhänge

Besprechung und Demonstration wesentlicher morphologischer Techniken

Stoffkatalog

ZELLADAPTATION UND ZELLSCHADEN

ÄTIOLOGIE

HYPOXIE

PHYSIKALISCHE SCHÄDEN

CHEMIKALIEN UND MEDIKAMENTE

INFEKTE

IMMUNOLOGISCHE REAKTIONEN

GENETISCHE DEFEKTE

ERNÄHRUNGSSCHÄDEN

PATHOGENESE

WICHTIGE, AM ZELLSCHADEN BETEILIGTE INTRAZELLULÄRE SYSTEME

HYPOXIE UND ISCHÄMIE

SCHÄDEN DURCH FREIE RADIKALE

CHEMISCHE SCHÄDEN

VIRUSINFEKTE

MORPHOLOGIE GESCHÄDIGTER ZELLEN

REVERSIBLER UND IRREVERSIBLER SCHADEN

ZELLTOD

NEKROSE

TYPEN DER NEKROSE

APOPTOSE

INTRAZELLULÄRE ABLAGERUNGEN

ZELLULÄRE ADAPTATION VON WACHSTUM UND DIFFERENZIERUNG

ATROPHIE

HYPERTROPHIE

HYPERPLASIE

METAPLASIE

DYSPLASIE

(NEOPLASIE)

WEITERE ZELLULÄRE UND EXTRAZELLULÄRE VERÄNDERUNGEN

VERKALKUNGEN

URATE

BETA-FIBRILLOSE (AMYLOIDOSE)

FIBRINOID, FIBRINOIDE NEKROSE

ZELLADHÄSIONSMOLEKÜLE, MATRIXREZEPTOREN

ANGEBORENE UND ERWORBENE STÖRUNGEN DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX (KOLLAGEN, BASALMEMBRANEN, ELASTIN, PROTEOGLYCANE)

HYALIN, FIBRINOID, FIBRINOIDE NEKROSE

REAKTIONEN UND KRANKHEITEN DES ORGANISMUS

KREISLAUF

ÖDEM, STAUUNG, THROMBOSE, EMBOLIE, BLUTUNG
INFARKT
DISSEMINIERTE INTRAVASALE GERINNUNG (DIC)
SCHOCK
ARTERIOSKLEROSE
ANEURYSMEN

ENTZÜNDUNG

ALLG. - URSACHEN
ZELLEN UND MEDIATOREN
EINTEILUNGSMÖGLICHKEITEN
Allg. nach Organ
Ätiologie (nach Noxe)
Morphologische Kriterien
Zeitlicher Verlauf
Ausbreitungswege
VERLAUF/REGENERATION/REPARATION/NARBE
SPEZIELLE ENTZÜNDLICHE REAKTIONSFORMEN

IMMUNPATHOLOGIE

ANTIGENITÄT - IMMUNOGENITÄT
IMMUNDEFEKTE
TYP I, II, III, IV REAKTIONEN
SCHADEN DURCH MECHANISMEN DES IMMUNSCHUTZES
SELBST - NICHT SELBST - TOLERANZ
HLA-KRANKHEITSASSOZIATION

IMMUNKRANKHEITEN

ASTHMA BRONCHIALE
CHRONISCHE LYMPHOZYTÄRE THYREOIDITIS (HASHIMOTO)
HYPERTHYREOSE (M. BASEDOW; GRAVES' DISEASE)
GLOMERULONEPHRITIDEN
ARTERIITIDEN
SKLEROIDERMIE
RHEUMATOIDE ARTHRITIS
HOST-VERSUS-GRAFT-REACTION
GRAFT-VERSUS-HOST-REACTION

TUMOREN

Definitionen
Nomenklatur
Epidemiologie
Charakteristika
Biologie des Tumorwachstums

DIGNITÄT

Benigne Tumoren
Maligne Tumoren
Semimaligne Tumoren
Tumoren fraglicher Dignität
In situ Karzinome
Präkanzerose

MALIGNITÄTSKRITERIEN

METASTASIERUNG

Definition

Metastasierungswege

Metastasierungsschritte

Effekte von Tumoren auf den Wirt

Staging

Diagnostik

 Zytologie

 Histologie

 Schnellschnittverfahren

 Färbeverfahren

 Immunzytochemie

 In situ Hybridisierung

KARZINOGENESE

Chemische Kanzerogene

Wirkungsmechanismus

 Organspezifische Bioaktivierung

 Reaktion ultimaler Kanzerogene mit der DNA

 DNA-Reparatur

Stadien der Tumorentstehung

 Initiation

 Promotion

 Progression

 Metastasierung

Physikalische Kanzerogene: Ionisierende Strahlen

Tumorgenetik

 Onkogene

 Tumor-Suppression

 Genetische Tumorprädisposition

Begriffe

Begriff	Definition
Abszess	Umschriebene, abgekapselte Ansammlung neutrophiler Granulozyten mit Gewebsnekrose und Ausbildung einer Abszesshöhle
Aetiologie	Lehre von den Krankheitsursachen. Heute auch: Auslösende Krankheitsursache
Agenesie	Fehlen der embryonalen Anlage eines Organes
Amyloid	Lichtmikroskopisch homogene, glasig durchscheinende Substanz. Gemeinsamer Nenner: β -Fibrillose, d.h. β -Konformation der darin enthaltenen Stoffe und Unlöslichkeit (verminderte oder fehlende Abbaubarkeit durch den Organismus). Es können verschiedene chemische Substanzen zu Amyloidablagerungen führen, z.B. Immunglobuline, Proteine, Proteohormone
Anämie	Verminderung der Erythrozytenzahl oder des Hämoglobingehaltes im strömenden Blut
Aneurysma	Umschriebene, meist asymmetrische permanente Erweiterung einer Arterie infolge einer angeborenen oder erworbenen Wandveränderung
Antigen	Substanz, die in der Lage ist, eine spezifische Immunantwort auszulösen
Antigen, komplettes	Synonym: Vollantigen, Immunogen. Löst eine Immunantwort aus
Antikörper	Immunglobulin, das als spezifisches Reaktionsprodukt von Plasmazellen gegen Antigene gebildet wird
Aplasie	Fehlendes Wachstum und fehlende Ausdifferenzierung eines Organes bei vorhandener embryonaler Anlage
Apoptose	Eine Form des Zelltodes. Genetisch programmierter Zelltod, erfolgt durch Erlöschen der Zellfunktionen und darauffolgenden Abbau der Zelle. "Herabfallen". Zellen in einem Gewebe, welches der Apoptose unterliegt, fallen allmählich und an verschiedenen Stellen wie geschrumpfte und dürre Blätter von einem Baum ab. (s. auch Regeneration, physiologische)
Arteriiosklerose	Hyalinisierung der Gefäßwand von Arteriolen
Arteriosklerose	Zusammenfassender Ausdruck aller Veränderungen der Arterienwand, die zur Sklerosierung führen: "Mit Elastizitätsverlust einhergehende Verdickung und Verhärtung der Arterienwand"
Aszites	Hydraskos, Bauchwassersucht: Ansammlung klarer seröser Flüssigkeit im Peritonealraum. Meist Folge kardialer und/oder portaler Stauung, einer Hypoalbuminämie oder einer Natrium - und nachfolgenden Wasserretention im Organismus.
Atherosklerose	Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus herdförmiger Einlagerung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlehydraten (vor allem Glykoproteinen), Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalk, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia. Charakteristisch

	sind Atherome der Intima (Atherom = plaque)
Atresie	Fehlen einer Körperöffnung oder umschriebenes Fehlen des Lumens eines Hohlorganes
Atrophie	Verkleinerung eines primär regelrecht entwickelten und normalgrossen Organes, Gewebes oder Zellen (Adaptation an ein niedrigeres energetisches Fließgleichgewicht)
Atrophie, einfache	Verkleinerung eines Organes oder Gewebes durch Grössenabnahme der einzelnen Zellen bei gleichbleibender Zellzahl
Atrophie, numerische	Verminderung der Zellzahl in einem Organ: Zellabbau durch Apoptose (s. dort) überwiegt die Regeneration
Autoimmunkrankheit	Erkrankung, die durch immunologische Reaktionen gegen körpereigene Antigene entsteht
Autolyse	Postmortaler enzymatischer Abbau von Gewebe und Zellen
Autopsie	Leichenöffnung, Sektion, Obduktion
Bakteriämie	Anwesenheit von apathogenen Bakterien im Blut. Dauert meist nur kurze Zeit und wird durch Abwehrsystem abgefangen. S. auch Sepsis
Bakterium	Prokaryontischer Einzeller, Vermehrung durch Querteilung, können auf zellfreien Nährböden gezüchtet werden
Biopsie	Gewinnung von Gewebeproben am lebenden Menschen durch Nadelpunktion oder mit Hilfe spezieller Instrumente (Knipsbiopsie, Saugbiopsie, Zangenbiopsie, Nadelbiopsie)
Blastopathien	Störungen, die auf eine Schädigung während der Blastogenese (Tag 0 bis 18) zurückzuführen sind
Blutung	Blutaustritt aus Gefässen in das umgebende Gewebe, an Oberflächen oder in Körperhöhlen
Carcinoma in situ	Präinvasives Stadium eines malignen epithelialen Tumors. Die zytologischen Kriterien der Malignität sind in den Zellen vorhanden, jedoch haben diese die Basalmembran (noch) nicht durchbrochen
Choristom	Tumorartige Bildung, die aus ortsfremdem Gewebe besteht (Verlagerung dieses Gewebes während der Embryonalperiode?)
Diathese, hämorrhagische	Erhöhte Blutungsbereitschaft in Form generalisierter Blutungen ohne adäquate Ursache oder in Form verstärkter oder verlängerter Blutungen nach verschiedenen Ursachen
Dignität	"Wert, Bedeutung": Angabe über das voraussichtliche biologische Verhalten eines Tumors
Dysgenese	Entwicklung eines Organes zu abnormer Organstruktur und unzureichender Differenzierung. Wird auch als Dysplasie bezeichnet, dies kann jedoch zu Missverständnissen führen (siehe Dysplasie)
Dysplasie	1. Im Rahmen der neoplastischen Transformation von Zellen und Geweben: Störung der Architektur eines Gewebes (vor allem von Epithelien), Polymorphie von Zellen und Zellkernen, meist auch atypisch

	gelagerte Mitosen.
	2. Im Rahmen der Entstehung einer Missbildung: Fehlentwicklung eines Organs mit Störung der Differenzierung
Dysraphie	Missbildungen infolge von Verschlussstörungen embryonaler Verwachsungslinien
Ektasie	Nicht umschriebene, d.h. diffuse, meist zylindrische Erweiterung einer Arterie, Vene oder von Ausführgängen, auch ohne wesentliche Wanderkrankung
Embryopathien	Störungen, die auf eine Schädigung während der Embryogenese (Tag 18 bis Ende des 3. Monates) zurückzuführen sind
Empyem	Ansammlung von Eiter in Körperhöhlen oder in einem Hohlorgan
Endokarditis	Entzündung des Endokardes, vor allem der Herzklappen, weniger oft der Sehnenfäden oder des Vorhofendokards
Endotoxin	Thermostabile Bestandteile des Bakterium: Proteine, Lipide und Polysaccharide. Werden beim Zerfall (Tod) des Bakterium freigesetzt und können zum Endotoxinschock führen
Entzündung	Komplexe Reaktion des Organismus auf Zell- oder Gewebsschäden: Umfasst alle biochemischen und immunologischen Reaktionen sowie strukturelle Veränderungen, die einer Läsion folgen, z.B. Vasodilatation, Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen, Bildung eines Granulationsgewebes, später evtl. einer Narbe
Entzündung, eitrige	Entzündung mit überwiegendem Anteil von neutrophilen Granulozyten im Exsudat
Erosion	Umschriebener, oberflächlicher Zellverlust in der Epidermis (bis zur Basalmembran) oder einer Schleimhaut (bis zur Lamina muscularis mucosae im Magen-Darm-Trakt). S. auch Ulkus
Exfoliativzytologie	Untersuchung von Zellen, die sich von Oberflächen abgelöst haben oder von Zellen, die durch direkte Abstrichentnahme (Wattebausch, Bürste) gewonnen wurden. S. auch Zytologie.
Exotoxin (Ektotoxin)	Thermolabile Stoffwechselprodukte (oft Proteine), die von Bakterien abgegeben werden, ohne dass das Bakterium dabei zugrundegeht
Exsudat	Eiweissreiche Flüssigkeit, die im Rahmen einer Entzündung infolge erhöhter Gefässpermeabilität aus den Gefässen in das Interstitium oder an Oberflächen austritt
Fetopathien	Störungen, die auf eine Schädigung während der Fetogenese (4. Monat bis zur Geburt) zurückzuführen sind
Fibrinoid	Lichtmikroskopisch homogene, leicht lichtbrechende Veränderung des Gewebes, die färberisch einige Eigenschaften des Fibrins zeigt. Liegt immer extrazellulär. Enthält nekrotisches Gewebe, Blutplasma und Fibrin. Wird vor allem in Form einer fibrinoiden Nekrose des Bindegewebes gesehen, z.B. bei chronischer Polyarthrit, Arteriitiden und Lupus erythematodes, d.h. bei immunologischen Erkrankungen

Fistel	Angeborene oder erworbene pathologische, gangförmige Verbindung zwischen Hohlorgan oder Höhlen und Körperoberflächen (Fistula -> röhrenförmiges Geschwür)
Furunkel	Abszess in einem Haarfollikel
Gametopathien	Störungen, die auf abnorme Gameten zurückzuführen sind, meist Genmutationen
Gesundheit	Zustand völligen körperlichen, seelischen und sozialen Wohlbefindens (WHO), d.h. das subjektive Fehlen körperlicher und seelischer Störungen bzw. die Nichtnachweisbarkeit entsprechender krankhafter Veränderungen
Granulationsgewebe	Entsteht im Rahmen von Entzündungen und nach einer Nekrose, leitet die Reparatur ein und besteht aus Makrophagen, Fibroblasten, neugebildeten Kapillaren
Granulom	Kleines Knötchen, Durchmesser 0.1 - 2 mm. Besteht in der Regel aus (häufig radiär angeordneten) Makrophagen, Lymphozyten und (inobligat) mehrkernigen Riesenzellen, in der Peripherie aus einem Fibroblastensaum
Hamartom	Dysontogenetische, d.h. während der Embryonalentwicklung entstandene tumorartige Fehlentwicklung, welche einzelne Gewebekomponenten des betreffenden Organes enthält. Ein Hamartom ist oft ein Knoten, der einem Tumor ähnlich sieht
Hapten	Inkomplettes Antigen, wird von Antikörpern erkannt, löst nur in Verbindung mit einem Trägerprotein eine Immunantwort aus
Herzbeutel-tamponade	Flüssigkeitsansammlung im geschlossenen Herzbeutel Tamponade ist ein Begriff aus der Chirurgie: Festes Ausstopfen von Wundhöhlen
Hyalin	Lichtmikroskopisch homogene Substanz mit deutlicher Lichtbrechung und Anfärbbarkeit durch Eosin Rein deskriptiver morphologischer Begriff, der keine Aussage über die chemische Zusammensetzung des Materials enthält. Der Ausdruck "Hyalinisierung" wird heute vor allem noch bei regressiven Veränderungen im Bindegewebe, Lymphknoten und Corpora albicantia gebraucht
Hydrothorax	"Pleuraerguss", Ansammlung seröser Flüssigkeit im Pleuraraum
Hyperplasie	Grössenzunahme eines Organes oder Gewebes durch Zunahme der Zellzahl (wird auch numerische Hypertrophie genannt)
Hypertonie	Nach WHO jeder Blutdruckwert, der systolisch über 160 mmHg und diastolisch über 95 mmHg liegt
Hypertrophie	Grössenzunahme eines Organes oder Gewebes durch Vergrößerung der Einzelzellen, ohne Zunahme der Zellzahl. Anpassung von obligat post-mitotischen Zellen und Geweben an ein erhöhtes energetisches Fließgleichgewicht
Hypoplasie	Ungenügende Grössenentwicklung und/oder Differenzierung eines Organes bei vorhandener embryonaler Anlage
Hypoxie	Alle Zustände verminderten O ₂ -Gehaltes in Zellen, die mit einer Störung

	der oxydativen Energiegewinnung in Geweben einhergehen
Hypoxämie	Verminderter Sauerstoffgehalt des Blutes
Immunität	Erworbene spezifische Abwehr gegenüber Infektionen und Toxinen
Immunogen	Antigen, welches eine Immunantwort auslösen kann
Immunologische Ueberempfindlichkeitsreaktion Typ I	Anaphylaktischer oder Soforttyp der Ueberempfindlichkeitsreaktion (meistens IgE-abhängig)
Immunologische Ueberempfindlichkeitsreaktion Typ II	Zytotoxischer Typ (Ig-abhängig)
Immunologische Ueberempfindlichkeitsreaktion Typ III	Immunkomplex-Typ
Immunologische Ueberempfindlichkeitsreaktion Typ IV	Verzögerte Immunreaktion (T-Zell-abhängig)
Infarkt	Ischämische Nekrose einer Gewebsregion
Infarkt, anämischer	Nekrose der gefässabhängigen Gewebsregion nach Verschluss einer zuführenden Arterie durch Arteriosklerose oder Thrombose oder infolge einer kritischen, grenzüberschreitenden Stenose der versorgenden Arterie
Infarkt, hämorrhagischer	Vaskulär bedingte Nekrose mit Einblutung. Formen: 1. Nekrose infolge Verschlusses eines arteriellen Systems bei noch erhaltener Blutzufuhr eines zweiten Gefässsystems, welches aber die Nekrose nicht verhindern kann (z.B. in Lunge und Leber) 2. Nekrose infolge Verschlusses abführender Venen, meist durch Thrombosen 3. Bluteinstrom über arterielle oder venöse Kollateralen in einen zunächst anämischen Infarkt (z.B. im Darm)
Initiation	Karzinogenese: Transformation einer Zelle in eine neoplastische Zelle durch einen karzinogenen Faktor
Invasion	Charakteristikum eines malignen Tumors: Direktes Eindringen von Tumorzellen in das umgebende Gewebe mit Zerstörung desselben
Inzidenz	Neuerkrankungsziffer bezogen auf einen bestimmten Zeitraum und alle nicht erkrankten Personen einer definierten Bevölkerung
Ischämie	Inadäquate Blutversorgung (ungenügende Durchblutung) eines Organs oder des Teiles eines Organs
Karbunkel	Mehrere konfluierende Furunkel
Komplementsystem	Aus zahlreichen Glykoproteinen bestehendes, komplexes Enzymsystem, reagiert als Kaskade
Karzinogen	Faktor (chemische Substanz, Virus, ionisierende Strahlen etc.), der

Karzinogenese	maligne Tumoren induzieren kann Ursache und Entstehung maligner Tumoren
Karzinom	Maligner Tumor, der aus Zellen mit epitheliale Phänotyp besteht
Krankheit	Subjektive oder objektive Störung der körperlichen und geistig-seelischen Gesundheit. S. auch Gesundheit
Krebs	Dieser Ausdruck umfasst jeden malignen Tumor
Letalität	Anzahl der an einer bestimmten Krankheit Verstorbenen, bezogen auf die Zahl der daran Erkrankten
Metaplasie	Reversible Umwandlung eines differenzierten Gewebes in ein anderes differenziertes Gewebe, z.B. Plattenepithelmetaplasie des respiratorischen Epithels
Metastase	Räumlich vom Primärtumor getrennte Tochtergeschwulst, die durch Verschleppung von Tumorzellen entstanden ist
Missbildung	Fehlbildung von Organen infolge einer Störung der intrauterinen Entwicklung
Missbildungssyndrom	Charakteristische Kombination von Missbildungen
Morbidität	Häufigkeit einer Erkrankung, definiert als Verhältnis der Zahl der erkrankten Personen zur Zahl der gesamten Bevölkerung in einem bestimmten Zeitraum. Im allgemeinen wird berechnet die Zahl der Erkrankten/100'000 Einwohner/Jahr
Mortalität	Verhältnis der Zahl der Todesfälle zur Zahl der Gesamtbevölkerung in einem bestimmten Zeitraum. Im allgemeinen Zahl der an einer Krankheit Verstorbenen/100'000 Einwohner/Jahr
Nekrose	Morphologische Veränderung, die dem Untergang eines umschriebenen Gewebebezirkes oder einzelner Zellen im lebenden Organismus folgt. Koagulation von Proteinen mit langsamem enzymatischem Abbau und Organisation durch Granulationsgewebe, Entstehung einer Narbe. Kolliquation (Verflüssigung): Rascher enzymatischer Abbau des abgestorbenen Gewebes. Oft bleibt ein Hohlraum zurück (Pseudozyste)
Neoplasie	Tumor
Nosologie	Lehre von den Krankheiten (nosos -> griechisch Krankheit). Die Begriffe Pathologie und Nosologie werden oft synonym verwendet
Oedem	Vermehrte Ansammlung seröser, nicht gerinnender Flüssigkeit in Zellen oder im Interstitium von Geweben
Oedem	Synonyme: Hydropische Zellschwellung, trübe intrazelluläres Schwellung Zellvergrößerung (Zytoplasma, weniger des Kernes) infolge vermehrten Einstromes von Natrium, Kalzium und Wasser
Oligämie	Verminderung der zirkulierenden Blutmenge

Onkogen	Gen, welches über ein Protein das Tumorwachstum induziert. Mutiertes oder dysreguliertes Allel von normalen zellulären Genen, welche als "Protoonkogene" bezeichnet werden. Wirkt meist dominant
Paraneoplasie	Paraneoplastische Syndrome sind Fernwirkungen, bedingt durch eine Stoffwechsellistung eines Tumors, unabhängig von dessen Lokalisation, Grösse oder Struktur. Paraneoplastisch entstehen z.B. das Tumorfieber, tumorinduzierte Anämien, hormonähnliche Wirkungen
Pathologie	Krankheitslehre und Krankheitserforschung (pathos -> griechisch Leiden, logos -> griechisch Lehre; Pathologie -> "Lehre von den Leiden")
Pathogenese	Ablauf des Krankheitsvorganges als Folge des auslösenden Ereignisses
Phlegmone	Nicht begrenzte, diffuse Ausbreitung von Bakterien und Granulozyten im Gewebe
Polymorphie (Pleomorphie)	Begriff in der Zytologie: Auftreten verschiedener Grössen und Formen von Zellen und Zellkernen in einem Gewebe
Polyp	Umschriebene Veränderung (meist ein Tumor), welche über die sonst flache Oberfläche eines Epithels oder einer Schleimhaut herausragt
Präkanzerose	Krankheit mit hohem Tumorrisiko, d.h. statistisch gesicherter häufiger Uebergang in bösartigen Tumor
Prävalenz	Umfang eines Krankheitsbildes innerhalb einer definierten Population zu einem Stichdatum
Probeexzision	Chirurgische Gewebentnahme zur histologischen Untersuchung
Prognose	Erwarteter Verlauf einer Krankheit
Promotor	Begriff im Rahmen der Karzinogenese: (Meist) chemische Substanz ohne eigentliche karzinogene Wirkung, welche die Inzidenz eines malignen Tumors in einem früher einem Karzinogen exponierten Gewebe steigert
Punktionszytologie	Aspiration von Zellen mit Hilfe von Punktionsnadeln
Regeneration	Behebung eines Zell- oder Gewebsverlustes, "Restitutio ad integrum"
Regeneration, physiologische	Ersatz abgestossener oder abgebauter Zellen in Geweben mit physiologischem Zellverlust (s. auch Apoptose)
Regression	Rückbildung eines Tumors oder einer anderen Läsion
Reparation	Ersatzgewebsbildung: Entstehung einer Narbe
Resistenz	Summe aller Schutzmechanismen des Organismus gegenüber Einflüssen, die seine funktionelle oder strukturelle Organisation stören können

Restitutio ad integrum	Völlige Heilung bzw. vollständige Wiederherstellung, ohne bleibenden Defekt
Rezidiv	Erneutes Auftreten eines Tumors oder einer anderen Krankheit nach symptomfreiem Intervall
Sarkom	Maligner Tumor, der aus Zellen mit mesenchyalem Phänotyp besteht
Schock	Zirkulationsinsuffizienz infolge eines Missverhältnisses zwischen dem fließenden Blutvolumen und der Volumenkapazität des Gefäßsystems
Schnellschnittuntersuchung	Intraoperative histologische Untersuchung von exzidiertem Gewebe am Gefrierschnitt
Sepsis	Einschwemmung von Bakterien in das Blut bei ungenügender Abwehrlage des Organismus. Schwere Krankheitserscheinungen mit Fieber und Schüttelfrost. S. auch Bakteriämie
Stenose	Einengung eines Lumens (Blutgefäss, Magen-Darm-Trakt und andere Hohlorgane)
Stoffwechselkrankheiten, angeborene Teratogene Determinationsperiode	Stoffwechselstörungen entstehen durch Genmutationen, meist mit konsekutivem Enzymdefekt Kritischer Zeitraum, in welchem eine sich entwickelnde Organanlage empfindlich gegenüber Umweltschäden reagiert. Die Determinationsperiode ist für die Lokalisation und Art von Missbildungen von entscheidender Bedeutung
Teratom	Tumor, der wahrscheinlich aus pluripotenten Zellen entsteht und dementsprechend verschiedenartige Gewebe ausbilden kann Reifes Teratom: Ausgereifte Gewebskomponenten. Meist gutartig Unreifes Teratom (embryonales Teratom) mit wenig differenzierten, embryonal anmutenden, epithelialen und mesenchymalen Geweben. Meist bösartig
Thrombose	Intravitale intravasale Blutgerinnung, zu unterscheiden vom sog. Leichengerinnsel, d.h. der postmortalen intravasalen Gerinnung
Tod	"Exitus letalis". Irreversibles Versagen aller lebenserhaltenden Prozesse, d.h. Stillstand von Atmung, Kreislauf und Aktivität des Zentralnervensystems
Transformation, maligne	Durch Karzinogene (chemisch, ionisierende Strahlen, onkogene Viren) hervorgerufene Mutationen in der DNA von Zellen. Diese Mutation wird auf die Tochterzellen übertragen. S. auch Tumor
Tumor	Neugebildetes Gewebe mit fortschreitender Proliferation seiner Zellen. Diese Proliferation wird infolge einer genetisch determinierten Zelltransformation ungenügend reguliert oder ist autonom. S. auch Transformation, maligne
Tumor, bösartiger (maligner)	Tumor, der Zellen mit maligner Transformation enthält, wächst im allgemeinen rascher als ein gutartiger Tumor, invadiert und zerstört das umgebende Gewebe und metastasiert. Ein maligner Tumor führt unbehandelt zum Tode des Patienten

Tumor, gutartiger (benigner)	Wachstum im allgemeinen langsam, gut gegenüber dem umgebenden Gewebe abgegrenzt, d.h. operabel. Keine Zerstörung des umgebenden Gewebes. Gefährdet im allgemeinen das Leben des Erkrankten nicht, kann jedoch aufgrund der Lokalisation (im Schädel, Kompression eines Ganges, z.B. des Gallenganges) sowie seiner Funktion, (z.B. Hormonsekretion) lebensgefährlich werden
"Tumor, semi-maligner"	Lokal invasiv und zerstörend wachsender Tumor, der nicht metastasiert, z.B. Basalzellkarzinom (Basaliom), aggressive Fibromatose
Tumorsuppressorgen	Gen, welches in der Steuerung des normalen Zellwachstums involviert ist. Bei Verlust beider Allele geht diese Kontrolle verloren. Bei hereditären Tumoren wird oft ein defektes Allel durch einen Gameten vererbt. Fällt auch das zweite intakte Allel durch eine somatische Mutation aus, kommt es zur malignen Transformation der betroffenen Zelle. Rezessives Verhalten
Ulkus	Geschwür der Haut oder einer Schleimhaut mit Substanzverlust, der tiefer reicht, als die Haut bzw. die Schleimhaut (s. auch Erosion)
Verfettung	Ansammlung von lichtmikroskopisch sichtbaren Neutralfetten und Lipiden im Zytoplasma von Zellen, die normalerweise kein erkennbares Fett enthalten
Virale Einschlusskörper	Lichtmikroskopisch homogene Einschlüsse im Zellkern oder Zytoplasma, bestehend aus viralen Proteinen oder Viruspartikeln
Virus	Kleinste lebensfähige biologische Einheit, kann sich nur in lebenden Zellen vermehren: Obligat intrazellulärer Mikroorganismus
Wundheilung, primäre	Wundheilung ohne Komplikationen (meist bei dicht aneinanderliegenden, glatten Wundrändern ohne Infekt)
Wundheilung, sekundäre	Wundheilung unter Ausbildung von Granulationsgewebe
Zelladaptation	Vorgänge, die der Zelle erlauben, sich an ein neues energetisches Fließgleichgewicht anzupassen
Zellschaden	Ueberforderung der Anpassungsfähigkeit der Zelle (Intensität des Stimulus bzw. des Schadens oder lange Einwirkung eines schädigenden Agens) führt zum Zellschaden. Dieser ist zunächst reversibel, bei Versagen vitaler Zellfunktionen (z.B. oxydative Phosphorylierung) wird er irreversibel
Zytologie	Punktionszytologie, mikroskopische Untersuchung aus dem Gewebsverband gelöster Einzelzellen zur Erkennung von Krankheiten, vor allem von Tumoren und Entzündungen. S. auch Exfoliativzytologie

Aufgaben und Untersuchungsmethoden der Pathologie

Aufgaben der Pathologie

Pathologie bedeutet wörtlich "Lehre von den Leiden", d.h. Lehre der krankhaften Organ- und Gewebeveränderungen und beinhaltet das wissenschaftliche Studium und die Erfassung der Ursachen, der Entstehung sowie der Auswirkungen von Krankheiten.

Hauptaufgaben der Pathologie sind **Diagnostik, Forschung und Ausbildung**. Diese Hauptaufgaben sind nicht voneinander zu trennen.

Die **Diagnostik** dient der Erkennung und Klassifikation von Krankheiten anhand zytologischer und histologischer Untersuchungen und muss zu einer möglichst präzisen Diagnose oder Differentialdiagnose führen. Sie schafft dadurch eine der Grundlagen für die Einleitung einer adäquaten Therapie.

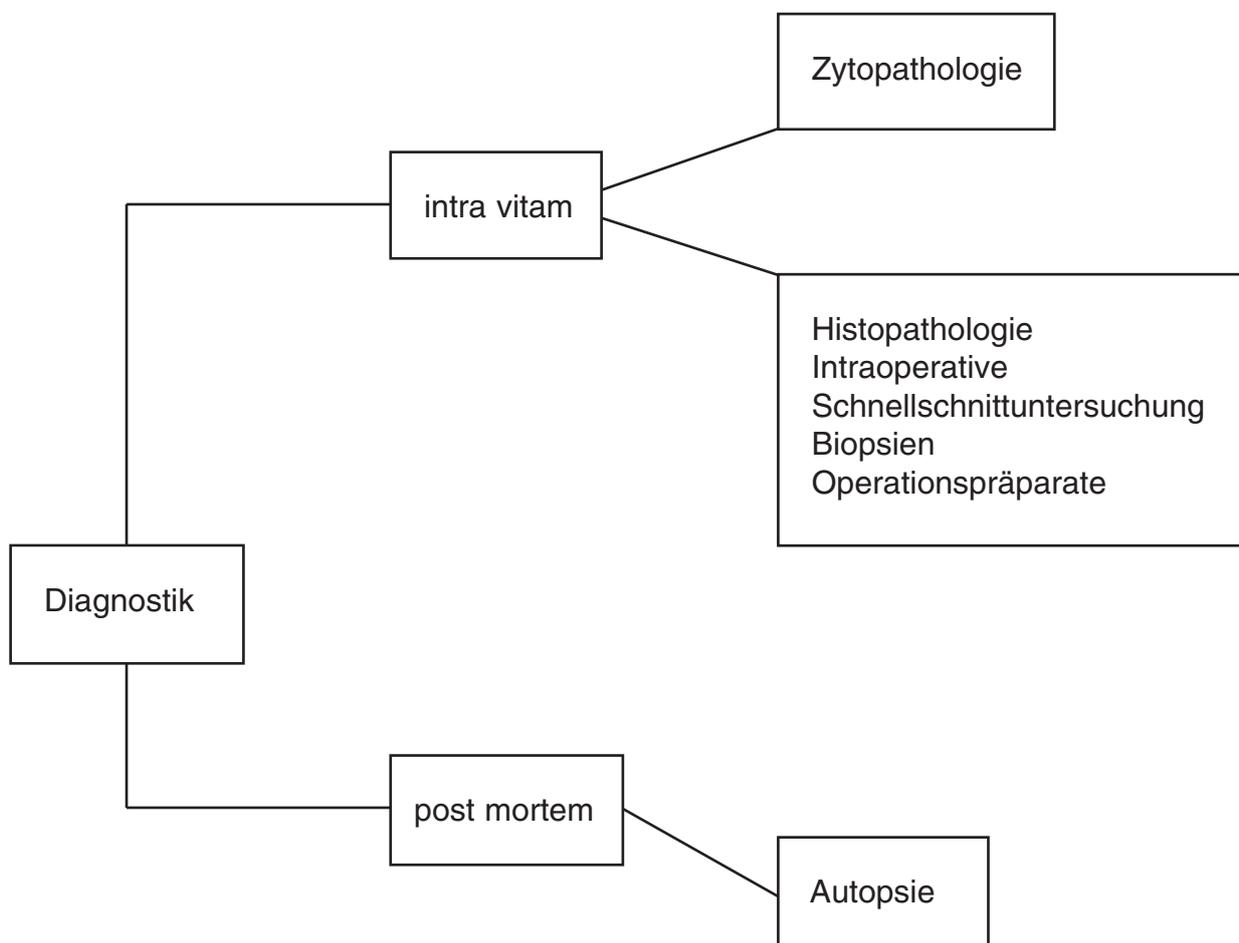
Die **Forschung** in der Pathologie beschäftigt sich vor allem mit der Aufklärung der Ursachen, der Entstehungsweise sowie den Auswirkungen von Erkrankungen. Sie beinhaltet auch die Epidemiologie, die sich von den Häufigkeiten der Krankheiten aus mit Ursachenforschung befasst.

Die **Lehre und Ausbildung von Studierenden und Ärzten** muss das biologische Verständnis von Krankheiten wecken und fördern. Diagnostik, klinisch-pathologische Korrelationen sowie der neueste Stand der Forschung müssen in die Lehre und Ausbildung integriert werden.

Diagnostik

Die Diagnostik in der Pathologie umfasst einerseits die **intravitale**, andererseits die **postmortale** Diagnostik. Zur intravitale Diagnostik gehören **Zytopathologie, intraoperative Schnellschnittuntersuchungen** sowie die **Untersuchung von Biopsien und Operationspräparaten**. Die **postmortale Diagnostik** beinhaltet autopsische Untersuchungen (Abb. 1).

Abb. 1



Intravitale Diagnostik: Zytopathologie

Hauptaufgaben der Zytopathologie sind das prophylaktische Screening (Reihenuntersuchungen; sekundäre Prävention) von Tumorstufen und die minimal-invasive Tumordiagnostik. Mithilfe zytologischer Methoden können auch nicht-tumoröse Erkrankungen, beispielsweise Entzündungen, diagnostiziert werden. Die Gewinnung zytologischen Untersuchungsgutes ist weitgehend schmerzfrei. Sie weisen zudem eine hohe diagnostische Aussagekraft auf.

Intravitale Diagnostik: Histopathologie

Einsatzbereich der intraoperativen Schnellschnittuntersuchung

Als intraoperative Schnellschnittuntersuchung wird die mikroskopische Untersuchung an entnommenen Gewebeproben während des Verlaufes eines operativen Eingriffs bezeichnet. Ziel ist die rasche histologische Diagnose einer makroskopisch nicht sicher zu beurteilenden Läsion innerhalb von Minuten.

Die Leistungsfähigkeit der Methode ist beträchtlich, setzt allerdings eine enge Zusammenarbeit zwischen Chirurgen und Pathologen sowie grosse diagnostische und technische Erfahrung aller Beteiligten voraus. Diese Untersuchungstechnik ist aus der heutigen operativen Strategie nicht mehr wegzudenken.

Bedeutung der Untersuchung von Biopsien und Operationspräparaten

Die makroskopische und mikroskopische Beurteilung von Biopsien und Operationspräparaten ist heute eine der Hauptaufgaben der Pathologie. Sie hat während der vergangenen Jahrzehnte die postmortalen Untersuchungen quantitativ in den Hintergrund gedrängt, da heute die meisten operativ entnommenen Gewebestücke zur mikroskopischen Untersuchung an die Pathologie gesandt werden.

Unter Biopsien versteht man kleine Gewebeproben, welche zur histopathologischen Untersuchung entnommen werden. Sie umfassen Nadelbiopsien, endoskopische oder offene Biopsien. Ziel der Untersuchung von Biopsien und Operationspräparaten ist die präzise Artdiagnose einer Läsion (z.B. Tumor, Entzündung, immunologische Erkrankung), sowie die möglichst genaue Beurteilung ihres biologischen Verhaltens und somit ihrer klinischen Bedeutung bzw. Prognose. Bei Tumoren wird dazu die Abweichung der Gewebsarchitektur, der Zell- und Kernmorphologie sowie der Proliferationszeichen (Mitosen) von der Norm beurteilt und zum sog. "Grading" benutzt. Darüberhinaus muss das Tumorstadium im Hinblick auf eine Aussage zur Prognose definiert werden, d. h. ein "Staging" erfolgen.

Postmortale Diagnostik: Bedeutung der Autopsie

Ziele der autopsischen Untersuchung sind die Erfassung von (teilweise zuvor nicht erkannten) Krankheiten und die Erarbeitung klinisch-pathologischer Korrelationen. Die Autopsie ist somit eine ärztliche Untersuchung, die an die untersuchende Person hohe fachliche und ethische Anforderungen stellt. Die Autopsie umfasst analog der intravitale Diagnostik Makroskopie, Histologie und Zytopathologie sowie zusätzliche mikrobiologische, biochemische und molekularbiologische Untersuchungen.

Untersuchungsmethoden der Pathologie

Entwicklung

Innerhalb eines Jahrhunderts hat sich aus einer vorwiegend deskriptiven (statischen) Zellulärpathologie eine dynamische Zellbiologie und -pathologie entwickelt.

Bis Mitte des 19. Jahrhunderts war das Studium morphologischer Krankheitserscheinungen auf die Makroskopie, d.h. auf die Beobachtung mit bloßem Auge beschränkt. Die Technik der Einbettung des Gewebes in **Paraffin**, der Herstellung histologischer Schnitte mithilfe eines Mikrotoms, sowie die Färbung der Gewebeschnitte wurden in der 2. Hälfte des 19. Jahrhunderts entwickelt und in Forschung und Diagnostik eingeführt. Der für die damalige Zeit revolutionäre Einsatz dieser Techniken, kombiniert mit dem bereits ungefähr 200 Jahre früher erfundenen **Mikroskop**, verbesserte die Beobachtung krankhafter morphologischer Erscheinungen entscheidend (Mikroskopie). Später wurden weitere Färbungen entwickelt mit dem Ziel der selektiven Darstellung von Gewebekomponenten (sog. Spezialfärbungen).

Eine neue Dimension eröffnete sich mit dem **Elektronenmikroskop**. Die neuartigen präparativen Techniken und Einbettungsmedien erlauben die Analyse von Größe, Form und Zahl subzellulärer Organellen und Strukturen bzw. deren Abweichungen von der Norm.

Während der letzten Jahrzehnte wurde eine Reihe **spezieller Techniken** eingeführt, welche **enzymhistochemische, immunhistologische biochemische und molekularbiologische Techniken** umfasst.

Sie können an menschlichem Gewebe oder im Tierexperiment verwendet werden. Der kombinierte Einsatz dieser Methoden, zusammen mit licht- und elektronenmikroskopischen Techniken, an isolierten Zellen in Kultur oder zytologischen Ausstrichen bzw. am Gewebe erlaubt, einen Einblick in Zusammenhänge zwischen Funktion und Struktur zu gewinnen. Diese Methoden helfen daher, die Diagnostik zu verfeinern und erlauben Lokalisation und eingehende funktionelle qualitative sowie quantitative Analysen einer Vielzahl von Molekülen und supramolekularen Strukturen, d.h. zellbiologische Analysen.

Makroskopie (Pathologische Anatomie)

Beschreibung, Dokumentation und Interpretation makroskopisch sichtbarer Gewebe- bzw. Organveränderungen sowie die Entnahme repräsentativer Gewebeproben für die mikroskopische Untersuchung stellen wichtige Schritte in der pathologisch-anatomischen Diagnostik von Biopsien, Operationspräparaten oder autoptisch entnommenen Organen dar.

Asservierung von Gewebe und Zellen (Abb. 2)

Bis heute gilt die möglichst rasche Fixation als die Methode der Wahl zur Asservierung von Gewebe und Zellen. Mit der Einführung von Spezialtechniken in den letzten Jahren hat sich aber zunehmend gezeigt, dass zur optimalen Ausnützung der diagnostischen Möglichkeiten ein wesentlich differenzierteres Vorgehen notwendig ist.

Dabei ist wiederum die enge Zusammenarbeit zwischen Kliniker und Pathologen ausschlaggebend. Gemeinsam muss entschieden werden: 1. welche Untersuchungsmethoden eine möglichst umfassende Diagnose ermöglichen (z.B. Tupfpräparate, Ausstriche, Gefrierschnitte, Paraffin-, Harz- oder Kunststoff-eingebettete Präparationen); 2. ob neben histopathologischen Untersuchungen auch beispielsweise immunhistochemische, mikrobiologische (Erregernachweis), biochemische (z.B. Hormonrezeptoren-Status) oder molekularbiologische Untersuchungen (z.B. Gene-rearrangement) notwendig sind, deren Durchführung durch eine vorschnelle oder falsche Asservierung verunmöglicht werden; und 3. ob andere Fixative als Formalin zusätzlich eingesetzt werden sollten.

Das in der Diagnostik am häufigsten eingesetzte Fixativ ist **Formalin**.

Für eine Reihe von Untersuchungsmethoden sollten zur Asservierung andere Fixative eingesetzt werden oder das Gewebe nativ eingefroren werden.

Auf Grund der Vielfalt möglicher Gewebeasservierungsmethoden, empfiehlt es sich für den Kliniker im Zweifelsfalle, vor der Entnahme einer Gewebeprobe mit dem zuständigen Institut für Pathologie Rücksprache zu nehmen, um eine optimale Gewebeasservierung und damit eine umfassende Diagnostik zu gewährleisten.

Mikroskopie (Histopathologie)

Die meisten makroskopisch erhobenen Befunde müssen histologisch verifiziert werden.

Paraffinschnitte

Einsendung des exzidierten Gewebes oder des Biopsates

Je nach Problemstellung frisch und unfixiert oder fixiert in gepuffertem Formaldehyd (4%). **Siehe Abschnitt "Asservierung"**.

Fixation

Nach der makroskopischen Beschreibung des Gewebes und Exzision der Anteile, welche die Läsion enthalten, wird das Gewebe in gepuffertem Formalin 4% (pH 6.8) fixiert.

Weitere Fixationen für Spezialuntersuchungen s. 5: "Asservierung von Gewebe und Zellen". Für biochemische und molekularbiologische Untersuchungen muss Gewebe sehr rasch tiefgefroren werden (s. 5: "Asservierung von Gewebe und Zellen").

Einbettung in Paraffin

- Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe: 70% -> 96% -> absoluter Alkohol

- Entspritzen durch Xylol oder Toluol
- Mehrere Stunden in Paraplast
- Eintauchen und richtige Orientierung des Gewebes in erwärmtem, flüssigem Paraffin

Herstellung von Schnitten

Nach Kühlung und Erstarren des Paraffins Herstellung von 2 - 5 µm dicken Schnitten auf dem Rotations- oder Schlittenmikrotom. Aufziehen auf den Objektträger.

Färbung

- 1. Möglichkeit: Entparaffinierung der Schnitte: Xylol -> absoluter Alkohol -> absteigende Alkoholreihe (96% -> 70%) -> Wasser. Färbung in wässriger Lösung.
- 2. Möglichkeit: Entparaffinierung der Schnitte: Xylol -> absoluter Alkohol -> absteigende Alkoholreihe (96% -> 70%) -> Färben in alkoholischer Lösung.

Entwässerung

Wasser -> aufsteigende Alkoholreihe (70% -> 96% -> absoluter Alkohol) -> Xylol.

Eindeckung

Eukitt zwischen Objektträger und Deckglas.
Oder Eindecken direkt unter Zellulose-Triacetat-Folie.

Entwässerung, Entspritzen, Färbung (HE, van Gieson) und Eindecken erfolgen heute weitgehend in programmierbaren Geräten.

Zytopathologie (Abb. 3-7)

Im Gegensatz zu Schnittpräparaten basiert die zytologische Diagnostik auf der Untersuchung weniger Zellverbände oder Zellen. Als diagnostische Beurteilungskriterien werden hauptsächlich zytoplasmatische sowie nukleäre Veränderungen herangezogen.

Untersuchungen

Flüssigkeiten

Körperhöhlenergüsse: Pleuraerguss/Aszites/Perikarderguss
Urin
Liquor
Gelenksergüsse
Spülflüssigkeiten (Bronchialsystem/Harnblase, Nierenbecken/Magen, Darm)
Flüssigkeiten aus Organzysten (Mamma/Schilddrüse/Ovar)

Sekrete

Sputum
Bronchialsekret
Mamillensekret
Wundsekret
u.a.

Abstriche

Bürstenabstriche aus Bronchialbaum und Magen-Darm-Trakt, gynäkologischer Abstrich

Abklatschpräparate

Untersuchungen von direkt zugänglichen Gewebsoberflächen, z.B. Abklatschpräparate von Tumorbiopsien

Feinnadelpunktate

- a) Intern (Zytologie-Ambulatorium im Departement Pathologie) punktiertes, auf Objektträger ausgestrichenes, feucht (d.h. in Delaunay-Lösung) fixiertes Punktate
- b) Auswärtig punktiertes, auf Objektträgern ausgestrichenes, mit dem Spray fixiertes Punktate (wenn möglich: Punktion durch den beurteilenden Zytologen, vgl. a)

Herstellung von Ausstrichen

Flüssigkeiten werden zentrifugiert, das Zentrifugat abpipettiert und auf Objektträgern ausgestrichen.

Cytospin: Bei sehr wenig Zellmaterial und bei Liquor.
Direktes Zentrifugat auf Objektträger.

Schleim, Sputum, Sekrete werden direkt auf Objektträgern ausgestrichen.

Abstriche (gynäkologisches Untersuchungsmaterial, Bürstenabstriche) direkt auf Objektträger.

Abklatsch direkt auf Objektträger.

Feinnadelpunktate auf Objektträger ausspritzen und ausstreichen.

Fixation

Art der Fixation (Feuchtfixation, Trockenfixation), evtl. auch Wahl des Fixationsmittels beeinflussen die weiteren Verarbeitungsmöglichkeiten (Art der Färbung, evtl. Spezialfärbungen).

Feuchtfixation

1. in Delaunay-Lösung
2. in absolutem Alkohol
3. mit "Spray" (im Handel (Cytostat[®]-Spray))

Trockenfixation

Das auf den Objektträger ausgestrichene Material wird luftgetrocknet (besonders für Erregernachweis).

Färbung

Färbung nach Papanicolaou, evtl. sog. "Schnellfärbung" (Dauer ca. 10 Min.) mit verkürzten "Eintauchzeiten"

Beurteilung/Diagnose

Sorgfältiges, systematisches "Screening" des Präparates im Mikroskop durch Fachzytologen.

Intraoperative Schnellschnittuntersuchung

Intraoperativ lauten die häufigsten Fragestellungen des Chirurgen an den Pathologen: 1. Feststellung der Artdiagnose eines Prozesses (z.B. Tumor, Entzündung, degenerative Veränderung), 2. Bestimmung der Dignität eines Tumors (bö- oder gutartig) und 3. Beurteilung des Tumortyps und der Vollständigkeit der chirurgischen Entfernung (Exzision im gesunden umgebenden Gewebe). Schnellschnittuntersuchungen sind nur bei Fragestellungen indiziert, deren Beantwortung einen unmittelbaren Einfluss auf das weitere operative Vorgehen ausübt.

Intraoperativ entnommene Gewebestücke müssen möglichst rasch ins Schnellschnittlabor der Pathologie überbracht werden, wofür in vielen Kliniken Rohrpostanlagen oder ähnliche Einrichtungen zu Verfügung stehen.

Das chirurgische Exzizat wird durch den Pathologen zunächst makroskopisch beurteilt. Aus der makroskopisch sichtbaren Läsion wird ein kleines Gewebstück exzidiert und rasch tiefgefroren. Im Kryostat (Kühlkammer mit einer Temperatur von ca. -18°C mit einem Mikrotom) wird daraufhin ein Gefrierschnitt hergestellt (Schnittdicke 8-10 μm), schnellgefärbt und mikroskopiert. Die Qualität der hergestellten Schnittpräparate ist je nach Gewebetyp etwas geringer als bei Schnittpräparaten von fixiertem, paraffin-eingebettetem Gewebe. Dennoch reicht sie oft aus, um eine Diagnose zu stellen, welche mündlich via Gegensprechanlage oder Telefon an den Chirurgen weitergegeben wird. Es muss dabei eine direkte Kommunikation zwischen Pathologen und Chirurgen hergestellt werden. Diese ist wichtig, denn der Chirurg entscheidet u.a. aufgrund der mikroskopischen Schnellschnittdiagnose über das weitere operative Vorgehen.

Der Zeitbedarf für die Herstellung der histologischen Präparate und die anschliessende mikroskopische Beurteilung beträgt ungefähr 10-15 Minuten.

Grenzen der Technik

- Gefrierschnitt dicker als Paraffinschnitt (optische Auflösung begrenzt)
- Innert der zur Verfügung stehenden kurzen Zeit ist nur eine abgekürzte konventionell-histologische Färbung - HE - durchführbar
- Schnellschnittuntersuchungen sind nur indiziert bei Fragestellungen, welche einen unmittelbaren Einfluss auf das operative Vorgehen haben. Eine präzise Klassifikation eines Tumors ist oft nicht möglich. Zudem sind gewisse Spezialuntersuchungen nach Gefrieren des Gewebes im Kryostat nicht mehr durchführbar.

Technik/Durchführung

- Exzision des zu untersuchenden Gewebsteils durch den Chirurgen
- Transport per Rohrpost (innerhalb des USZ) oder per Taxi (von ausserhalb des USZ)
- Beschreibung der Makroskopie, Exzision der mikroskopisch zu untersuchenden Stelle
- Rasches Einfrieren des exzidierten Gewebes in Kohlesäureschnee
- Schneiden (5 - 8 μm) im Kryostat (Temperatur der Kammer -25°C)
- Kurze Fixation in Delaunay
- Schnellfärbung HE
- Mikroskopische Beurteilung
- Durchgabe der Diagnose per Gegensprechanlage oder Telefon

Nachuntersuchung im Paraffinschnitt zur Bestätigung bzw. Präzisierung der Schnellschnittdiagnose, evtl. mit Hilfe von Spezialuntersuchungen (Spezialfärbungen, Immunhistochemie, in situ-Hybridisierung)

Spezialtechniken (Abb. 8)

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (Flow cytometry) ist eine computerunterstützte Technik zur Erfassung, Quantifizierung und Sortierung von Einzelzellen, Chromosomen oder anderer zellulärer Strukturen anhand verschiedener physikalischer oder fluoreszenzassoziierter Parameter. Es können mit dieser Methode lediglich Suspensionen von Einzelzellen oder deren Bestandteile untersucht werden. Aus Geweben müssen diese deshalb zuerst mithilfe physikalischer oder enzymatischer Methoden herausgelöst werden. Je nach Fragestellung werden ganze Zellen oder Zellbestandteile mittels fluoreszierenden Farbstoffen oder immunhistochemischen Methoden markiert und in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl an einem gebündelten Laserstrahl vorbei geführt. Auf Grund der Farbe und Intensität des reflektierten Lichtes oder anhand physikalischer Parameter wie Grösse und Struktur, werden die Zellen oder Zellbestandteile registriert, ausgezählt und, falls gewünscht, auch sortiert.

Anwendungsbeispiele der Durchflusszytometrie sind die Identifikation und Auszählung von Lymphozytentypen nach spezifischer Immunfluoreszenzmarkierung (z.B. zur Bestimmung des Verhältnisses von T-Helfer zu T-Suppressor Zellen bei AIDS Patienten oder zur Phänotypisierung von Leukämien und Lymphomen im peripheren Blut), die Analyse des DNS-Gehaltes (Ploidie) z.B. in Zellen von frischem oder formalin-fixiertem, paraffin-eingebettetem Tumorgewebe, oder für Zellzyklusanalysen zur Charakterisierung von Zellpopulationen bezüglich ihres DNS-Gehaltes und Proliferationsgrades.

Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie ermöglicht die Analyse subzellulärer Strukturen (Organellen) sowie von in der Zelle angereicherten Substanzen. Ultradünn geschnittene Gewebe und Zellen werden in einem gebündelten Elektronenstrahl betrachtet, was vieltausendfache Vergrößerungen ermöglicht.

Das Gewebe wird hierzu meist in Glutaraldehyd oder einer Mischung von Paraformaldehyd und Glutaraldehyd fixiert, in Osmiumtetroxyd nachfixiert und anschliessend in Kunststoff (z.B. Araldit, Epon, Lowicryl) eingebettet. Da die eingesetzten Kunststoffe wesentlich härter als Paraffin sind, können mit einem Diamantmesser sehr dünne Schnitte (Dicke 60-80 nm) hergestellt werden. Zur Kontrastierung der Zellstrukturen werden Uranylazetat und Bleizitrat oder andere Schwermetallsalze eingesetzt.

Anwendungen der Elektronenmikroskopie in der diagnostischen Pathologie sind die Darstellung submikroskopischer Glomerulumläsionen der Niere, der Nachweis von Viruspartikeln oder von intrazellulären Sekretgranula sowie von Organellenveränderungen, was bei gewissen Fragestellungen zur Diagnose einer Krankheit (z.B. Artdiagnose eines Tumors, Stoffwechselstörungen) beitragen kann.

Enzymhistochemie

Die Enzymhistochemie dient dem Nachweis und der Lokalisation von Enzymen im Schnittpräparat und in Zellausstrichen. Die Techniken nutzen die Aktivität der gesuchten Enzyme aus, um zugegebene spezifische (natürliche oder artifizielle) Substrate in mikroskopisch sichtbare, unlösliche Farbstoffe umzusetzen.

Enzymhistochemische Methoden können meist nur an frischem Gewebe oder Zellen durchgeführt werden, da sie auf der noch erhaltenen Aktivität von Enzymen beruhen. Sie werden z.B. in der hämatologischen Diagnostik zur Charakterisierung von weissen Blutzellen (z.B. Chlorazetat-Esterase-Nachweis in neutrophilen Granulozyten) und zum Nachweis der Acetylcholinesterase, Laktat- und/oder Sukzinat-Dehydrogenase bei Innervationsstörungen des Darmes (z.B. Aganglionose, sogenannter M. Hirschsprung) eingesetzt.

Immun- und Lektinhistologie (Abb. 9)

Die Immunhistochemie benützt die Spezifität und Affinität immunologischer Reaktionen zur präzisen Lokalisation von Epitopen gesuchter Antigene (Epitop: Sequenz von 5-10 Aminosäuren gegen welche die Antigen-Bindungsstellen des eingesetzten Antikörpers gerichtet sind). Mithilfe immunhistochemischer Techniken können daher antigene Strukturen und mithilfe der Lektintechnik Zuckerstrukturen in Schnittpräparaten und Zellausstrichen präzise lokalisiert werden, z.B. Zellbestandteile und -sekretionsprodukte wie Zytoskelett, Zelladhäsionsmoleküle, Moleküle der extrazellulären Matrix, Hormone, Rezeptoren, Immunglobuline aber auch Erreger.

Die Techniken haben in den letzten Jahren massgeblich zur effizienteren Phänotypisierung von Tumoren und Zellen in Diagnostik und Forschung beigetragen. Die Steigerung der Effizienz dieser Methoden sowie der Spezifität der Reaktionen erlaubt heute den Nachweis einer Vielzahl von Antigenen an Formaldehyd-fixiertem, paraffin-eingebettetem Gewebe oder an fixierten Zellen. Retrospektive Studien mit Einsatz moderner Technik an archivierten Gewebestücken sind dadurch möglich geworden.

Im Prinzip bestehen immunhisto- und -cytochemische Techniken aus zwei Schritten: In einem ersten Schritt wird ein sogenannter primärer Antikörper eingesetzt, welcher sich spezifisch an das Epitop eines gesuchten Antigens im Gewebe oder der Zelle bindet. In einem zweiten Schritt werden diese gebundenen primären Antikörper, d.h. die Antigen-Antikörper-Bindungsstelle mit verschiedenen, unten aufgeführten Methoden lokalisiert und dadurch sichtbar gemacht.

Für den ersten Schritt werden als **primäre Antikörper** einerseits polyklonale Antiseren (oder gereinigte Antikörper) und andererseits monoklonale Antikörper eingesetzt. Polyklonale Antiseren werden hergestellt, indem Tiere (Kaninchen, Ziegen, Schafe, Schweine) mit gereinigten Antigenen immunisiert werden und periodisch gewonnenes Serum der Tiere, welche gegen das Antigen gerichtete Antikörper produziert haben, verwendet wird. Polyklonale Antiseren zeigen meist eine hohe Avidität (da Antikörper gegen mehrere Epitope eines Antigens produziert werden), führen dadurch aber nicht selten zu Kreuzreaktionen mit Epitopen anderer Antigene, d.h. zu unerwünschten Hintergrundreaktionen. Monoklonale Antikörper werden durch die Fusion von in Kultur gezüchteten Tumorzellen (Myelomzellen) mit Immunglobulin-produzierenden Milzzellen immunisierter Tiere hergestellt. Solche durch die Fusion

immortalisierten Zellhybride, werden als Zellkultur in der Reagenzflasche gehalten und produzieren kontinuierlich den durch Testverfahren selektionierten gewünschten Antikörper, welcher aus dem Überstand des Kulturmediums, in praktisch unlimitierten Mengen gewonnen werden kann. Monoklonale Antikörper sind ausschliesslich gegen ein bestimmtes Epitop gerichtet. Dies steigert die Spezifität immunhistochemischer Reaktionen beträchtlich.

Für den zweiten Schritt der Reaktionen werden zum Nachweis der im Gewebe gebundenen primären Antikörper zwei prinzipiell unterschiedliche Methoden eingesetzt: sog. **direkte und indirekte Nachweismethoden**.

Bei den **direkten Methoden** werden die primären Antikörper mit einem sogenannten Markermolekül (z.B. fluoreszierender Farbstoff, Enzym, kolloidales Gold) gekoppelt, welche nach der Immunreaktion im Gewebe nachgewiesen werden können. Fluoreszierende Farbstoffe geben auf Exzitation durch Ultrablau- oder Ultraviolett-Bestrahlung sichtbares Licht mit definierter Wellenlänge ab. Man benötigt zur Beobachtung fluoreszierender Farbstoffe ein mit geeigneten Farbfilter-Kombinationen ausgerüstetes Auflichtmikroskop. An primäre Antikörper gekoppelte Enzyme (z.B. Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase) können nach Ablauf der Immunreaktion ein zugegebenes, farbloses Substrat in einen unlöslichen (präzipitierenden) Farbstoff verwandeln (s. Enzymhistochemie), welcher am Ort der Antigen-Antikörperbindung nun lichtmikroskopisch nachgewiesen werden kann.

Bei den **indirekten Methoden** werden die Antigen-Antikörper-Reaktionen im Gewebe indirekt, d.h. mithilfe zusätzlicher immunologischer oder chemischer Reaktionen, sichtbar gemacht. Es werden meist gegen den primären Antikörper gerichtete, sogenannte **sekundäre Antikörper** eingesetzt, welche selbst ein Markermolekül tragen oder einen mit Markermolekülen oder Enzymen versehenen Komplex als dritte Stufe binden (brückenbildende Antikörper).

Zahlreiche Variationen von indirekten Methoden sind beschrieben worden. Alle führen durch den sequentiellen Ablauf mehrerer Reaktionen zu einer kaskadenartigen Verstärkung (Amplifikation) des Nachweissignales. Bei diesen Entwicklungen handelt sich um mehrstufige Nachweismethoden bei welchen entweder immunologische Bindungen verschiedener gegeneinander gerichteter Antikörper (sog. Peroxidase-anti-Peroxidase-Technik oder PAP-Technik und alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase Technik oder APAAP-Technik) oder chemische Affinität, z.B. zwischen Avidin und Biotin (Avidin-Biotin-Komplex-Technik oder ABC-Technik) ausgenützt werden.

In den letzten Jahren wurde kolloidales Gold als Marker von Antikörpern eingeführt. Es wird entweder an Protein A (von Staphylokokken) oder an Immunglobuline gebunden und stellt sich im Lichtmikroskop rot dar. Die Reaktion kann durch zusätzliche fotochemische Versilberung verstärkt werden. Methoden, welche kolloidales Gold als Marker verwenden, liefern im Gegensatz zu vielen anderen Techniken auch auf elektronenmikroskopischer Ebene präzise Resultate.

Western-Blots und weitere biochemische Untersuchungen (Abb. 10)

Zusätzlich zum immun- und lektin histochemischen Nachweis an Schnitt- und Zellpräparaten können Proteine, Kohlehydratstrukturen und andere Zellbestandteile biochemisch z.B. mittels der Western- und Lektin-Blot Technik untersucht werden. Die Techniken können zusätzliche Informationen über Grösse und Struktur eines Moleküles liefern. Hierzu müssen die Zellbestandteile bzw. Substanzen aus dem Frischgewebe oder aus unfixierten Zellen extrahiert werden. Nach der Extraktion werden die einzelnen Bestandteile elektrophoretisch in einem Gel (z.B. Polyacrylamid) entsprechend ihrer Grösse aufgetrennt, via Blottingverfahren auf Nitrozellulose- oder Nylonmembranen (auch Filter genannt) übertragen und die gewünschten Komponenten analog den vorher beschriebenen immun- und lektin histochemischen Methoden spezifisch nachgewiesen.

Weitere proteinbezogene Methoden sind: Chromatographie, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) und andere Verfahren zur Reinigung und/oder Analyse sehr geringer Mengen von Proteinen und anderen Gewebestandteilen (z.B. Nachweis von Hormonrezeptoren in Mammakarzinomen oder von Hormonen in neuroendokrinen Tumoren).

Molekularbiologische Techniken

Molekularpathologische Methoden dienen der Untersuchung krankhafter Veränderungen auf genetischer Ebene, d.h. der DNS und RNS. Durch den vermehrten Einsatz molekularbiologischer Techniken in der Medizin, ist es in den letzten Jahren gelungen, bei Tumoren und anderen Krankheiten sowohl numerische und strukturelle chromosomale Veränderungen als auch spezifische Genveränderungen (z.B. Mutationen) als ursächlich beteiligte Faktoren nachzuweisen. Die Immunhistochemie (Phänotypisierung) kann daher durch eine zunehmende Zahl molekularbiologischer Methoden zwecks Genotypisierung von Läsionen ergänzt werden.

Die wichtigsten molekularbiologischen Methoden die zur Zeit in der Pathologie eingesetzt werden umfassen Hybridisierungstechniken, wie die in-situ Hybridisierung, Southern- und Northern-Blot-Verfahren, DNS-Amplifizierungstechniken wie die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und assoziierte Methoden wie die SSCA (single strand conformation analysis) sowie DNS-Sequenzanalyse-Verfahren.

Die meisten der oben erwähnten Methoden erfordern eine spezielle Asservierung des Untersuchungsgutes (s. Asservierung) und können nur in spezialisierten Laboratorien durchgeführt werden.

Hybridisierungsmethoden (Abb. 11)

Analog zum Nachweis von Antigenstrukturen durch markierte Antikörper (Antigen-Antikörper-Bindung) können DNS- und RNS-Sequenzen mittels markierter, komplementärer DNS-, RNS- oder Oligonukleotidstücken (sog. Proben oder Sonden) nachgewiesen werden. Die sog. Hybridisierung von Proben an DNS- oder RNS-Sequenzen beruht hierbei auf der komplementären Basenbindung der Nukleotide Adenin und Thymin (bzw. Uracil) sowie Cytosin und Guanin. Als Marker von Hybridisierungsproben können entweder Radionuklide (z.B. ^3H , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S) oder nicht radioaktive Moleküle (z.B. Biotin, Digoxigenin, Fluorochrome) eingesetzt werden. Erstere werden mittels autoradiographischen Methoden (Schwärzung eines Röntgenfilmes oder Fotoemulsion) und letztere mittels (immun-) histochemischer Verfahren oder Fluoreszenzmethoden nachgewiesen.

Unter **in-situ Hybridisierung** versteht man den Nachweis von Nukleinsäuresequenzen in Schnitt- und Zellpräparaten. Sie wird in vielen Laboratorien bereits zum Nachweis viraler DNS (Zytomegalievirus, Herpesviren, etc.) in Gewebeschnitten und Zellen eingesetzt. Die in-situ Hybridisierung von RNS hingegen ist wegen derer geringerer Stabilität und Kopienzahl etwas schwieriger durchzuführen und erfordert meist eine spezielle Gewebeasservierung und -vorbehandlung. Auch der Nachweis von numerischen und groben strukturellen chromosomalen Veränderungen mittels fluorochrom-markierter chromosomen-spezifischer Proben (FISH, fluorescent in-situ hybridization) in Metaphasen- oder Interphasenpräparaten ist möglich, wird aber in der Diagnostik noch nicht routinemässig eingesetzt.

Blotting-Verfahren zur Analyse von DNS werden nach dem Namen des Erstbeschreibers Southern-Blotting genannt, während der Nachweis von RNS in Analogie Northern-Blotting genannt wird. Bei beiden Methoden werden die aus dem Gewebe isolierten Nukleinsäuren (DNS nach enzymatischer Zerlegung in kleinere Fragmente) abhängig von ihrer Grösse elektrophoretisch in Agarosegelen aufgetrennt, auf Filtermembranen übertragen, immobilisiert und mit einer entsprechenden, markierten Probe hybridisiert. Verfahren bei denen die Nukleinsäuren direkt auf eine Filtermembran gegeben und anschliessend hybridisiert werden, nennt man Dot- oder Slot-Blotting. Southern-Blotting ist die am weitesten verbreitete Methode zur Untersuchung von Gen-Rearrangierungen (Umplatzierung von DNS-Sequenzen), welche z.B. den Klonalitätsnachweis lymphoproliferativer Erkrankungen ermöglicht (Abb. 12).

DNS-Amplifizierungstechniken (Abb. 13 und 14)

Gewisse Nukleinsäuresequenzen sind in derart geringer Kopienzahl vorhanden, dass sie nicht mittels der oben beschriebenen Methoden in-situ oder in Zellextrakten nachgewiesen werden können. Deshalb haben sich in den letzten Jahren Amplifikationsmethoden wie die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) durchgesetzt. Diese Technik imitiert in vitro die Replikation von Nukleinsäuren und ermöglicht die millionenfache Kopierung einer bestimmten Gensequenz im Reagenzglas, welche dann relativ einfach mittels Gelelektrophorese und/oder Blotting-Verfahren analysiert werden kann.

Das Prinzip der PCR beruht auf der Denaturierung von DNS durch Hitze, Hybridisierung von zwei kurzen DNS-Sequenzen ("primer"), welche den gesuchten Genabschnitt flankieren und der Neusynthese einer Kopie des Genabschnittes durch hitzestabile DNS-Polymerasen. Bei jedem durchgeführten Zyklus von Denaturierung, Primer-Hybridisierung ("primer-annealing") und Neusynthese ("primer-extension oder elongation"), wird die Zahl der Kopien verdoppelt, was zu einer exponentiellen Amplifizierung des gesuchten Genabschnittes (z.B. 2^{30} Kopien nach 30 Zyklen) führt. Die Qualität und Spezifität des PCR Produktes kann in einer Gel Elektrophorese mit anschliessender Southern-Blot Hybridisierung überprüft werden.

Typische Anwendungsmöglichkeiten der PCR für die Diagnostik ist der Nachweis von Erreger-DNS oder -RNS (Viren, Bakterien, Mykobakterien) in Geweben. Diese Methode hat sich als weitaus sensitiver als die traditionelle in-situ Hybridisierung erwiesen. Der Nachteil der PCR besteht darin, dass die Reaktion an Gewebeextrakten durchgeführt wird und deshalb keine eindeutige Korrelation der PCR-Positivität mit der morphologischen Veränderung im Schnitt möglich ist. Kürzlich wurden Versuche vorgenommen, die PCR auch direkt in intakten Zellen und Schnittpräparaten durchzuführen (in-situ PCR). Diese modifizierte PCR ist derzeit in der Entwicklungsphase und deshalb noch nicht routinemässig einsetzbar. Weitere im Experimentierstadium befindliche Amplifikationsmethoden sind die Ligase-Ketten Reaktion (LCR) oder isothermale (bei gleichbleibender Temperatur durchgeführte) Methoden wie die self-sustained-sequence-replication (3SR).

PCR-amplifizierte Gensequenzen (von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und bei genetischen Erkrankungen) können mittels mehrerer Verfahren auf Punktmutationen hin überprüft werden. Eine dieser Methoden ist die SSC-Analyse (SSCA: single strand conformation analysis) bei der denaturierte PCR-Produkte in Polyacrylamidgelen aufgetrennt werden. Mutierte Einzelstrangfragmente werden erkannt, weil sie ihrer veränderten Sekundärstruktur wegen im Vergleich zur Normalsequenz unterschiedliche Wanderungseigenschaften im elektrischen Feld aufweisen. Eine andere Methode ist die Gradienten-Gel-Elektrophorese (**Abb. 15**).

Die Art der Genveränderung bzw. Punktmutation (Basenänderung) muss anschliessend durch Sequenzieretechniken bestimmt werden (**Abb. 16**).

DNS-Sequenzanalyse-Verfahren (Abb. 16)

Die Nukleinsäuresequenz eines DNS-Stranges kann mittels Sequenzanalysemethoden bestimmt werden. Die Techniken sind aufwendig und erfordern spezielle molekularbiologische Kenntnisse. Heute stehen automatisierte Sequenziersysteme zu Verfügung. Am häufigsten durchgeführt wird die Basenterminationsmethode (nach Sanger), bei der Dideoxynukleotide aller vier Basen in getrennten Reaktionen während der in-vitro Replikation in die Produkte eingebaut werden, was den Replikationsvorgang spezifisch abstoppt. Die dadurch resultierenden, unterschiedlich langen Fragmente werden auf Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und analysiert.

Abbildungen

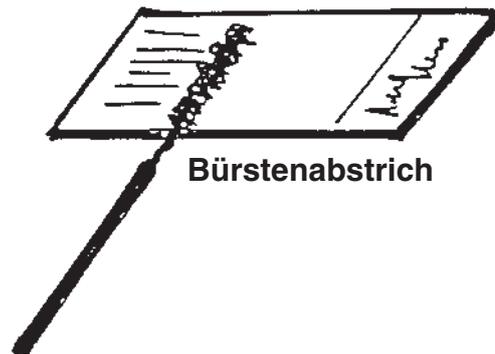
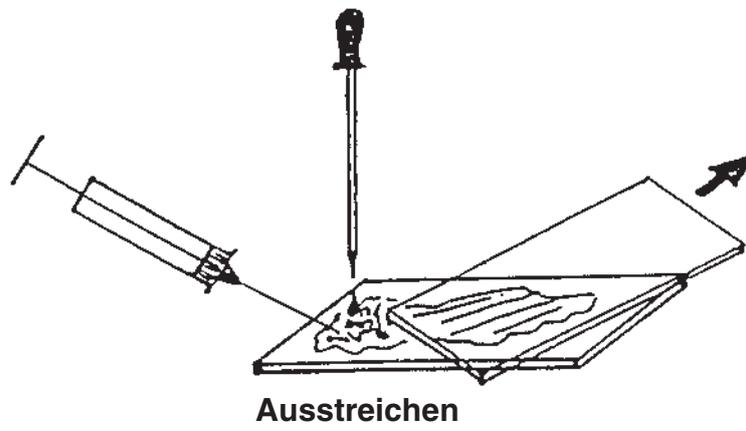
Abb. 1: s. Seite 16

Abb. 2: Gewebsasservierung am Departement Pathologie Zürich

Kursiv: weniger optimale Ausweichmöglichkeiten. 1.) Am besten genaues Vorgehen mit dem Pathologen besprechen. 2.) Je nach Fragestellung: entweder nur Formalinfixierung für Lichtmikroskope, oder zusätzlich schockgefrorenes Gewebe in Hank's-Lösung für Immunfluoreszenzmikroskopie. 3.) Beispiele für molekularbiologische Untersuchungen in der Pathologie: PCR, in situ Hybridisierung, Northern- und Southern-Blot. Die Verarbeitung vor Ort durch den Pathologen wäre dafür optimal. 4.) Gewisse Untersuchungen sind auch am formalinfixierten Gewebe möglich (z.B. in situ Hybridisierung, PCR).

	Gewebe	Gewebsasservierung	Zustellung	Bemerkungen
	Schnellschnitt	nativ	per Kurier oder Rohrpost	1
Konventionelle histologische Diagnostik	kleine Gewebstücke	in 4% gepuffertem Formalin	Postsendung	
	grosse Operations- präparate	frisch / gekühlt <i>eröffnet und Fixation in reichlich 4% gepuffertem Formalin</i>	per Kurier <i>Postsendung</i>	1
	Knochen	Fixation in 4% gepuffertem Formalin	Postsendung	
Spezielle Fragestellungen	Lymphomdiagnostik	frisch / gekühlt <i>Fixation in 4% gepuffertem Formalin</i>	per Kurier <i>Postsendung</i>	1 1
	Knochenmark	Fixation in Schäfer'scher Lösung	Postsendung	
	Hodenbiopsien	Fixation in modifizierter Karnovski-Lösung	Postsendung	
	Nierenbiopsien	frisch / gekühlt	per Kurier	1, 2
	Metabolische Veränderungen des Knochens	Fixation in absolutem Alkohol	Postsendung	
Immunfluoreszenz	z.B. Nierenbiopsien	frisch / gekühlt	per Kurier	1
Konventionelle Elektronen- mikroskopie	z.B. Nierenbiopsien	Fixation in 3% Glutaraldehyd	Postsendung	
Immunelektronen- mikroskopie		Fixation in 3% Paraformaldehyd + 1% Glutaraldehyd	per Kurier	1
Molekularbiologie		frisch / gefroren (in flüssigem Stickstoff) <i>Fixation in absolutem Alkohol</i>	per Kurier <i>Postsendung</i>	1, 3

Abb. 3-5: Ausspritzen und Ausstreichen von Feinnadelpunktaten



Abklatschpräparat

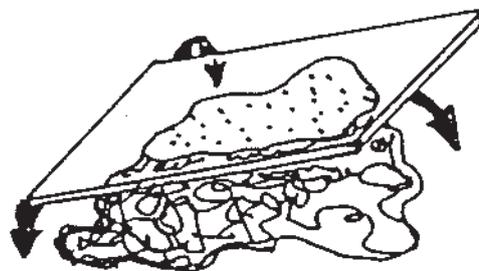


Abb. 6 und 7: Art der Fixation (Feuchtfixation, Trockenfixation), evtl. auch Wahl des Fixationsmittels beeinflussen die weiteren Verarbeitungsmöglichkeiten (Art der Färbung, evtl. Spezialfärbungen)

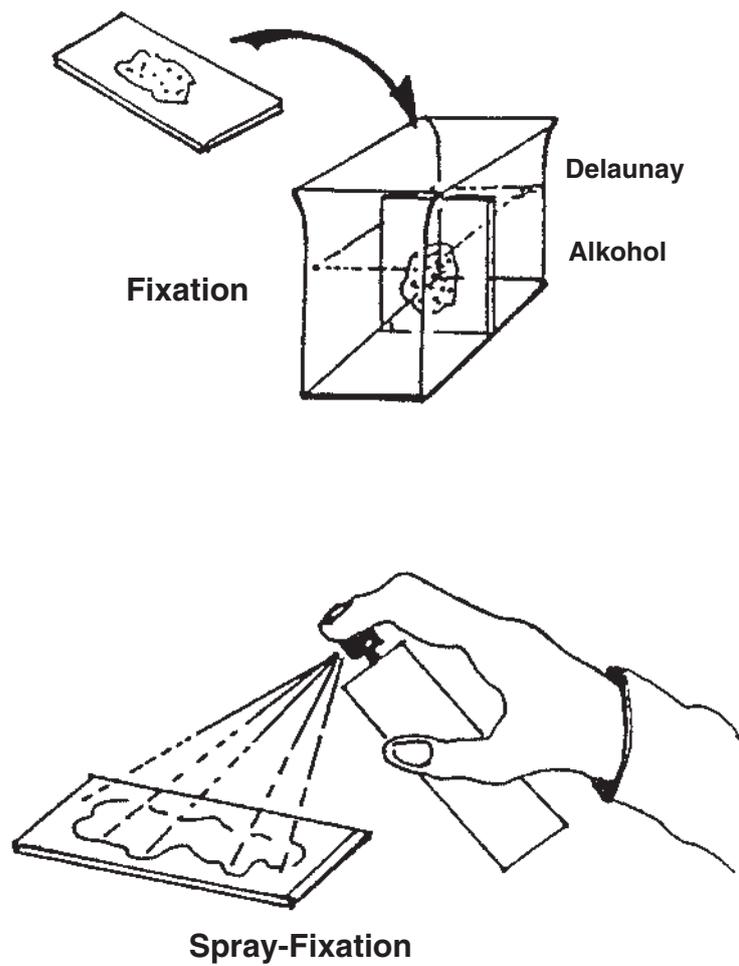


Abb. 9: Prinzip immunhistochemischer Techniken. Links: Bindung des primären Antikörpers an ein Epitop des gesuchten Antigens. Mitte und rechts: Amplifikation und Visualisierung des Signals durch indirekte Methoden. M = Marker (Fluorochrom, Meerrettichperoxidase, kolloidales Gold). B = Biotin.

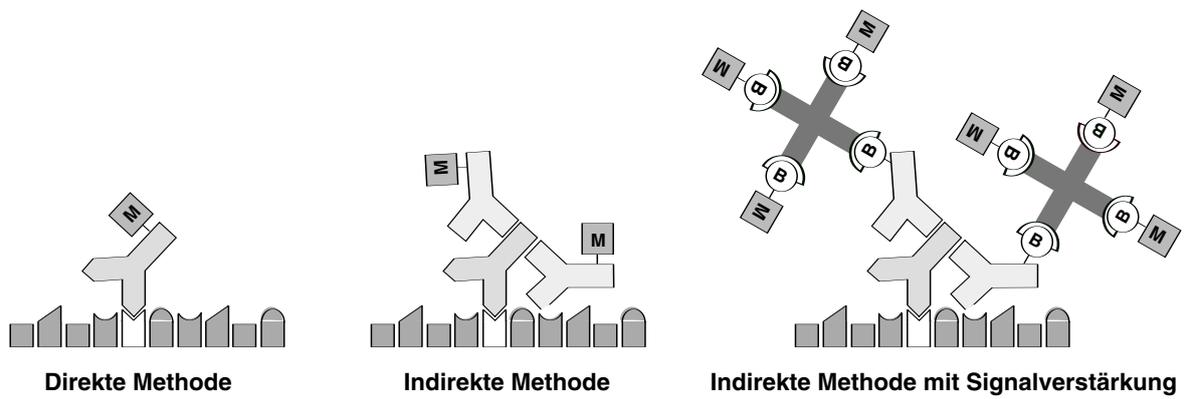


Abb. 10: Prinzip des Blotting nach Extrakt von Proteinen, DNA oder RNA am Gewebe oder Einzelzellen.

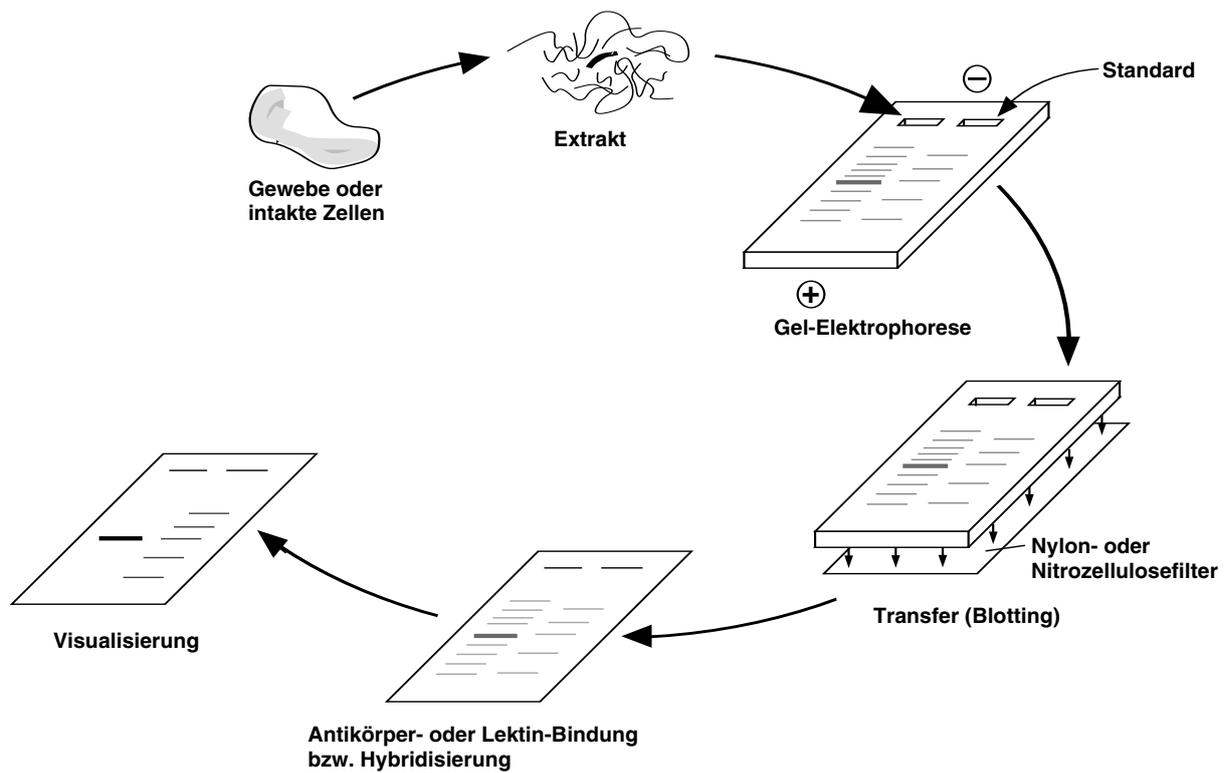


Abb. 11: Prinzip der Hybridisierung für DNA oder RNA.

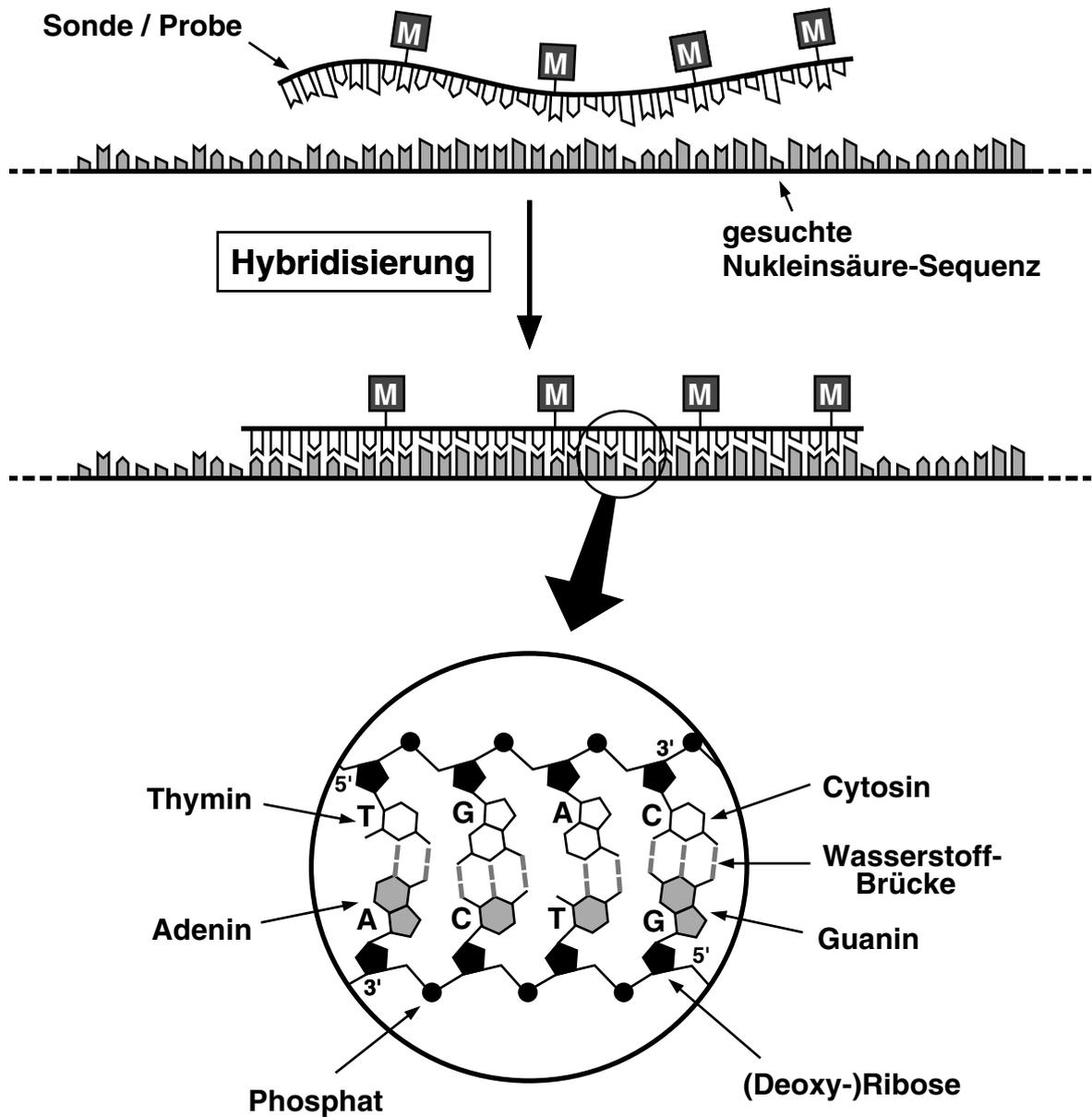


Abb. 12: Extraktion von Nukleinsäuren, Amplifikation durch PCR und Analyse des PCR-Produktes durch Gelelektrophorese.

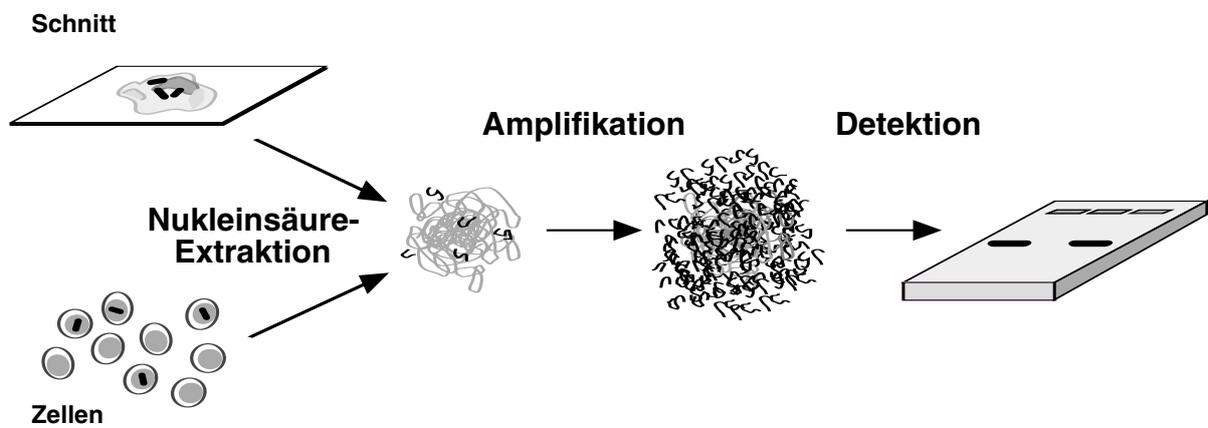


Abb. 14: Die exponentielle Amplifikation eines spezifischen DNS-Fragmentes durch Aneinanderreihen mehrerer PCR-Zyklen.

Während im ersten PCR-Zyklus nur lange PCR-Produkte mit variabler Länge entstehen, synthetisiert die Polymerase bereits im zweiten Zyklus Fragmente von spezifischer Länge. Dieses kurze PCR-Produkt erfährt in der Folge eine exponentielle Amplifikation, währenddem die Anzahl der langen Produkte nur linear zunimmt. Die Pfeile stellen in der Abbildung neu-synthetisierte Stränge dar.

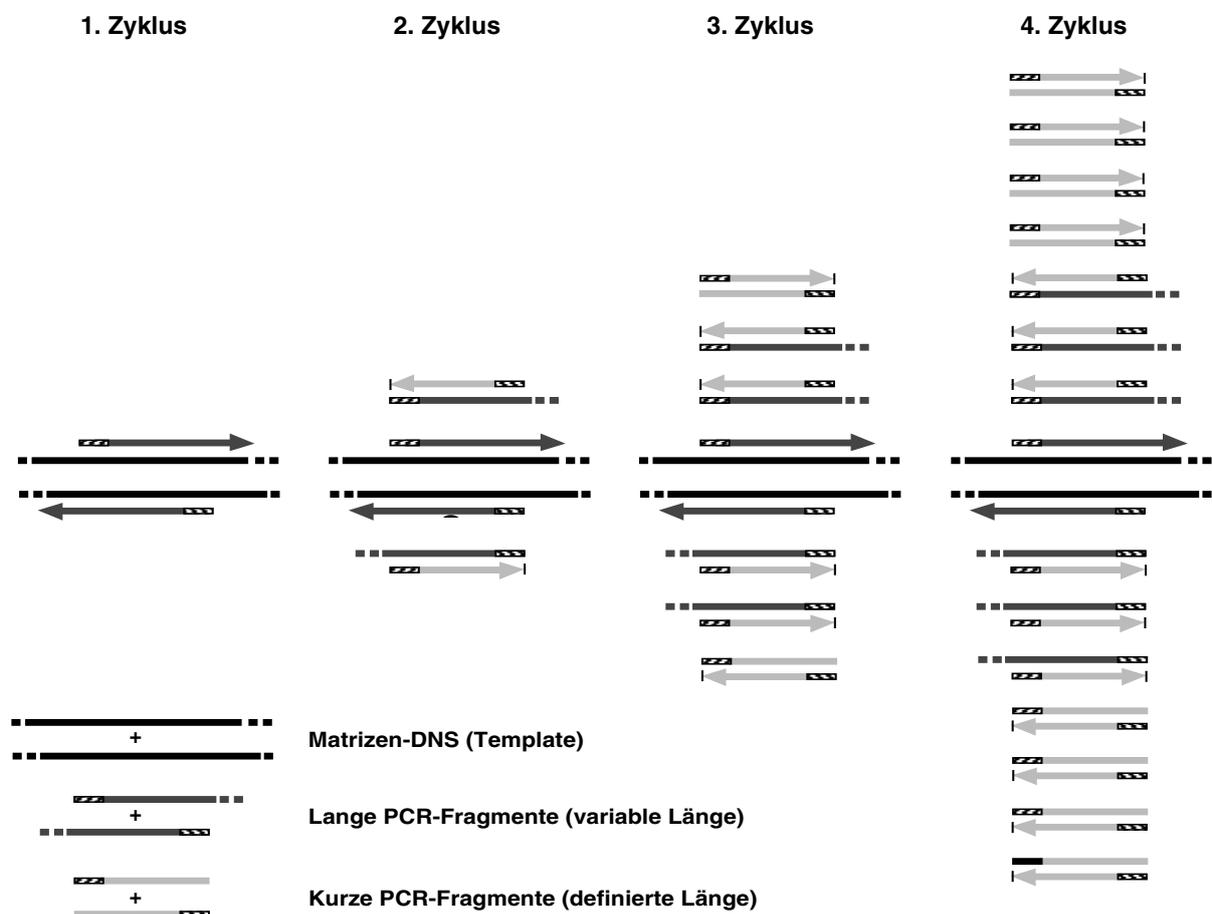


Abb. 15: Schematische Darstellung der PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) Screening Methode zum Nachweis von Punktmutationen (z.B. im RET Exon 10 und 11, welche die zysteinreiche Domäne kodieren). Entsprechende Genabschnitte werden mittels der PCR Technik millionenfach vermehrt (amplifiziert), hitzedenaturiert und die DNS-Einzelstrangfragmente auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel geladen. Einzelstrangfragmente falten sich entsprechend ihrer Nukleinsäuresequenz und können im elektrischen Feld wegen ihrer unterschiedlichen Wanderungseigenschaften aufgetrennt werden. Da Punktmutationen (Punkte) meist zu einer Veränderung der Faltungsstruktur führen, können mutierte DNS-Sequenzen an ihren veränderten Wanderungseigenschaften im Gel erkannt werden, welche sich durch das Auftreten von zusätzlichen Banden im Silber-gefärbten Gel äussern (Pfeilspitzen). Gensequenzen von Patienten mit aberranten Bandenmustern werden zur Bestätigung und genauen Bestimmung einer Mutation anschliessend sequenziert, d.h. deren Nukleinsäuresequenz ermittelt und mit der normalen Sequenz verglichen.

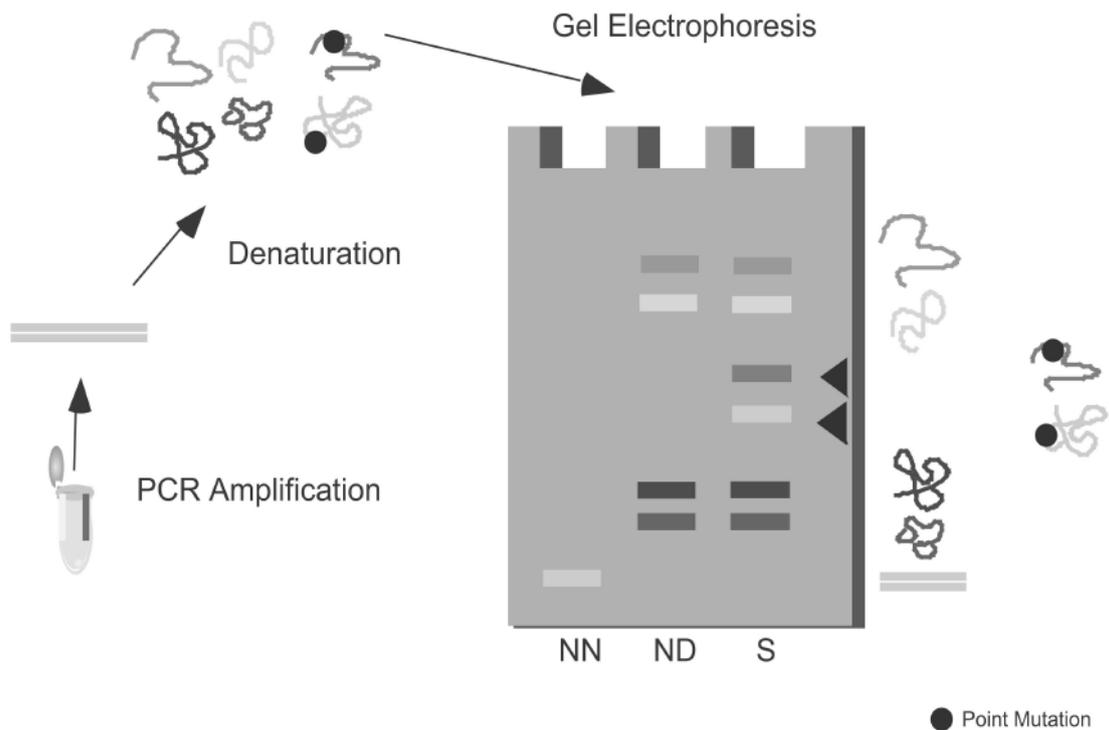


Abb. 16: DNS-Sequenzbestimmung. Das Prinzip der Terminationsmethode nach Sanger beruht auf dem Ablesen einer Matrizen-DNS und der Neusynthese des komplementären Stranges durch eine DNS Polymerase. Dabei werden in vier getrennten Synthese-Reaktionen zusätzlich zu den üblichen Deoxynukleotiden je ein Dideoxy-Derivat eines der Nukleotide beigemischt. Dieses Dideoxynukleotid wird zwar wie ein normales Nukleotid in den neusynthetisierten Strang eingebaut, führt aber danach zum spezifischen Synthese-Abbruch, da die 3'-Hydroxylgruppe für das Anhängen des nächsten Nukleotides fehlt. Während der Reaktion erhält man Fragmente unterschiedlicher Länge, welche mit der Primer-Sequenz beginnen und zum Beispiel mit Adenin - bei Einbezug von Dideoxyadenosin im Reaktionsgemisch - enden.

Die vier separaten Reaktionen werden anschliessend auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel nach Grösse aufgetrennt, wobei das kürzeste Fragment unten und das längste oben auf dem Gel erscheint. Die Sequenz des neu-synthetisierten Stranges - also der Komplementär-Strang zur Matrizen DNS - lässt sich sehr einfach von unten nach oben auf dem Gel lesen. Damit die Fragmente überhaupt sichtbar werden muss der Primer, oder eines der Deoxynukleotide einen Marker (z.B. 35S, 32P oder ein Fluorochrom) tragen. Als Matrizen-DNS können einzelsträngige oder denaturierte, doppelsträngige DNS-Fragmente, welche durch Klonieren oder PCR-Amplifikation isoliert wurden, verwendet werden.

