

**Molekularpathologie in der Pathologie**  
**Institut für Pathologie, Neuropathologie und Molekularpathologie**  
**30175 Hannover Berliner Allee 48**  
**Vortrag auf dem 8. Bundeskongress Pathologie Berlin 2008**  
**(16.-18.Mai 2008)**

Sehr geehrte Herren Vorsitzende, sehr geehrte Damen und Herren !

Folie 1

Mit diesen Folien und der Präsentation möchten wir unsere hannoversche Gemeinschaftspraxis für Pathologie mit integrierter Molekularpathologie vorstellen. Das jetzige Institut für Pathologie, Neuropathologie und Molekularpathologie wurde 1981 gegründet – also zu einer Zeit als die Molekularpathologie noch in frühesten Kinderschuhen steckte.

Der Praxisgründer Prof. Klaus Richter sah in der sich entwickelnden Molekularpathologie und insbesondere der Tumorbilogie eine neue visionäre Dimension möglicher Nachweisreaktionen bzw. eine „Pathologie auf molekularer Ebene“.

Folie 2

Mit dieser Vision, diesem Gedanken bzw. Traum nach dem Motto „nothing happens unless there is first a dream“ – sollte der Grundstein für die Einrichtung eines molekularpathologischen Labors gelegt sein. Diese Entwicklung war verbunden mit Weiterbildungen, Fortbildungsmaßnahmen und –programmen in dem speziellen Gebiet der Molekularpathologie, Einstellung von interessiertem Personal (MTA und veterinär-medizinische Fachärztin) für den labortechnischen Bereich. Danach galt es die verschiedenen Nachweissysteme zu erproben, zu etablieren der Routinediagnostik zugänglich zu machen.

Folie 3

Die ersten für die tägliche Routinediagnostik einsetzbare Untersuchung war die in-situ-Hybridisierung zum Nachweis von HPV. Es bestand seinerzeit eine sehr große Nachfrage seitens einer Vielzahl klinischer Fachrichtungen vor allem der Gynäkologie, Proctologie, HNO- und Stomatologie und weiterer Fachrichtungen. In den nächsten Jahren folgten weitere Untersuchungsmethoden wie Monoklonalitätsnachweis, Fragmentanalyse, Sequenzierung und Fluoreszenz in situ-Hybridisierung.

Seinerzeit waren wir nahezu die einzige private bzw. niedergelassene Praxis in Deutschland, die diese Leistungen anbot. Da bekanntlich die Leistungsziffern des EBM den aktuellen Leistungsangeboten oft hinterherhinken und nur zum Teil erst nach mehreren Jahren aktualisiert bzw. ergänzt werden, standen keine Abrechnungsmöglichkeiten für die neuen molekularpathologischen Untersuchungsmethoden zur Verfügung.

Auf Antrag und nach Prüfung der fachlichen Kompetenz wurde uns von der KVN eine entsprechende Abrechnungsziffer zur Verfügung gestellt.

Zeitgleich fiel diese Bereitstellung einer Molekularpathologie-Abrechnungsziffer mit der Deckelung des Budgets für Pathologen. Die sich daraus ergebenden Folgen kann sich jeder ausmalen : unser Institut hatte einen großen Teil des Budgets der niedersächsischen Pathologen in Anspruch genommen. Unsere ehemals befreundeten Kollegen und Kolleginnen waren plötzlich zu erbitterten Feinden geworden.

Jedoch hatte „unser Problem“ auch eine positive – nachhaltige – Auswirkung: auf diesem Weg ist die Bundes-KV auf die Bedeutung der Molekularpathologie im Fachbereich Pathologie aufmerksam geworden.

Dieses finanzielle Problem hat sich insofern von selbst gelöst, als nach kurzer Zeit Fachkollegen und Labormediziner diese Untersuchungen ebenfalls anboten.

Wir haben das Spektrum der molekularpathologischen Leistungen dem Wissenstand regelmäßig und zeitnah angepasst sowie erweitert.

#### Folie 4

Die folgende Übersicht zeigt die Untersuchungsmethoden die derzeit bei uns etabliert und für die tägliche Diagnostik zur Verfügung steht.

Unter Punkt 1. genannte Polymerase-Ketten-Reaktion mit weiterführenden Methoden wie nested-PCR, Hybridisierung, Restriktionsanalyse, Sequenzierung, Fragmentanalyse und Mutationsspezifische PCR.

Unter Punkt 2. aufgeführte Fluoreszenz in situ-Hybridisierung.

Im Folgenden möchte ich die genannten molekularpathologischen Methoden durch einige Beispiele illustrieren.

#### Folie 5

Die nested-PCR wenden wir vorwiegend für den Bakterien- und Virusnachweis an. Genannt seien unter den viralen Nachweisen das Epstein-Barr-Virus und humanes Herpes-Virus. Der Erregernachweis von Borrelien hat gegenüber den labormedizinischen Methoden den Vorteil, dass die Untersuchungsergebnisse nach zwei Tagen vorliegen, so dass ggf. eine zeitnahe Therapie erfolgen kann.

Der Monoklonalitätsnachweis der B- und T-Zell-Lymphome basiert ebenfalls auf den Methoden der nested-PCR. Der Monoklonalitätsnachweis macht insgesamt rund 25 % der gesamten nested-PCR-Untersuchungen aus, der übrige Anteil entsteht durch den spezifischen Erregernachweis. Insgesamt wenden wir die Methode der nested-PCR in fast 800 Fällen pro Jahr an.

#### Folie 6

Dieses Bild zeigt ein typisches polyklonales Bandenmuster in der Gel-Elektrophorese links im Bild in dem Lauf 1 und 2 sowie 7 und 8.

Demgegenüber steht eine positive Kontrolle mit typischem solitärem Bandenmuster in dem Lauf 3 und 4 sowie 9 und 10.

Die Kammern 5 und 6 sowie 11 und 12 entsprechen der Negativ-Kontrolle, die wir mit destilliertem Wasser durchführen.

Rechts im Bild : seit Juni 2007 führen wir zusätzlich eine Fragmentanalyse im Monoklonalitätsnachweis durch zum Ausschluss eines Zellklons in einem polyklonalen Hintergrund.

#### Folie 7

Die in-situ-Hybridisierung führen wir in ca. 2000 Fällen pro Jahr durch und wenden diese zum HPV-Nachweis an. Bis März 2007 erfolgte der Nachweis von HPV high- und low-risk-Gruppen mit dem hybride capture II-Test. In diesem Sonden-Mix wurde zwischen high- und low-risk-HPV-Gruppen unterschieden.

#### Folie 8

Ersetzt wurde dieser Test durch den Chipron-Test, der zusätzlich zum Nachweis einer HPV-Infektion die Differenzierung verschiedener HPV-Typen sowie eine wichtige Zusatzinformation in Form der Bestimmung der Viruslast erlaubt

#### Folie 9

Restriktionsanalysen führen wir in ca. 200 Fällen pro Jahr zum Nachweis einer Hämochromatose und Herpes simplex I/II durch.

#### Folie 10

Hier wird der typische Nachweis einer positiven Herpes simplex I-Infektion bildhaft dargestellt Die Konsensus-PCR zeigt ein typisches Bandenmuster bei 431 Basenpaaren und nach ergänzender Restriktionsanalyse zwei DNA-Stränge von 74 und 357 Basenpaaren, die ausschließlich bei der Herpes simplex I-Virusinfektion zu finden sind (im rechten Bild dargestellt).

#### Folie 11

Die Sequenzierung von humanen und nicht-humanen Genomen ist in der Übersicht dargestellt. Seit Anfang 2008 sind Mutationsnachweise am K-ras-Gen nach abgeschlossenem Ringversuch an der Universität München auch mittels Sequenzierung diagnostizierbar.

#### Folie 12

Sequenzierung mit ABI 310 : sequenzierter Abschnitt des Chromosomen 12 am Exon 1. Der im Kodon 12 nachweisbare Austausch von G→A beweist eine K-ras-Mutation. Die normale Sequenz vom Wild-Typ ist in der unteren Abbildung dargestellt.

#### Folie 13

Fragmentanalysen werden in unserem Institut in ca. 15 Fällen pro Jahr durchgeführt. Diese Methode dient dem Nachweis von Mikrosatelliteninstabilitäten bei möglichem Vorliegen eines HNPCC-Syndroms.

Diese Untersuchungsmethode gibt Hinweis auf einen Defekt der Gene für die typischen Reparaturenzyme MLH1, MSH2 und MSH6.

#### Folie 14

Sofern nicht klinisch bereits die Frage nach einer möglichen genetischen Disposition im Untersuchungsantrag gestellt ist, gehen wir strukturiert nach Histomorphologie, klinischen Zusatzangaben und Lokalisation einem möglichen genetischen Hintergrund nach – sofern eine derartige Zusatzuntersuchung gewünscht wird. Der histomorphologische Aspekt allein kann auch Hinweise für das Vorliegen eines hoch mikrosatelliteninstabilen Tumors geben. Ergänzend durchgeführte Immunhistologie für die Reparaturenzyme MLH1, MSH2 und MSH6 (wie linksseitig im Beispiel aufgeführt mit einem negativem Färbeergebnis für den Antikörper MSH2). Die anschließende molekularpathologische Zusatzuntersuchung der Fragmentanalyse zeigt einen hoch mikrosatelliteninstabilen Tumor (in den Gen-Fragmenten BAT 25, BAT 26 und MFD 15. Diese Untersuchungsergebnisse beweisen ein hoch mikrosatelliteninstabiles Colonkarzinom in drei von fünf untersuchten Genloci.

#### Folien 15/16

Die mutationsspezifische Polymerase-Ketten-Reaktion erwähnen wir an dieser Stelle, um das gesamte Spektrum zu erfassen, wenngleich diese spezielle Untersuchung mit ca. einem Fall pro Jahr äußerst selten durchgeführt wird. Typischerweise ist die Indikation bei fibrösen Dysplasien gestellt. Diese Untersuchung dient dem möglichen Nachweis einer Mutation am GNAS-Gen Kodon 201. Diese Untersuchung kann im Umkehr natürlich auch zum Ausschluss einer möglichen Mutation durchgeführt werden bei indifferenter Histomorphologie in Verbindung mit dem klinischen Bild.

#### Folie 17

In der Übersicht der Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH) sind einerseits Nachweise von Translokationen im Rahmen verschiedener Lymphome und Sarkome erwähnt sowie einzelne Leukämieformen. Daraus ergibt sich ein mittlerweile breites Spektrum möglicher Indikationen für die FISH-Untersuchungen. Wegen der klinischen bzw. therapeutischen Konsequenz gehen wir in Folie 18 näher auf die HER2-/neu-Untersuchung ein.

#### Folie 18

Sämtliche Mammakarzinome werden ergänzenden immunhistochemischen Untersuchungen zugeführt einschließlich Hormonrezeptorstatus und Hercep-Test der FA Roche. In die Gruppe der zweifach positiven immunhistologischen Färbereaktionen wird – nach klinischer Anforderung – eine zusätzliche FISH-Untersuchung durchgeführt. Diese Methode zeigt einen Fluoreszenz-Farbstoff am Centromer und HER2-/neu-Gen. Im normalen nicht amplifizierten Zellkern bei den euploiden bzw. diploiden Chromosomensatz entstehen zwei rote und zwei grüne

Signale. In dem eingebrachten Bild auf der rechten Seite ein typischer hoch amplifizierter Fall für HER2-/neu mit einem Gesamtquotienten von über 3. Anzumerken ist, dass eine Polyploidie bei jeweils zwei Centromer-Signalen pro Zellkern hier sicher ausgeschlossen werden kann.

#### Folie 19

Der Umfang sämtlicher molekularpathologischer Untersuchungen ist in dieser Übersicht zusammengefasst und durch Anzahl der Fälle pro Jahr ergänzt. Häufigste Untersuchungen die in situ-Hybridisierung, nested-PCR und Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung.

Mit diesem Angebot von molekularpathologischen Leistungen haben wir zu keinem Zeitpunkt Werbung betrieben. Einzelne diesbezügliche Aktivitäten wurden im Rahmen von Vorträgen und Präsentationen regional und überregional in Niedersachsen vorgestellt.

Die Akzeptanz ist - wie aus den Ausführungen zu entnehmen - sehr gut von Seiten klinischer Kolleginnen und Kollegen, aus verschiedenen Krankenhäusern und niedergelassenen bzw. privat geführten Praxen.

Unsere unmittelbaren Fachkollegen in und um Hannover nutzen unser Leistungsangebot für ergänzende molekularpathologische Untersuchungen nicht. Der Grund dafür könnte in sogenannten interkollegialen Berührungängsten bestehen.

Möglicherweise werden durch zunehmende Vernetzungen und Zusammenschlüsse diese molekularpathologischen und zusätzlichen Untersuchungen besser akzeptiert.

#### Folie 20

Zur Wirtschaftlichkeit dieser speziellen Leistungen in unserem Institut kann soviel gesagt werden, als dass sich diese Abteilung des Hauses durch ihre Leistungen selbst finanziert. In manchen Quartalen entsteht ein - wenn auch kleiner - Gewinn. Einnahmen setzen sich aus dem kassenärztlichen, privatärztlichen und stationären Sektor sowie der IGEL-Leistungen zusammen. Letztere machen mehr als die Hälfte sämtlicher molekularpathologischer Leistungen bei uns aus.

#### Folie 21

Ein großer Dank gilt allen Mitarbeiterinnen, ohne deren Engagement der Aufbau und die Etablierung eines so hoch spezialisierten Labors nicht möglich gewesen wäre.

Die ersten DISH-Untersuchungen wurden 1984 durch die leitende Arzthelferin Frau Heise in einem Nebenraum des Histologie-Labors durchgeführt.

Nach weiterem Ausbau und Erweiterung des Instituts 1994 wurde das molekular-genetischen Labor unter der Führung von Frau Dr. med. vet. Henneicke eine eigenständige Abteilung.

#### Folie 22

Mit diesen Ausführungen hoffen wir Ihnen Geschichte, Entwicklung und Leistungsangebot einschließlich Indikationen und Akzeptanz unseres Instituts mit integrierter Molekularpathologie nahe gebracht zu haben.

Die Einrichtung und Etablierung der Molekularpathologie in unserem Haus wäre ohne eine Vision in den Jahren 1984-85 sicherlich nicht Realität geworden.

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit