

**Aus dem Institut für Pathologie und Neuropathologie der
Universität Tübingen
Abteilung Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
(Lehrbereich Rechtsmedizin)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. F. Fend**

**Immuncytochemische Differenzierung von
Schleimhaut- und Hautzellen an forensischen Spuren**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Maximilian Géza David Buschner

aus

Ravensburg

2012

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

Professor Dr. F. Wehner

Professor Dr. J. Bauer

Meinen Eltern

Inhalt

1	Einleitung.....	9
1.1	Gewaltverbrechen in Deutschland.....	9
1.2	Cytoskelett	10
1.2.1	Aktinfilamente.....	11
1.2.2	Mikrotubuli.....	12
1.2.3	Intermediärfilamente	13
1.3	Fragestellung.....	16
2	Material.....	17
2.1	Immunhisto-/cytochemische Färbung	17
2.1.1	Chemikalien	17
2.1.2	Eindeckmedien.....	17
2.1.3	Fixationsmedien	17
2.1.4	Membranpermeabilisation	18
2.1.5	Objektträger	18
2.1.6	Sonstige Materialien.....	18
2.2	Antikörper.....	19
2.2.1	Anti-Cytokeratin 2e-Antikörper	19
2.2.2	Anti-Cytokeratin 4-Antikörper	19
2.2.3	Anti-Cytokeratin 7-Antikörper	19
2.2.4	Anti-Cytokeratin 8-Antikörper	20
2.2.5	Anti-Cytokeratin 13-Antikörper	20
2.2.6	Anti-Cytokeratin 15-Antikörper	20
2.3	Proben.....	21
2.3.1	Histologische Proben	21
2.3.2	Abstrichmaterial	21
2.3.3	Mischproben (postkoital)	21
2.3.4	Zyklusabstriche	21
2.3.5	Urinproben	21
2.3.6	Spermaproben	22
2.3.7	Biopsien	22
3	Methodik.....	23
3.1	Histologie	23

3.1.1	Herstellung von Paraffinschnitten.....	23
3.1.2	Kontrolle der Gewebeschnitte	23
3.1.3	Färbeprotokolle	23
3.1.4	Spezifische Färbvorschriften der einzelnen Antikörper	25
3.1.5	Beurteilung der Färbeergebnisse	29
3.2	Cytologie	30
3.2.1	Fixation.....	30
3.2.2	Permeabilisierung	32
3.2.3	„InCup“-Färbung.....	34
3.2.4	Färbeprotokolle	35
3.2.5	Beurteilung der Färbeergebnisse	39
3.3	EnVision+ System-HRP (DAB).....	40
3.4	Microdissektion.....	41
3.4.1	Vorbereitung der Objektträger.....	41
3.4.2	Auftragen der Zellsuspension.....	41
3.4.3	Laser-Mikrodissektion	41
3.4.4	DNA-Isolierung.....	42
3.4.5	DNA-Quantifizierung	45
3.4.6	RNA-Isolierung.....	45
3.4.7	Statistik.....	47
4	Ergebnisse	48
4.1	Histologie	48
4.1.1	Cytokeratin 1	48
4.1.2	Cytokeratin 2e	48
4.1.3	Cytokeratin 4	49
4.1.4	Cytokeratin 5/6	49
4.1.5	Cytokeratin 7	49
4.1.6	Cytokeratin 8.....	49
4.1.7	Cytokeratin 13.....	50
4.1.8	Cytokeratin 14	50
4.1.9	Cytokeratin 15.....	50
4.1.10	Cytokeratin 16	50
4.1.11	Cytokeratin 17	50

4.1.12	Cytokeratin 18	51
4.1.13	Cytokeratin 19	51
4.1.14	Cytokeratin 20	51
4.1.15	Cytokeratin 903	51
4.1.16	Pancytokeratin AE1_3.....	51
4.1.17	Pancytokeratin CAM 5_2.....	51
4.1.18	Östrogenrezeptor	51
4.2	Cytologie	52
4.2.1	Vorversuche Cytokeratin 4.....	52
4.2.2	Vorversuche Cytokeratin 13.....	53
4.2.3	Vorversuche Christmas tree stain / Spermien	53
4.2.4	Vergleich der Fixationsmethoden.....	54
4.2.5	Zyklusabstriche	66
4.2.6	Postkoitale Abstriche.....	66
4.2.7	Versuchsteil Alte Abstriche.....	67
4.2.8	Cytokeratin 8.....	67
4.3	DNA.....	68
4.4	RNA.....	69
4.4.1	Biopsien	48
4.4.2	Abstriche	69
5	Diskussion	70
5.1	Material und Methodik.....	70
5.1.1	Proben und Fixation	70
5.1.2	Immunhisto- und -cytochemische Färbung	70
5.2	Histologie	71
5.2.1	Identifizierung geeigneter Antikörper.....	71
5.3	Cytologie	74
5.3.1	Vorversuche Zellpenetration	74
5.3.2	Zu InCup vs Objektträgerfärbung.....	74
5.3.3	Zu Vergleich Fixationsmethoden und Permeabilisation	74
5.3.4	Zu Vorversuche Cytokeratin 13.....	76
5.3.5	Zu Spermien.....	76
5.3.6	Zu Zyklusabstriche	77

5.3.7	Postkoitale Abstriche.....	77
5.3.8	Alte Abstriche	77
5.3.9	Cytokeratin 8.....	77
5.4	DNA.....	78
5.5	RNA.....	79
6	Zusammenfassung.....	80
7	Anhang.....	81
7.1	Anhang I - Tabellen	81
7.2	Anhang II - Abbildungen.....	100
7.3	Abkürzungsverzeichnis	122
8	Literaturverzeichnis	123
	Danksagung	127

1 Einleitung

1.1 Gewaltverbrechen in Deutschland

Zwischen 7% und 36% der Frauen geben an während ihrer Kindheit Opfer sexueller Gewalt gewesen zu sein [1]. Eine repräsentative Umfrage des Bundesministeriums für Familie, Senioren, Frauen und Jugend ergab, dass 40% der befragten Frauen ab dem 16. Lebensjahr körperlicher und/oder sexueller Gewalt ausgesetzt waren [2]. Laut Statistischem Bundesamt kam es im Jahre 2006 zu 566 Verurteilungen wegen Mordes und Totschlags (einschließlich versuchter Mord und Totschlag), zu 2149 Verurteilungen wegen sexuellen Missbrauchs von Kindern und zu 1835 Verurteilungen wegen sexueller Nötigung und Vergewaltigung [3] – Zahlen, die die Notwendigkeit intensiver Forschungen zum Zwecke der Aufklärung von Gewaltverbrechen eindrucksvoll belegen.

Die Etablierung des genetischen Fingerabdrucks hat wesentlich zur Erleichterung der Identifikation von Tatverdächtigen, besonders auf dem Gebiet der Gewaltdelikte, geführt. Doch reicht die eindeutige Zuordnung einer Spur zum entsprechenden Spurenleger oftmals nicht aus, um diesem auch die begangene Tat nachzuweisen. Es ist daher vonnöten Methoden zu entwickeln, die eine genauere Rekonstruktion des Tathergangs ermöglichen. Ein wichtiger Schritt ist dabei die Zuordnung von Zellspuren zu ihrem Ursprungsgewebe. Dies würde es beispielsweise ermöglichen, die Art eines stattgehabten Kontakts zwischen Täter und Opfer zu ermitteln. Oftmals wird der Nachweis von Zellen des Opfers am Körper des Täters von diesem mit einem freiwilligen Kontakt durch die Hand des Opfers erklärt. Eine eindeutige Identifizierung von Schleimhautzellen würde dazu dienen, solche Einlassungen verifizieren oder verwerfen zu können.

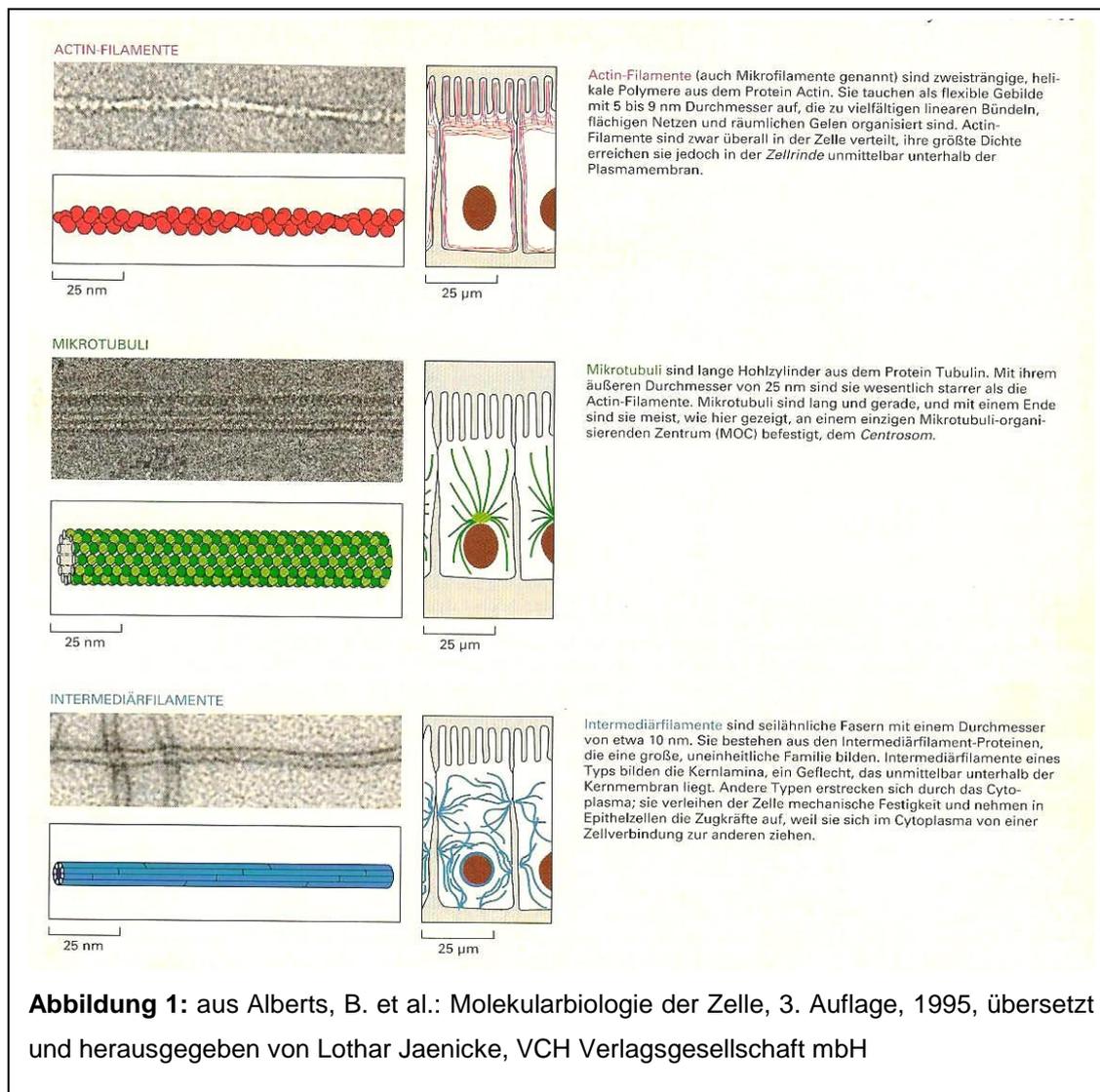
In jüngster Zeit wurden vermehrt Anstrengungen unternommen eine eindeutige Identifizierung von Schleimhautzellen mittels immuncytochemischer Färbemethoden zu ermöglichen. Diese waren jedoch entweder nicht spezifisch [4] oder stark von der Erfahrung des Untersuchers abhängig [5]. Die Notwendigkeit einer verlässlichen Methode, die auch geringe Mengen an Abstrichmaterial eindeutig dem Ursprungsgewebe zuzuordnen vermag, steht daher nach wie vor außer Frage. Die vorliegende Arbeit soll dazu einen Beitrag leisten.

Die vorliegende Arbeit stellt einen neuen Ansatz zur Identifikation von Schleimhautzellen an forensischen Spuren dar. Sie macht sich dabei die für unterschiedliche Epithelien charakteristische Zusammensetzung des Cytoskeletts ihrer Zellen zunutze. Im Folgenden sollen daher zunächst die Bestandteile dieses Cytoskeletts vorgestellt werden.

1.2 Cytoskelett

Die eukaryontische Zelle enthält im Gegensatz zur prokaryontischen, wie sie beispielsweise Bakterien eigen ist, ein aus Proteinen aufgebautes Cytoskelett. Dieses erfüllt zahlreiche Aufgaben, ohne die das Zusammenspiel der Zellen in einem Organismus undenkbar wäre. Die Funktionen des Cytoskeletts erstrecken sich von der gerichteten Bewegung der Zelle, über die Verbindung der Zellen untereinander, der Stabilität der Einzelzelle wie des Zellverbandes, bis hin zum Transport von Stoffwechselpro- und -dukten innerhalb der Zelle. Aus der Fülle an Aufgaben, die die Zelle und der Organismus an das Cytoskelett stellen, erklären sich denn auch die Vielfalt und charakteristischen Unterschiede innerhalb der Gruppe der das Cytoskelett bildenden Proteine.

Man unterscheidet im Wesentlichen drei Gruppen von Proteinen des Cytoskeletts, Aktinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente (siehe Abb. 1). Ihnen gemeinsam ist die Bildung von Polymeren aus identischen Untereinheiten, jeweils in helikaler Anordnung. Sie unterscheiden sich dagegen in ihrer Größe sowie in ihren jeweiligen Aufgaben. Bemerkenswert ist der Grad der Konservierung von Aktinfilamenten und Mikrotubuli während der Evolution. Ein Grund hierfür ist die Fülle an Wechselwirkungen, die diese Elemente des Cytoskeletts mit anderen zellulären Proteinen eingehen.



1.2.1 Aktinfilamente

Am kleinsten sind die Aktinfilamente, auch Mikrofilamente (*gr.* μικρός = klein, *lat.* fila = Faden) genannt, mit einem Durchmesser zwischen 5 und 9 nm. Ihre Grundeinheit bildet das G-Aktin (globuläres Aktin), das aus 375 Aminosäuren besteht und jeweils ein ATP-Molekül trägt. Aus diesen Bausteinen bilden sich polare helikale Polymere, F-Aktin genannt. Dabei wird ein \ominus (Minus)-Ende von einem \oplus (Plus)-Ende unterschieden, von welchen letzteres ein wesentlich schnelleres Wachstum aufweist. Die Zellen der höheren Eukaryonten besitzen mehrere Isotypen von Aktinen, die untereinander jedoch nur geringe Unterschiede hinsichtlich der Aminosäuresequenz aufweisen. Polymerisation und Depolymerisation der Aktinfilamente stehen im Gleichgewicht. Die Depolymerisation wird durch die Hydrolyse des gebundenen ATP ermöglicht.

Zur Erfüllung ihrer Aufgaben in der Zelle benötigen die Aktinfilamente die Unterstützung Aktin-bindender Moleküle. Bekanntestes Beispiel ist Myosin, welches in Muskelzellen die Bewegung der Aktinfilamente gegeneinander und somit die Kontraktion des Muskels ermöglicht. Daneben gibt es jedoch weitere Proteine, die beispielsweise an der Vernetzung der Aktinfilamente untereinander sowie mit anderen zellulären Proteinen, der Bildung unterschiedlich viskösen Aktinagels, oder etwa dem Transport von Zellorganellen an den Aktinfilamenten zu ihrem Bestimmungsort innerhalb der Zelle beteiligt sind.

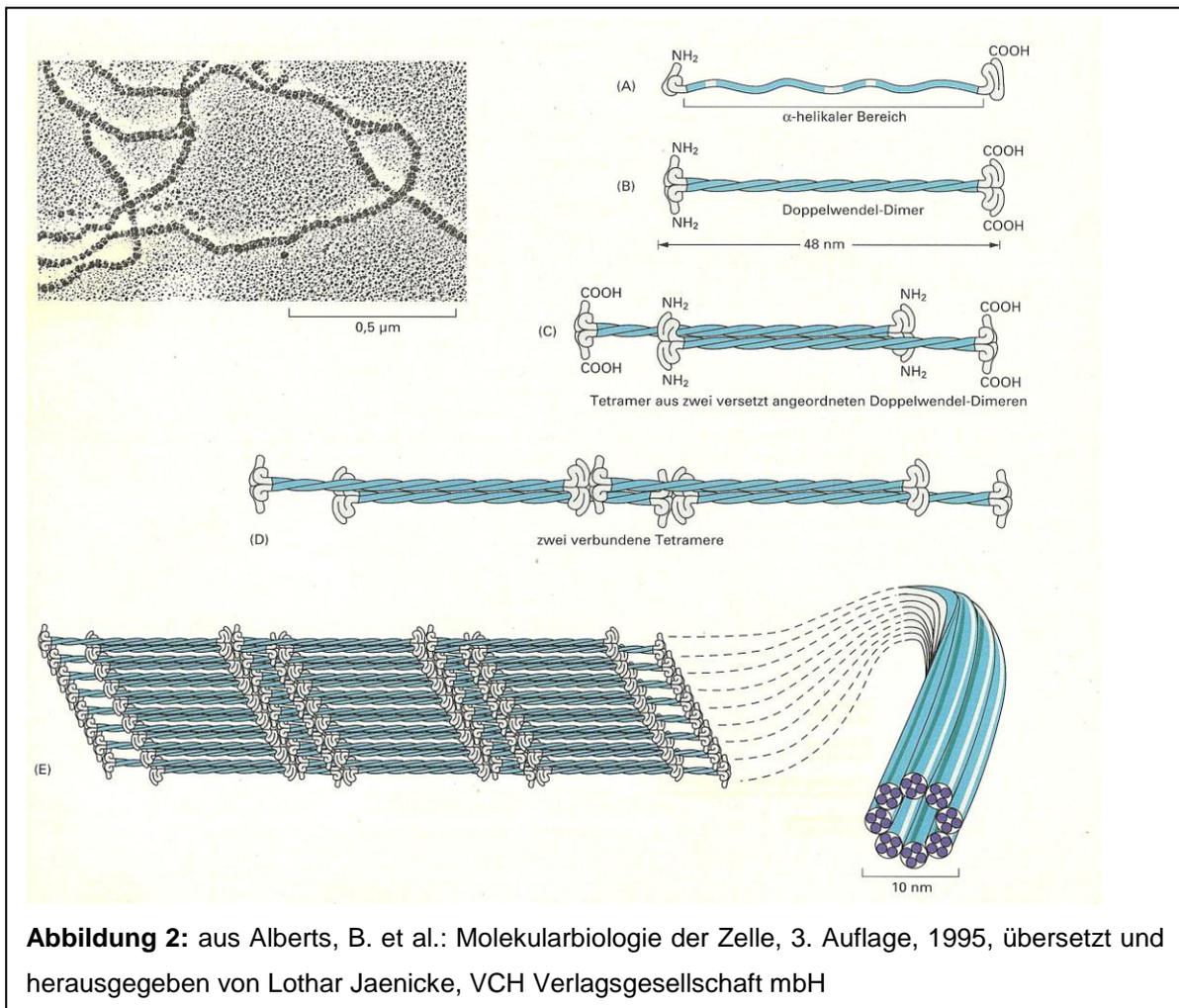
1.2.2 Mikrotubuli

Im Gegensatz zu den verhältnismäßig kleinen Aktinfilamenten, haben die Mikrotubuli einen Durchmesser von 25 nm und stellen damit die größten Proteine des Cytoskeletts dar, auch sind sie wesentlich steifer als jene. Tubulin, ein Heterodimer aus α - und β -Tubulin, ist die globuläre Form und kann sich zu röhrenförmigen Mikrotubuli (lat. tubulus = Röhrchen) polymerisieren, welches im Querschnitt 13 Tubulinmoleküle enthält. Wie die Aktinfilamente sind auch Mikrotubuli polare Gebilde mit einem langsam wachsenden \ominus - und einem schnell wachsenden \oplus -Ende. Die Mikrotubuli setzen in der Regel an den Centrosomen an. Im Gegensatz zum ATP des Aktins, haben Tubulin-Moleküle GTP gebunden, doch auch hier wird die Energie, welche bei der Hydrolyse des Triphosphats freigesetzt wird, zur Depolymerisierung genutzt. Der Großteil der Mikrotubuli einer Zelle unterliegt einem ständigen Auf- und Abbau durch Polymerisierung und Depolymerisierung. Daneben wird ein Teil der Mikrotubuli durch bestimmte Faktoren „stabilisiert“, ihre Depolymerisierung also gehemmt. Dies trägt wesentlich zur Herstellung einer Zellpolarität bei. Einen Teil dieser stabilisierenden Faktoren stellen die Mikrotubuli-assoziierten Proteine, kurz MAP, dar, welche jedoch noch weitere Funktionen im Zusammenhang mit den Mikrotubuli erfüllen.

Zu diesen MAP gehören beispielsweise die HMW-Proteine (high molecular weight) und die τ -Proteine (tau) des Gehirns, Dynein und Kinesin. Letztere sind für den gerichteten Transport beispielsweise von Zellorganellen verantwortlich. Dabei ist Kinesin für den Transport in Richtung Zellperipherie, Dynein für die umgekehrte Bewegungsrichtung verantwortlich. Eine wesentliche Rolle spielen Mikrotubuli samt MAP zudem bei Mitose und Meiose.

1.2.3 Intermediärfilamente

In ihrer Größe zwischen Aktinfilamenten und Mikrotubuli liegen die Intermediärfilamente mit einem Durchmesser von ca. 10 nm. Aus diesem Umstand erklärt sich denn auch ihr Name. Ihre Funktion besteht im Wesentlichen in der Stabilisierung der einzelnen Zellen, vor allem bei der zellwandlosen tierischen Zelle, und verschiedener, besonders der mechanisch beanspruchten, Zellverbände. Während sich Aktinfilamente und Mikrotubuli in allen eukaryontischen Zellen finden, besitzen nur bestimmte mehrzellige Organismen Intermediärfilamente in den meisten ihrer Zellen; Prokaryonten, Pflanzen und Arthropoden dagegen nicht. Bemerkenswert ist der hohe Grad an Konservierung der Gensequenzen für Intermediärfilamente [6]. Alle Intermediärfilamente sind aufgebaut aus drei Grundeinheiten (siehe Abbildung 2), einem "Kopf" mit dem Amino-Ende der Aminosäuresequenz, einem "Schwanz" mit ihrem Carboxy-Ende sowie einer mittleren Domäne einer α -helikalen Aminosäuresequenz, welche aus Wiederholungen von jeweils sieben Aminosäuren besteht. Letzteres erleichtert das Zusammenlagern zweier paralleler α -Helices zu so genannten coiled coil- oder Doppelwendel-Dimeren, welche sich wiederum antiparallel aneinanderlagern können und somit ein Tetramer bilden. Diese verbinden sich schließlich zu den Intermediärfilamenten.



Im Gegensatz zu den beiden anderen Gruppen von Proteinen des Cytoskeletts ist diejenige der Intermediärfilamente in sich sehr viel heterogener. Man unterscheidet zunächst fünf Haupttypen, sogenannte sequence homology classes (SHC): Saure Keratine (SHC I), basische Keratine (SHC II), Desmin-/Vimentin-artige Proteine (SHC III), Neurofilamente (SHC IV) und schließlich Kernlamine (SHC V)[7].

1.2.3.1 Kernlamine

Die Kernlamine, oder kurz Lamine, liegen der Innenseite der inneren Membran des eukaryontischen Zellkerns als sogenannte Kernlamina an. Um nach der Translation in den Kern zu gelangen, enthalten sie ein entsprechendes Signalprotein.

Neurofilamente kommen in den Axonen von Nervenzellen vor. Man unterscheidet drei Typen von Neurofilament-Proteinen hinsichtlich ihres Molekulargewichtes: NF-L, NF-M und NF-H.

1.2.3.2 Desmin-/Vimentin-artige

Vimentin als Vertreter der Desmin-/Vimentin-artigen Proteine findet sich in Zellen mit mesodermalem Ursprung, in anderen Zellen dagegen nur im Verlauf ihrer Entwicklung. Zu den Vimentin-artigen Proteinen gehören GFAP (glial fibrillary acid protein) in den Astrozyten des ZNS und Desmin in Muskelzellen, wobei sich sein Verteilungsmuster in glatter und quergestreifter Muskulatur unterscheidet. Vimentin und Vimentin-artige Proteine können untereinander copolymerisieren.

1.2.3.3 Keratine

Eine sehr große Gruppe unter den Intermediärfilamenten stellen die Keratine (syn. Cytokeratine) dar. Man unterscheidet in erster Linie zwei Typen, saure (Typ I, Cytokeratine 9-20) und neutrale bzw. alkalische Keratine (Typ II, Cytokeratine 1-8). Die für die Cytokeratine codierenden Gene finden sich auf zwei Chromosomen: Chromosom 17q für Typ I, Chromosom 12q für Typ II. Die Nummerierung der Cytokeratine erfolgt nach nach ihrem relativen Molekulargewicht und dem isoelektrischen Punkt gemäß Moll et al. [8]. Beide Typen zusammengenommen kennt man bislang mindestens 20 [9] verschiedene in Epithelien vorkommende Keratine und mindestens acht weitere, die als so genannte „harte“ Keratine in Haaren und Nägeln zu finden sind. In selteneren Fällen findet sich ein Vorkommen von Cytokeratinen auch in nichtepithelialen Zellen [10]. Keratine vom Typ I können sich mit solchen des Typs II zu Heterodimeren, den o.g. coiled coils zusammenlagern, jedoch nicht – wie beim Vimentin und den Vimentin-artigen Proteinen der Fall – mit Keratinen des jeweils gleichen Typs [11] oder anderen Intermediärfilamenten [12]. Jedes epitheliale Gewebe besitzt eine charakteristische Kombination aus Keratinen, wobei Keratine der Typen I und II stets in äquivalenter stöchiometrischer Menge auftreten [9] mit Ausnahme von Cytokeratin 19, welches als Keratin vom Typ I keinen Partner des Typs II besitzt [13]. Zudem unterscheidet sich oftmals die Keratinzusammensetzung der basalen, proliferativen Zellschichten von derjenigen der oberflächlichen Schichten innerhalb einzelner Epithelien [14]. Diese Gewebespezifität wird sehr eindrücklich deutlich bei verschiedenen blasenbildenden [15-19] und anderen [20] Hautkrankheiten, welche auf Mutationen in Keratingenen beruhen. Je nach Art des fehlerhaft gebildeten Keratins treten die Blasen auf normaler Haut oder verschiedenen Schleimhäuten auf.

Große medizinische Relevanz haben die Cytokeratine in der Krebsdiagnostik erlangt [9, 13, 21-27]. Karzinome, die ja aus epithelialen Zellen hervorgehen, sind – sofern sie noch einen gewissen Grad an Differenzierung aufweisen – anhand der in ihren Zellen vorkommenden Cytokeratine ihrem Ursprungsgewebe zuzuordnen. Dies hat häufig konkrete therapeutische Konsequenzen.

1.3 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung einer Methode zur Identifizierung menschlicher Schleimhautzellen an forensisch relevantem Ausgangsmaterial. Weiterhin sollten die nunmehr eindeutig dem Ursprungsgewebe zuordenbaren Zellen zur DNA-Typisierung herangezogen werden, um sie auch der Person zuordnen zu können, von welcher sie stammen. Im Einzelnen lauteten die Fragestellungen:

- Identifikation geeigneter Antikörper und zugehöriger gewebsspezifischer Cytokeratine zum Nachweis von Schleimhaut an forensischem Spurenmaterial mittels Testung an histologischen Schnitten
- Identifikation geeigneter Fixations- und Permeabilisationstechniken zur möglichst verlustarmen Präparation cytologischen Spurenmaterials
- Anpassung der immunhistochemischen Färbetechniken an die besonderen Anforderungen cytologischer Präparate
- Testung etablierter Verfahren zur DNA-Isolation und -Quantifizierung aus immunocytochemisch gefärbtem Abstrichmaterial
- Quantitative Cytokeratin-spezifische mRNA-Bestimmung an Gewebebiopsien aus unterschiedlicher Lokalisation

2 Material

2.1 Immunhisto-/-cytochemische Färbung

2.1.1 Chemikalien

- Dako Envision+ System-HRP (DAB) (Dako GmbH, Hamburg)
- TBS – TRIS-Buffered Saline (Dako GmbH, Hamburg)
- TBST – TBST Tris Buffered Saline with Tween 20 10x Concentrate (Dako GmbH, Hamburg)
- PBS - Phosphate buffered saline
- Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin, BSA) 1% und 3% in PBS
- Demaskierungspuffer:
 - Mikrowelle: Citratpuffer pH 6
 - Dampfgarer: 0,1 M EDTA in Aqua dest. pH 8
- Xylol
- Alkoholreihe: Ethanol 99,9x% (vergällt mit x), 96%, 70%, Aqua dest.
- Delimiting Pen (Dako Pen, Dako GmbH, Hamburg)
- Häkalaun
- Negativkontrolle: Maus IgG1 (Klon DAK-GO1; Dako GmbH, Hamburg)

2.1.2 Eindeckmedien

- Glyceringelatine nach Kaiser
- Aquatex (wässriges Eindeckmedium, Merck KGaA, Darmstadt)
- Pertex (nicht-wässriges Eindeckmedium)

2.1.3 Fixationsmedien

- CytoRich Red Collection Fluid (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA)
- Inside Fix (Inside Stain Kit, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach)
- EtOH/Ether : Ethanol:Diethylether 1:1

2.1.4 Membranpermeabilisation

- Tween 20: Polysorbat 20 (Dako GmbH, Hamburg)
- Trypsin
- Saponin
- Digitonin
- Inside Perm (Inside Stain Kit, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach)

2.1.5 Objektträger

- Histobond Adhäsive Objektträger mit silanisierten Oberflächen (Paul Marienfeld GmbH & Co. KH, Lauda-Königshofen)
- PALM Membrane Slides x mm (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen)

2.1.6 Sonstige Materialien

- Pipetten (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Wattestäbchen (Fa. MSP Schmeiser, Horb/Neckar)
- Spurensicherungs-Kit
- Blaugel
- Poly-L-Lysin

2.2 Antikörper

Es sind im Folgenden Auszüge aus den Datenblättern der jeweiligen Hersteller aufgeführt.

2.2.1 Anti-Cytokeratin 2e-Antikörper

- Hersteller: Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen
- Spezifität: Monoklonaler Antikörper gegen epidermale Zellen der obersten suprabasalen Schichten, einschließlich Kopfhaut, Fuß und Sohle
- Klon: Ks 2.342.7.4
- IgG Klasse: IgG1 (Maus)
- Antigen: Synthetisches Peptid des humanen Cytokeratin K2 (MW 65,852)

2.2.2 Anti-Cytokeratin 4-Antikörper

- Hersteller: Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK
- Spezifität: Humanes Cytokeratin 4 Intermediärfilamentprotein.
- Klon: 6B10
- IgG Klasse: IgG1
- Antigen: Epithelzelle aus dem menschlichen Ösophagus
- Positivkontr.: Cervix oder Tonsille

2.2.3 Anti-Cytokeratin 7-Antikörper

- Hersteller: Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK
- Spezifität: Humanes Cytokeratin 7 Intermediärfilamentprotein
- Klon: LP5K
- IgG Klasse: IgG2b
- Antigen: Cytoskeletale Proteine aus kultivierten HeLa-Zellen

2.2.4 Anti-Cytokeratin 8-Antikörper

- Hersteller: Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK
- Spezifität: Humanes Cytokeratin 8 Intermediärfilament
- Klon: TS1
- IgG Klasse: IgG1

2.2.5 Anti-Cytokeratin 13-Antikörper

- Hersteller: BioGenex, San Ramon, USA
- Spezifität: Humanes Cytokeratin 13
- Klon: AE8
- IgG Klasse: IgG (Maus), nicht näher bezeichnet
- Antigen: Menschliches epidermales Keratin

2.2.6 Anti-Cytokeratin 15-Antikörper

- Hersteller: Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK
- Spezifität: Humanes Cytokeratin 15 Intermediärfilamentprotein
- Klon: LHK15
- IgG Klasse: IgG2a, kappa
- Antigen: Synthetische Peptidsequenz von Cytokeratin 15

2.3 Proben

2.3.1 Histologische Proben

Es wurden Gewebeproben aus Obduktionen des Instituts für Gerichtliche Medizin der Universität Tübingen verwandt. Dabei handelte es sich einerseits um zu Beginn der Forschungsarbeit bereits asservierte Proben, andererseits um solche, die im Laufe dieser Arbeit im Rahmen rechtsmedizinischer Obduktionen gewonnen wurden.

Von den anfänglich 101 Gewebeproben wurden schließlich die in den Tabellen 1 und 2 (siehe Anhang I) für die einzelnen Antikörper angegebenen Proben verwendet.

2.3.2 Abstrichmaterial

Freiwillige Probanden, die mithilfe von Aushängen am gesamten Klinikum gewonnen worden waren, wurden gebeten Abstriche von Felder- und Leistenhaut, Wangenschleimhaut, der Glans penis bzw. von Vaginalschleimhaut sowie anale Abstriche nach Instruktion selbstständig abzunehmen. Zur Gewinnung der Abstriche wurden steril verpackte Wattestäbchen verwandt, die nach Bedarf mit Aqua dest. befeuchtet wurden. Nach der Abnahme wurden die Watteträger getrocknet. Im Anschluss erfolgte entweder unverzüglich die Gewinnung der Zellen (siehe Abschnitt 3.2.1) oder wurden die Wattestäbchen bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.3.3 Mischproben (postkoital)

Drei Paare wurden gebeten insgesamt 70 Abstriche nach vaginalem bzw. oralem Geschlechtsverkehr mittels Watteträger anzufertigen. Unter den Proben befinden sich Penis-, Vaginal- und Wangenschleimhautabstriche sowie Abstriche der Leistenhaut der Fingerbeere. Die Proben sind in Tabelle 9 im Einzelnen aufgeführt.

2.3.4 Zyklusabstriche

Vier freiwillige weibliche Versuchspersonen wurden gebeten über den Zeitraum eines Menstruationszyklus Abstriche in konstanten Abständen anzufertigen. Diese sind in Tabelle 8 aufgeführt.

2.3.5 Urinproben

Es wurden 4 freiwillige Personen gebeten Mittelstrahlurin abzugeben. Dieser wurde unverzüglich weiterverarbeitet (siehe Abschnitt 3.2.1.3, Urinproben).

2.3.6 Spermaproben

Drei freiwillige männliche Probanden wurden gebeten Spermaproben abzugeben. Diese wurden mittels Wattestäbchen auf Objektträger überführt und getrocknet.

2.3.7 Biopsien

Von Leichen aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen sowie dem Institut für Gerichtsmedizin der Universität Tübingen wurden mittels Biopsien folgender Gewebe entnommen (in Klammern sind die entsprechenden Körperstellen angegeben):

1. Verhornendes Plattenepithel (Felderhaut)
2. Verhornendes Plattenepithel (Leistenhaut)
3. Nicht verhornendes Plattenepithel (Wangenschleimhaut)
4. Nicht verhornendes Plattenepithel (Vaginalschleimhaut)
5. Übergangsepithel (Blasendach)
6. Zylinderepithel (Enddarm)
7. Myokard (Herz)
8. Leber
9. Gehirn (Groß- und Kleinhirn)

3 Methodik

3.1 Histologie

3.1.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Nach dem Zuschneiden in für die Einbettkassetten geeignete Größe wurden die histologischen Proben in einem Einbettautomaten (Citadel 1000, Shandon GmbH, Frankfurt) aus der Formalinfixierung in ein Xylol-haltiges Medium überführt. Anschließend wurden sie in flüssiges Paraffin gegossen.

Die dergestalt eingebetteten Gewebeblöcke konnten nach Abkühlung auf einer einer Kühlplatte (Shandon) auf ca. -4° C mit dem Mikrotom (HM 330, MICROM International GmbH, Walldorf) in 3 µm dicke Schnitte zugeschnitten werden. Letztere wurden in ein erwärmtes Wasserbad (Paraffin Section Mounting Bath, Electrothermal Engineering Ltd., Dubuque, Iowa USA) überführt. Von dort wurden die Schnitte im Anschluss auf Objektträger (Histobond Adhäsive Objektträger, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen) aufgebracht und schließlich bei ca 70°C im Trockenschrank gelagert, um Wasser und einen Teil des Paraffins zu entfernen.

Die fertigen Gewebeschnitte konnten nunmehr der immunhistochemischen Färbung unterzogen werden.

3.1.2 Kontrolle der Gewebeschnitte

Ein Schnitt jedes Asservats wurde einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen und im Anschluss durch PD Dr. med. M. Wehrmann am Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Tübingen diagnostiziert. Es wurden diejenigen Proben verworfen, bei denen die vermutete Organzugehörigkeit nicht bestätigt werden konnte.

3.1.3 Färbeprotokolle

Im Folgenden ist zunächst das Standardprotokoll einer immunhistochemischen Färbung aufgeführt. Im Anschluss daran sind die Besonderheiten der einzelnen Antikörper aufgeführt.

3.1.3.1 Standardprotokoll einer immunhistochemischen Färbung

- **Entparaffinierung**

1. Xylol 30 min

- **Rehydrierung**

2. Absteigende Alkoholreihe: 100-, 96-, 70%iges Ethanol je 8 min

3. Aqua dest. 8 min

4. Markieren mit Dako-Pen

5. Aqua dest. 5 min

- **Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität**

6. H_2O_2 3 % in H_2O 15 min

7. TBS 5 min

8. TBST 5 min

- **Minimierung unspezifischer Hintergrundfärbung**

9. Ziegenserum (1:10 mit 3% BSA in PBS) 30 min bei Raumtemperatur

- **Primärantikörper/Negativkontrolle**

10. Schnitte abklopfen

Antikörper bzw. Negativkontrolle aufpipettieren

11. Spülen mit Aqua dest.

12. TBST-Puffer 2 x 5 min

- **Sekundärantikörper (HRP)**

13. Labelled polymer HRP: 30 min b. Raumtemp.

14. Spülen mit Aqua dest.

15. TBST 1 x 5 min

16. TBS 1 x 5 min

- **Chromogen**

17. DAB+

18. Spülen mit Aqua dest.

19. Aqua dest. 2 x 5 min

- **Gegenfärbung**

20. Hämatoxylin

21. Bläuen in fließendem Leitungswasser: 7 min

22. Eindeckeln mit Kaisers Glyceringelatine

Die Schritte 9, 10, 13 und 17 erfolgen jeweils in einer feuchten Kammer.

3.1.4 Spezifische Färbevorschriften der einzelnen Antikörper

Im Folgenden sind die für jeden verwendeten Antikörper spezifischen Besonderheiten der immunhistochemischen Färbung angegeben. Die einzelnen Antikörper werden dabei nach ihrem zugehörigen Antigen benannt (i.e. das entsprechende Cytokeratin). Ausnahme sind polyvalente Antikörper (siehe Abschnitt 3.1.4.11).

3.1.4.1 Cytokeratin 1

- Antigendemaskierung nach Schritt 3:
 - Mikrowelle 800 W, Demaskierungspuffer pH 6, 2 x 5 min, dazwischen Nachfüllen des Puffers; danach 15 min abkühlen und weiter mit Schritt 4
- Verdünnung der Antikörpers/der Negativkontrolle: 1:100 mit 1% BSA in PBS
- Inkubationsdauer Antikörper: 20 Stunden bei 5°C
- Inkubationsdauer Chromogen: 8 min bei RT
- Inkubationsdauer Hämatoxylin: 1 min bei RT

3.1.4.2 Cytokeratin 2e

- Antigendemaskierung nach Schritt 3:
 - Mikrowelle 800 W, Demaskierungspuffer pH 6, 2 x 5 min, dazwischen Nachfüllen des Puffers; danach 15 min abkühlen und weiter mit Schritt 4
- Verdünnung des Antikörpers/der Negativkontrolle: 1:50 mit 1% BSA in PBS
- Inkubationsdauer Antikörper: 2 Stunden bei 37°C
- Inkubationsdauer Chromogen: 15 min bei RT
- Inkubationsdauer Hämatoxylin: 30 s bei RT

3.1.4.3 Cytokeratin 4

- Antigendemaskierung nach Schritt 3:
 - Mikrowelle 800 W, Demaskierungspuffer pH 6, 2 x 5 min, dazwischen Nachfüllen des Puffers; danach 15 min abkühlen und weiter mit Schritt 4
- Verdünnung des Antikörpers/der Negativkontrolle: 1:100 mit 1% BSA in PBS
- Inkubationsdauer Antikörper: 1 Stunde bei 37°C
- Inkubationsdauer Chromogen: 10 min bei RT
- Inkubationsdauer Hämatoxylin: 30 s bei RT

3.1.4.4 Cytokeratin 7

- Antigendemaskierung nach Schritt 3:
 - Mikrowelle 800 W, Demaskierungspuffer pH 6, 2 x 5 min, dazwischen Nachfüllen des Puffers; danach 15 min abkühlen und weiter mit Schritt 4
- Verdünnung des Antikörpers/der Negativkontrolle: 1:50 mit 1% BSA in PBS
- Inkubationsdauer Antikörper: 1 Stunde bei RT
- Inkubationsdauer Chromogen: 15 min bei RT
- Inkubationsdauer Hämatoxylin: 30 s bei RT

3.1.4.5 Cytokeratin 8

- Antigendemaskierung nach Schritt 3:
 - Mikrowelle 800 W, Demaskierungspuffer pH 6, 2 x 5 min, dazwischen Nachfüllen des Puffers; danach 15 min abkühlen und weiter mit Schritt 4
- Verdünnung des Antikörpers/der Negativkontrolle: 1:100 mit 1% BSA in PBS
- Inkubationsdauer Antikörper: 1 Stunde bei 37°C
- Inkubationsdauer Chromogen: 10 min bei RT
- Inkubationsdauer Hämatoxylin: 1 min bei RT

3.1.4.6 Cytokeratin 13

- Keine Antigendemaskierung notwendig
- Antikörper gebrauchsfertig, keine Verdünnung notwendig
- Inkubationsdauer Antikörper: 1 Stunde bei 37°C
- Inkubationsdauer Chromogen: 10 min bei RT
- Inkubationsdauer Hämatoxylin: 1 min bei RT

3.1.4.7 Anti-Cytokeratin 15-Antikörper

- Antigendemaskierung nach Schritt 3:
 - Mikrowelle 800 W, Demaskierungspuffer pH 6, 2 x 5 min, dazwischen Nachfüllen des Puffers; danach 15 min abkühlen und weiter mit Schritt 4
- Verdünnung des Antikörpers/der Negativkontrolle: 1:60 mit 1% BSA in PBS
- Inkubationsdauer Antikörper: 30 min bei 37°C
- Inkubationsdauer Chromogen: 15 min bei RT
- Inkubationsdauer Hämatoxylin: 1 min bei RT

3.1.4.8 Cytokeratin 16

- Antigendemaskierung nach Schritt 3:
 - Dampfgarer, Demaskierungspuffer pH 8, 20 min, danach 15 min abkühlen und weiter mit Schritt 4
- Verdünnung des Antikörpers/der Negativkontrolle: 1:50 mit 1% BSA in PBS
- Inkubationsdauer Antikörper: 1 Stunde bei RT
- Inkubationsdauer Chromogen: 10 min bei RT
- Inkubationsdauer Hämatoxylin: 1 min bei RT

3.1.4.9 Cytokeratin 17

- Antigendemaskierung nach Schritt 3:
 - Dampfgerar, Demaskierungspuffer pH 8, 20 min, danach 15 min abkühlen und weiter mit Schritt 4
- Verdünnung des Antikörpers/der Negativkontrolle: 1:40 mit 1% BSA in PBS
- Inkubationsdauer Antikörper: 19 Stunden bei 2°C
- Inkubationsdauer Chromogen: 20 min bei RT
- Inkubationsdauer Hämatoxylin: 1 ½ min bei RT

3.1.4.10 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

- Entparaffinierung in Xylol: 30 min
- Absteigende Alkoholreihe: 100-, 96-, 70%iges Ethanol für je 6 min
- Aqua dest.: 6 min
- Hämalaun: 15 min
- Bläuen in fließendem Leitungswasser: 6 min
- Eosin: 5 min
- Aufsteigende Alkoholreihe: 70-, 96-, 100%iges Ethanol für je 6 min
- Xylol 5 min

3.1.4.11 Cytokeratine 5/6, 13-20, AE1/3, CAM 5.2, Ck 903 und Östrogenrezeptor

Es handelt sich um Routinefärbungen des pathologischen Instituts am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart. Die Schnitte wurden in einem Autostainer gefärbt.

3.1.5 Beurteilung der Färbeergebnisse

Die gefärbten Präparate wurden durch den Verfasser sowie Dr. sc. hum. Martin M. Schulz als betreuendem Mitarbeiter unter einem Lichtmikroskop der Firma Leica betrachtet.

Dies gilt auch für diejenigen Präparate, welche am Robert-Bosch-Krankenhaus gefärbt wurden.

Zeigte die Negativkontrolle eine positive Farbreaktion, so wurde das entsprechende Präparat erneut gefärbt.

Zur Beurteilung wurden jeweils 100 Zellen aus der Mitte des Objektträgers ausgezählt und nach folgendem Schema bewertet.

	Anfärbung
+++	<i>Sehr gut:</i> Intensive Anfärbung Über 75% der Zellen angefärbt
++	<i>Gut:</i> Deutlich erkennbare Anfärbung Über 50% der Zellen angefärbt
+	<i>Schwach:</i> Erkennbare Anfärbung Unter 50% der Zellen angefärbt
-	<i>Keine Anfärbung/Negativ:</i> Keine erkennbare Anfärbung

3.2 Cytologie

3.2.1 Fixation

3.2.1.1 Trocknung bei Raumtemperatur

Dazu wurden die getrockneten Watteträger mit Aqua dest. befeuchtet und die Zellen durch mehrmaliges Ausstreichen auf einen oder mehrere Objektträger aufgetragen. Letztere wurden im Anschluss bei Raumtemperatur für mindestens 18 Stunden unter dem Abzug gelagert.

3.2.1.2 Ethanol/Ether-Fixation

Hierbei wurde zunächst wie bei der zuletzt beschriebenen Trocknung bei Raumtemperatur verfahren. Nach dem Auftragen auf Objektträger und kurzer Trocknung (ca. 30 min bei RT) wurden die Objektträger jedoch in einem 1:1-Gemisch aus Diethylether und 100%igem Ethanol für 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss erfolgte auch hier eine trockene Lagerung bei RT für mindestens 18 Stunden.

3.2.1.3 CytoRich Red Collection Fluid

Abstrichmaterial

1. Die Watteträger wurden bei diesem Verfahren in trockenem Zustand zunächst für 5 Minuten in 1 ml CytoRich Red Collection Fluid, befindlich in einem 2ml-Reaktionsgefäß, getaucht.
2. Im Anschluss erfolgte die Überführung der auf dem Träger befindlichen Zellen in die Fixationslösung durch schnelles Rotieren der Watteträger in der Flüssigkeit per Hand.
3. Die Reaktionsgefäße wurden daraufhin für 2 x 5 Minuten im Gyrator (Invisorb, Invitek GmbH Berlin) bei 65 U/min gerüttelt.
4. Als nächste Schritte folgten 10 Minuten im Überkopfschüttler (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG) und Zentrifugation (Universal 32R, Andreas Hettich GmbH & Co KG) bei 600 g für ebenfalls 10 Minuten.
5. Daraufhin wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet mit 25 µl CytoRichRed Collection Fluid je zu entnehmender Probe resuspendiert (Beispiel: Sollten aus einem Eppendorfcup 5 Proben gewonnen werden, wurden 5 x 25 µl, also 125 µl CRR zugegeben).

6. Die erhaltene Suspension konnte nunmehr auf Objektträger aufgetragen oder zur späteren Verwendung bei -20°C eingefroren werden. Die mit der Zellsuspension benetzten Objektträger wurden zunächst für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Plattformschüttler und im Anschluss für mindestens 18 Stunden bei 37°C getrocknet.

Urinproben

Die Urinproben (Volumina zwischen 200 und 500 ml) wurden zunächst filtriert (Porengröße 11 µm). Der Filter wurde im Anschluss gefaltet und in ein Reaktionsgefäß (2 ml) gelegt. Mit ca. 1000 µl CytoRich Red Collection Fluid wurde der Filter dann im Reaktionsgefäß abgespült. Das Reaktionsgefäß wurde daraufhin für 2 x 5 min bei 65 U/min in den Gyrator gestellt. Danach wurde der Filter aus dem Cup entfernt. Mit der verbliebenen Zellsuspension wurde verfahren wie mit denjenigen aus Abstrichmaterial nach Schritt 3.

Spermaproben

Zu 500 µl CytoRich Red in einem 2 ml-Reaktionsgefäß wurden 500 µl Sperma gegeben. Ab hier wurde wie mit Abstrichmaterial verfahren (ab Schritt 3, s.o.)

3.2.1.4 CytoRich Red Collection Fluid + Formalin

Für einige der gefärbten Proben wurde die CRR-Lösung mit 4% Formalin versetzt. Die Fixation erfolgte identisch wie die unter 3.2.1.3 für CytoRich Red Collection Fluid ohne Zusatz von Formalin angegebene.

3.2.1.5 Inside Fix

Die Fixierung mit Inside Fix erfolgte ebenso wie für CytoRich Red beschrieben.

3.2.1.6 In Cup Färbung

Ein Teil der cytologischen Proben wurde nach der Fixation nicht auf Objektträger überführt, sondern im Reaktionsgefäß der Permeabilisierung unterzogen und immunocytochemisch gefärbt. Das gesamte Protokoll findet sich im Abschnitt 3.2.3 unter InCup-Färbung.

3.2.2 Permeabilisierung

3.2.2.1 Inside Perm

Inside Perm ist ein von Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, entwickeltes Zellpermeabilisationsmedium, welches ein nicht näher bezeichnetes Detergens enthält.

3.2.2.2 Tween 20

Polysorbat 20 (auch: Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat, Handelsname: Tween 20) ist ein nichtionisches Tensid mit sehr vielfältigem Einsatzgebiet. Es kann unter anderem zur Lyse tierischer Zellen eingesetzt werden.

Tween 20 wurde zum Zwecke der Membranpermeabilisierung zu der den Primärantikörper enthaltenden Lösung hinzugegeben in einer Konzentration von 0,1%.

3.2.2.3 Digitonin

Digitonin ist ein Glykosid aus dem Fingerhut (*Digitalis purpurea*). Es gehört zur Gruppe der Saponine. Es wird aufgrund seiner relativ milden membranpermeabilisierenden Wirkung häufig in der Immunocytochemie eingesetzt. Aufgrund seiner Toxizität ist jedoch große Vorsicht im Umgang geboten. Das angewandte Digitonin ist eine Mischung aus Digitonin und Digaloinin.

Aufbereitung des Digitoninsalzes

- Einwaage von 1 mg Digitonin unter Haut- und Atemschutz

Reinigung des Derivates

- Zugabe von 25 µl Ethanol und Erhitzen auf 75°C bis zur vollständigen Lösung
- Kühlung der Lösung im Eisbad für 20 min → Auskristallisierung des Digionins
- Zweimalige Zentrifugation bei 600 G und 0°C und Verwerfen des Überstandes
- Trocknung des Zentrifugats bei Raumtemperatur
- Einfrieren des Zentrifugats

Mit Digitonin permeabilisiertes Abstrichmaterial wurde grundsätzlich im Reaktionsgefäß (InCup) gefärbt. Zum Protokoll siehe 3.2.3

3.2.2.4 Trypsin

Trypsin ist eine Endopeptidase, welche als inaktive Vorstufe (Trypsinogen) im Pankreas produziert wird. Die Umwandlung in das funktionsfähige Trypsin erfolgt durch die in der Darmmukosa gebildete Enteropeptidase. Trypsin kann seinerseits weitere Trypsinogenmoleküle enzymatisch zu Trypsin aktivieren und auch andere pankreatischen Enzyme in ihre aktiven Formen umsetzen. Das pH-Optimum von Trypsin liegt zwischen 7 und 8.

Um die cytologischen Präparate zu permeabilisieren wurden sie für 5 min bei 37°C mit einer Lösung aus 0,2% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS inkubiert (siehe immuncytochemische Färbeprotokolle).

3.2.3 „InCup“-Färbung

3.2.3.1 Fixation

CRR

Die Fixierung der Abstriche für die Färbung im Reaktionsgefäß erfolgte mit CytoRich Red wie unter 3.2.1.3 beschrieben.

Ethanol-Ether-Fixation

Die Watteträger wurden zunächst für 5 Minuten in ein mit 1 ml PBS gefülltes Vial getaucht und die darauf befindlichen Zellen anschließend durch schnelles Drehen des Wattestäbchens in die Flüssigkeit abgegeben. Es folgte zweimaliges Schütteln im Gyrator für 5 Minuten bei 65 U/min und eine 10 minütige Rotation im Überkopfschüttler. Nach Zentrifugation bei 600 G wird der Überstand verworfen und 1 ml des Fixationsmediums auf das Pellet aufgetragen.

Nativ

Es erfolgte keine Fixation. Die Färbung schließt direkt an die Zentrifugation an.

3.2.3.2 Färbeprotokoll

Die Färbung im Reaktionsgefäß erfolgte analog zu derjenigen auf dem Objektträger (siehe 3.2.4), jedoch mit längeren Einwirkzeiten für die einzelnen Reaktionsschritte. Nach jedem Reaktionsschritt erfolgte eine Zentrifugation bei 600 G. Danach wurde der Überstand abpipettiert und die Färbung mit dem nächsten Schritt fortgesetzt.

3.2.4 Färbeprotokolle

Im Folgenden ist zunächst das Standardprotokoll einer immunhistochemischen Färbung aufgeführt. Im Anschluss daran sind die Besonderheiten der einzelnen Antikörper aufgeführt.

Standardprotokoll einer immunocytochemischen Färbung

- **Entfernung des Fixationsmediums (nicht bei nativen Präparaten)**
 1. Absteigende Alkoholreihe: 100-, 96-, 70%iges Ethanol für je 8 min
 2. Aqua dest.: 8 min

- **Antigendemaskierung HIER**
 3. Im vorgeheizten Dampfgerar, anschließend 10 min Abkühlung bei Raumtemperatur
 4. Markieren mit Dako-Pen
 5. Aqua dest. 5 min.

- **Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität**
 6. H_2O_2 0,3 % in H_2O für 5 min
 7. TBS-Puffer 5 min
 8. TBST-Puffer 5 min

- **Permeabilisierung der Zellmembran**
 9. Unterschiedliche Verfahren (siehe Abschnitt 3.2.2)
 10. Spülen mit Aqua dest.
 11. TBST 5 min

- **Minimierung unspezifischer Hintergrundfärbung**
 12. Ziegenserum (1:10 mit 3% BSA in PBS) 20 min bei Raumtemperatur

- **Primärantikörper/Negativkontrolle**

13. Schnitte abklopfen

Antikörper bzw. Negativkontrolle aufpipettieren

14. Spülen mit Aqua dest.

15. TBST 2 x 5 min

- **Sekundärantikörper (HRP)**

16. Labelled polymer HRP 30 min b. Raumtemp.

17. Spülen mit Aqua dest.

18. TBST 1 x 5 min

19. TBS 1 x 5 min

- **Chromogen**

20. DAB+

21. Spülen mit Aqua dest.

22. Aqua dest. 2 x 5 min

- **Gegenfärbung**

23. Hämatoxylin

24. Bläuen in fließendem Leitungswasser 7 min

25. Eindeckeln

Die Schritte 9, 12, 13, 16 und 20 erfolgen in einer feuchten Kammer.

Anti-Cytokeratin 4-Antikörper

- Antigendemaskierung (HIER) in EDTA-Puffer pH 8 im Dampfgarer für 20 min
- Verdünnung des Antikörpers: 1:500 mit 1% BSA in PBS
- Inkubationsdauer Antikörper: 1 Stunde bei 37°C
- Inkubationsdauer Chromogen: 5 min bei RT
- Inkubationsdauer Hämatoxylin: 1 min bei RT

Anti-Cytokeratin 8-Antikörper

- Antigendemaskierung (HIER) in EDTA-Puffer pH 6 im Dampfgarer für 20 min
- **Keine** Permeabilisierung
- Verdünnung des Antikörpers: 1:100 mit 1% BSA in PBS
- Inkubationsdauer Antikörper: 1 Stunde bei 37°C
- Inkubationsdauer Chromogen: 10 min bei RT
- Inkubationsdauer Hämatoxylin: 1 min bei RT

Anti-Cytokeratin 13-Antikörper

- **Keine** Antigendemaskierung nötig
- Verdünnung der gebrauchsfertigen Antikörper-Lösung 1:2 mit 1% BSA in PBS
- Inkubationsdauer Antikörper: 1 Stunde bei 37°C
- Inkubationsdauer Chromogen: 10 min bei RT
- Inkubationsdauer Hämatoxylin: 1 min bei RT

Christmas tree-Färbung (Kernechtrot-Pikroindigokarmin)

Reagenzien:

- Lösung A: Kernechtrot-Lösung (WALDECK GmbH & Co Division Chroma, Münster)
- Lösung B: PICS (Picroindigocarmin-Solution): Lösen von 1 g Indigocarmin in 300 ml gesättigter Pikrinsäure und anschließender Abfiltration. Die Lösung kann bei Raumtemperatur ca. 6 Monate gelagert werden.

Färbeprotokoll:

- Aufbringen einer dünnen Schicht Zellmaterials auf einen Objektträger.
- Trocknung über der Flamme
- Getrocknetes Material mit Lösung A bedecken: 15 min bei Raumtemperatur
- Spülen mit Aqua dest
- Auftragen von Lösung B: 20-30 sek
- Spülen mit Ethanol 96%
- Trocknung bei Raumtemperatur

Mit CytoRich Red fixiertes Material wurde vor dem Aufbringen von Lösung A einer absteigenden Alkoholreihe unterzogen (je 8 min 99,9%, 96%, 70% Ethanol und 2 x 8 min Aqua dest.).

3.2.5 Beurteilung der Färbeergebnisse

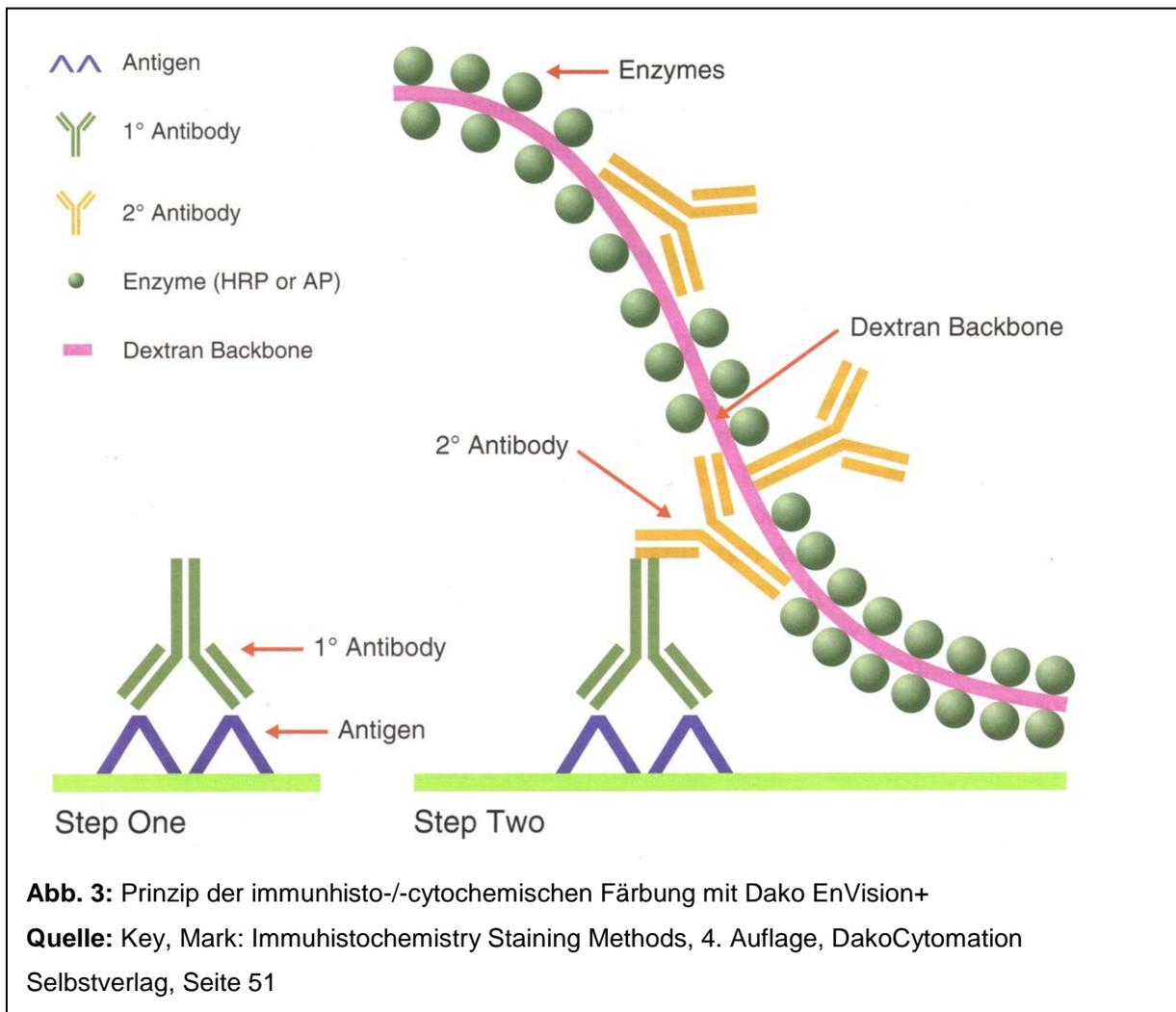
Als Maß für die Qualität der immunocytoologischen Färbung wurde zunächst der Anteil richtig-positiver Zellen in Prozent ermittelt, indem 100 Zellen aus der Mitte des Objektträgers unter dem Mikroskop ausgezählt wurden. Weiterhin wurde der Zellzustand analog folgender Tabelle bewertet.

Fiel die Negativkontrolle positiv aus, so wurde die gesamte Färbung wiederholt.

	Zellzustand
+++	<i>Sehr gut:</i> Keine wesentliche Lyse
++	<i>Gut:</i> Gering ausgeprägte Lyse
+	<i>Schlecht:</i> Deutliche Lyse
-	<i>Sehr Schlecht:</i> Zellen komplett lysiert/ vollständiger Zellverlust

3.3 EnVision+ System-HRP (DAB)

Sowohl für den immunhisto- wie auch den immuncytochemischen Teil wurde zur Antikörperdetektion das EnVision+ System von Dako angewandt. Wesentlicher Bestandteil des Systems ist labelled polymer-HRP, ein Dextranpolymer (siehe Abbildung 3). Dieses bindet eine Vielzahl einerseits von Enzymmolekülen, auf denen die Farbreaktion beruht, andererseits von sekundären Antikörpermolekülen, welche ihrerseits spezifisch an den eingesetzten Primärantikörper binden. Auf diese Weise ist eine intensive und dennoch hochspezifische immunologisch vermittelte Farbreaktion realisierbar.



3.4 Microdissektion

3.4.1 Vorbereitung der Objektträger

Die für die Microdissektion verwendeten Objektträger (PALM Membrane slides 1 mm) wurden zunächst für 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt, um die Adhäsion der Zellen zu verbessern. Anschließend wurde mit dem Dako Pen derjenige Bereich markiert, auf welchen die Zellsuspension aufgetragen werden sollte. Es folgte die Benetzung dieses Bereichs mit Poly-L-Lysin, ebenfalls um eine bessere Haftung der Zellen zu gewährleisten (laut Herstellerempfehlung). Anschließend erfolgte die Trocknung bei 37°C.

3.4.2 Auftragen der Zellsuspension

Cytologische Präparate, die einer Microdissektion zugeführt werden sollten, wurden wie unter 3.2.1.3 beschrieben mit CytoRichRed Collection Fluid fixiert und im Anschluss auf PALM-Objektträger (1 mm Membrane slides) aufgetragen. Die aufgetragene Zellsuspension wurde für mindestens 12 Stunden bei 37°C auf Blaugel getrocknet, bevor die immunocytochemische Färbung erfolgte.

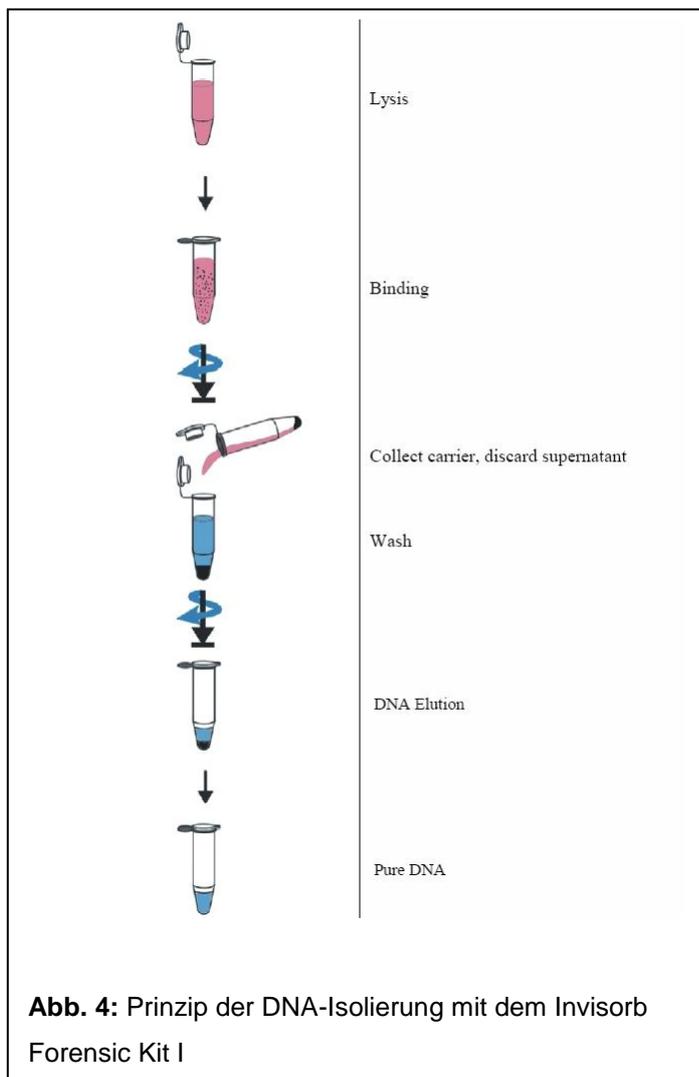
3.4.3 Laser-Mikrodissektion

Die Mikrodissektion fand am Mikrobiologischen Institut der Universitätsklinik Tübingen statt. Es stand ein Leica Axiovert 200 M als Mikroskop zur Verfügung.

3.4.4 DNA-Isolierung

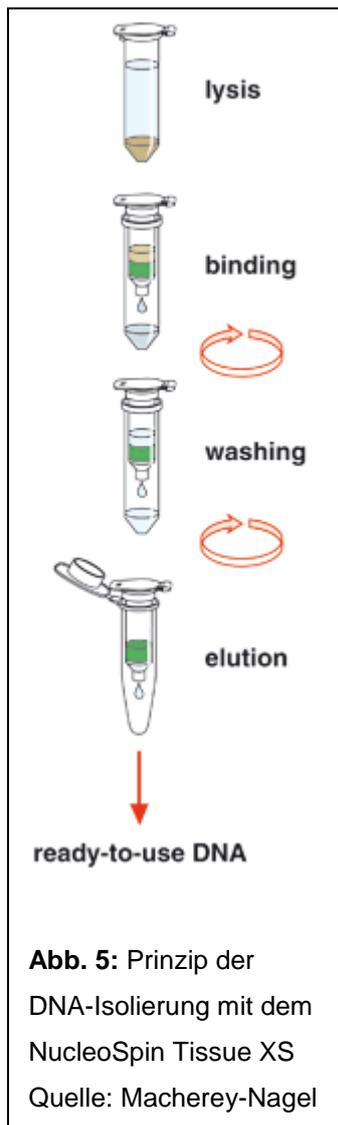
Invisorb Forensic Kit I

Eine etablierte Methode zur Isolierung von DNA besteht in der Bindung der Nukleinsäure an Glaspartikel oder – wie im Fall des Forensic Kit 1 – an eine Silikamatrix (hier Invisorb 50) in gesättigten Lösungen chaotroper Salze [28]. Schematisch lautet der Ablauf der DNA-Isolierung wie folgt (siehe Abb. 4): Nach Lyse des Ausgangsmaterials mithilfe eines speziellen Puffers (Lysis Buffer D), der neben der Zerstörung der Zellmembran die Inaktivierung endogener DNAsen leistet, erfolgt die Bindung der DNA an den Carrier. Im Anschluss an mehrere Schritte zur Aufreinigung wird die DNA wieder vom Carrier gelöst. Es wurde analog dem vom Hersteller angegebenen Protokoll für Abstrichmaterial verfahren.



NucleoSpin Tissue XS

Das DNA-Isolations-Kit NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Düren) bedient sich einer Silika-Membran zur Adhäsion der DNA. Es wurde speziell zur Isolation von DNA aus sehr kleinen Probenvolumina entwickelt. In Abbildung 5 ist der schematische Vorgang der DNA-Isolierung aufgezeigt.



Quiagen

Nach einem ähnlichen Prinzip (Bindung der DNA an eine Silika-Membran) funktioniert auch das QIAamp DNA Investigator Kit von Quiagen (siehe Abb. 6).

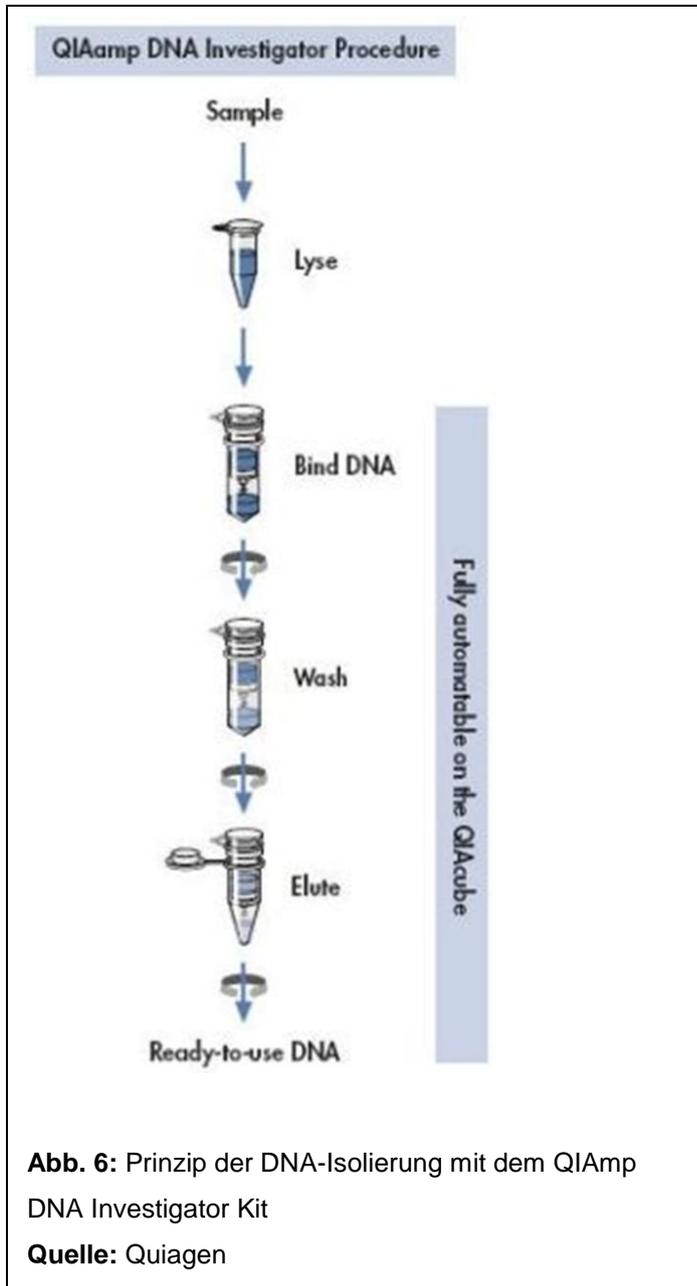


Abb. 6: Prinzip der DNA-Isolierung mit dem QIAamp DNA Investigator Kit

Quelle: Quiagen

3.4.5 DNA-Quantifizierung

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, kurz PCR) geht auf Mullis (1988) zurück und dient der spezifischen Amplifikation von DNA mittels hitzestabiler DNA-Polymerasen. Der DNA-Polymerase als Ansatzstelle dienen sogenannte Primer, Oligonukleotide die den beiden Anfangsbereichen (je einer pro DNA-Strang) des zu vervielfältigenden DNA-Bereichs komplementär sind. Von diesen Ansatzstellen an beginnt die DNA-Polymerase selbstständig mit der DNA-Amplifikation. Um eine ausreichend große Menge des Amplifikats zu erhalten muss dieser Prozess vielfach wiederholt werden. Durch den Einsatz hitzestabiler Polymerasen ist dies heutzutage unterbrechungsfrei in sogenannten Thermocyclern möglich.

3.4.6 RNA-Isolierung

Von Leichen aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen sowie dem Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Tübingen wurden Proben folgender Gewebe entnommen (in Klammern sind die entsprechenden Körperstellen angegeben):

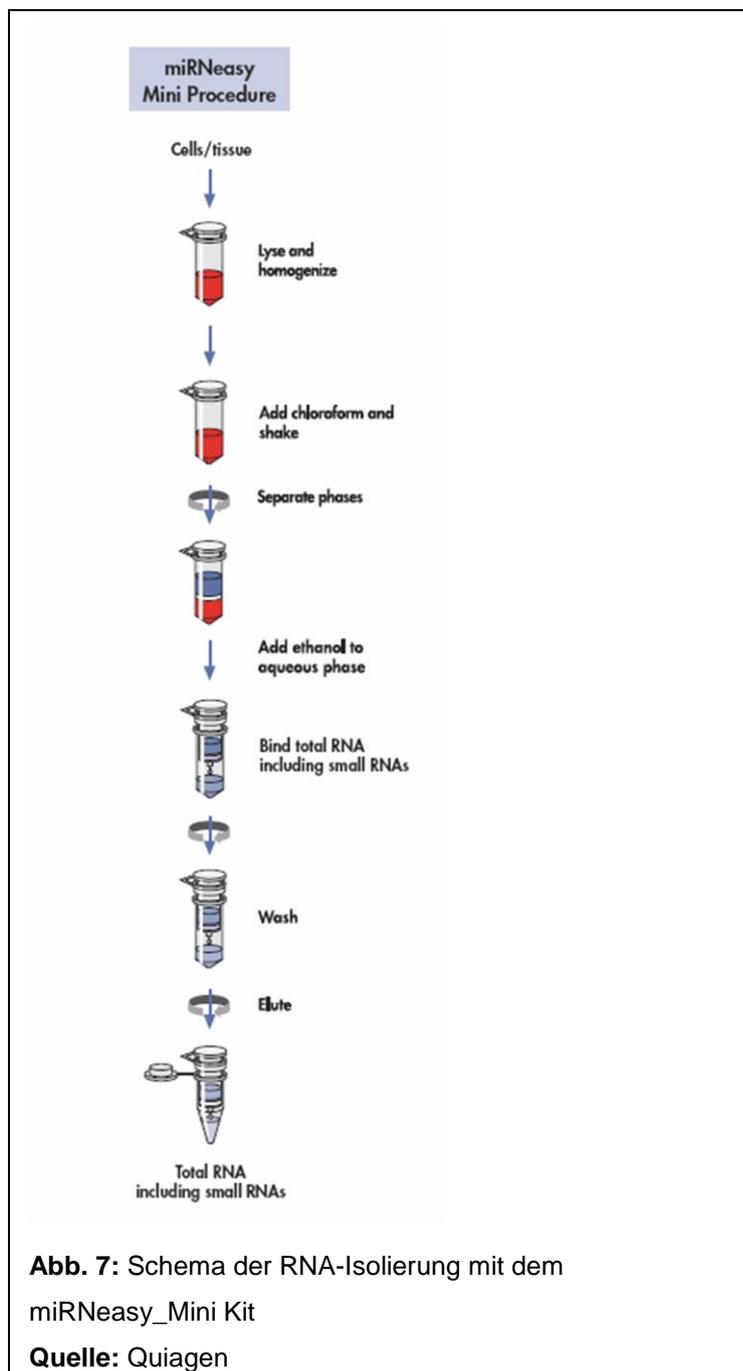
1. Verhornendes Plattenepithel (Leistenhaut, LH)
2. Nicht verhornendes Plattenepithel (Vaginalschleimhaut)
3. Übergangsepithel (Blasendach, BL)
4. Nicht verhornendes Plattenepithel (Analkanal, AA)
5. Verhornendes Plattenepithel (Felderhaut Thorax, FT)
6. Verhornendes Plattenepithel (Penis, PE)
7. Nicht verhornendes Plattenepithel (Wangenschleimhaut)
8. Gehirn (Groß- und Kleinhirnrinde, HI)
9. Leberparenchym (LB)
10. Myokard (Herz, HE)

Verarbeitung der Gewebeproben

Die entnommenen Proben wurden in mit DEPC sterilisierte Gefäße verbracht, welche verschlossen und zum Transport auf Trockeneis gelagert wurden. Direkt im Anschluss erfolgte die Lagerung der Proben bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung.

Zunächst wurden die Gewebestücke an einem desinfizierten und mit RNase-Ex (ratiolab GmbH, Dreieich) behandelten Arbeitsplatz mit Hilfe eines Skalpells unter dem Binokular in etwa 1 mm³ große Würfel geschnitten, wobei Proben, welche Epithel enthielten, unter Erhaltung desselben präpariert wurden. Es wurden von jeder Gewebeprobe drei solcher Würfel geschnitten, in ein verschließbares Reagenzglas verbracht und bei -20°C gelagert.

Am Institut für Humangenetik (Medizinische Genetik) der Universitätsklinik Tübingen erfolgte die weitere Verarbeitung der Gewebeproben gemäß miRNeasy_Mini Protokoll (siehe Abb. 7).



Quantitative mRNA-Bestimmung

Aus den Gewebeproben von wurden am Institut für Humangenetik (Medizinische Genetik) der Universitätsklinik Tübingen mittels real-time RT-PCR die Konzentrationen von Cytokeratin 4- und Cytokeratin 10-mRNA (KRT4 und KRT10) bestimmt. Der Farbstoff SYBR Green bindet an die im Amplifikationsprozess entstehende dsDNA unter Emission von Fluoreszenz. Als Maß für die quantitative mRNA-Expression dient der sogenannte Crossing point (CP), der demjenigen Amplifikationszyklus entspricht, in dem erstmals die Hintergrund-Fluoreszenz überschritten wird.

Verwendet wurden QuantiTect Reverse Transcription Kit sowie QuantiTect SYBR Green PCR von Quiagen zur cDNA-Synthese in einem Zwei-Schritt-Verfahren und ein 2100 Bioanalyzer mit RNA Pico LabChip von Agilent Technologies zur Elektrophorese.

3.4.7 Statistik

Die Ergebnisse der Arbeit wurden in tabellarischer Form an Herrn Prof. Dietz vom Institut für Biometrie der Universität Tübingen übersandt und gemeinsam mit ihm statistisch ausgewertet.

Die in Prozent angegebenen Färbeergebnisse wurden zunächst einer logit-Transformation unterzogen. Anschließend erfolgten Varianzanalyse (ANOVA) und Vergleich der Mittelwerte anhand Tukey-Kramer. Die Mittelwerte wurden abschließend einschließlich der jeweiligen 95%-Konfidenzintervalle grafisch aufgetragen. Als Statistiksoftware standen JMP 7 (SAS, Cary, NC, USA) für MAC am Institut für Biometrie der Universität Tübingen sowie JMP 7 für Windows zur Verfügung.

4 Ergebnisse

4.1 Histologie

Im Folgenden sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Anfärbung der einzelnen Cytokeratine an Gewebeschnitten aufgeführt. Zur Auswertung der Färbeergebnisse siehe Kapitel 3.1.4. Es wurde zu jedem Schnitt eine Negativkontrolle des gleichen Präparates mitgeführt. Die Ergebnisse dieser Negativkontrolle sind nur dann angegeben, wenn sie falsch-positiv ausfielen.

Eine tabellarische Darstellung der Ergebnisse findet sich in den Tabellen 1 (aufgelistet nach Gewebe und Antikörper) und 2 (Anfärbeergebnis der einzelnen histologischen Präparate) in Anhang I.

4.1.1 Cytokeratin 1

Epidermis zeigte in drei Fällen keinerlei Farbreaktion, wohingegen in drei Präparaten eine gute, in zweien sogar eine sehr gute Anfärbung erzielt wurde. Sechs der acht gefärbten Wangenschleimhautpräparate zeigten eine schwach positive, zwei Schnitte jedoch keine immunhistochemische Reaktion. Ein urotheliales Schnittpräparat (1/53) zeigte eine positive Reaktion, die übrigen nicht. Vaginalschleimhaut war in sieben von neun Fällen schwach bis deutlich positiv, in zweien jedoch negativ. Eines der Penispräparate (1/83) war negativ, eines schwach positiv, die verbleibenden sieben waren gut bis sehr gut angefärbt. Keines der Darmpräparate zeigte eine immunhistochemische Reaktion.

4.1.2 Cytokeratin 2e

Daraus wird ersichtlich, dass anhand des Antikörpers gegen Cytokeratin 2e sämtliche getesteten Schnitte der Epidermis (Präparate 1/3-9, 1/12, 1/14, 1/15) eine gute bis sehr gute Anfärbung zeigten. Wangenschleimhaut scheint dagegen nur vereinzelt eine positive Farbreaktion zu zeigen (Präparate 1/30-32 sowie 1/23 basal). Urothel zeigte in keinem der Präparate eine Anfärbung. Das getestete Vaginalepithel wies zwei Mal (1/68 und 1/71) eine schwache und zwei Mal (1/64 und 1/65) eine gute Anfärbung auf, die übrigen drei Schnitte waren negativ. Vier Präparate des Penischaftes waren gut anfärbbar, eines sogar sehr gut, zwei Präparate zeigten jedoch keine positive Farbreaktion. Negativ fielen sämtliche Enddarmpräparate aus.

4.1.3 Cytokeratin 4

Die zehn epidermalen Schnitte fielen allesamt negativ aus, in einem Fall (1/5) löste sich während der Färbung das Epithel ab. Es wurden sieben Schnitte mit Wangenschleimhaut gefärbt, die in zwei Fällen gut, in fünf Fällen sehr gut anzufärben waren. Keine Anfärbung zeigten die Schnitte der Blase sowie der Harnröhre. Neun der vaginalen Schnitte lieferten ein positives Färbeergebnis (einmal schwach, fünfmal gut, dreimal sehr gut; siehe Tabelle 1a, Anhang I), einer war negativ (1/69). Die neun Penis- und zehn Enddarmschnitte waren wiederum alle negativ.

4.1.4 Cytokeratin 5/6

Sämtliche Präparate von Epidermis, Wangenschleimhaut, Vagina und Penis waren (größtenteils schwach) positiv, alle Darmpräparate negativ. Vier Schnitte mit Urothel waren negativ, die übrigen neun (wiederum zum größten Teil schwach) positiv.

4.1.5 Cytokeratin 7

Alle neun gefärbten Schnitte epidermaler Gewebeproben fielen in der Färbung negativ aus. Ein Präparat der Wangenschleimhaut (1/32) zeigte eine schwach positive Reaktion, die übrigen sieben Schnitte waren jedoch negativ. Die Schnitte von Blase und Harnröhre waren allesamt gut bis sehr gut anzufärben. Diejenigen des Enddarms waren dagegen bis auf einen (1/103, schwach positiv) gänzlich negativ. Auch einer der Vaginalschnitte (1/66) war schwach positiv gefärbt, wohingegen sämtliche weitere negativ waren. Alle neun Penisschnitte zeigten keinerlei Farbreaktion.

4.1.6 Cytokeratin 8

Wie aus Tabelle 1b (Ck 8) ersichtlich, waren sämtliche Schnitte der Epidermis negativ. Auch Wangenschleimhaut zeigte keine positive Farbreaktion. Die Urothelpräparate konnten dagegen bis auf eines (1/122) durchweg angefärbt werden. Alle Vaginalschnitte fielen negativ aus. Die Präparate des Darms zeigten allesamt eine positive Farbreaktion.

4.1.7 Cytokeratin 13

Die immunhistochemische Anfärbung von Cytokeratin 13 erbrachte für epidermale Schnitte ausschließlich negative Ergebnisse. Die Präparate der Wangenschleimhaut waren bis auf eines (1/32) allesamt sehr gut angefärbt. Urotheliale Schnitte waren stets positiv, allerdings in unterschiedlicher Intensität. Eine sehr gute Nachweisbarkeit von CK 13 ergab sich für Vaginalschleimhaut. Schnitte von Penis und Darm zeigten dagegen keine immunhistochemische Reaktion.

4.1.8 Cytokeratin 14

Anmerkung: Es wurden die für die Fragestellung relevanten superfiziellen Zellschichten zur Bewertung herangezogen.

Keiner der Hautschnitte zeigte eine positive Reaktion. Gleiches gilt mit zwei Ausnahmen (1/31 und 1/32) für Schnitte von Wangenschleimhaut sowie für sämtliche Urothelschnitte. Eine schwache Anfärbung wiesen sechs Präparate mit Vaginalschleimhaut auf, zwei (1/67 und 1/71) waren jedoch negativ. Drei Penisschnitte waren sehr stark anfärbbar, die übrigen sechs fielen dagegen negativ aus. Ebenso negativ waren alle Darmpräparate.

4.1.9 Cytokeratin 15

Die immunhistochemische Anfärbung an Stichproben aller zur Verfügung stehenden Gewebearten fiel negativ aus.

4.1.10 Cytokeratin 16

Cytokeratin 16 war in keinem der getesteten Epithelien, mit Ausnahme eines Penispräparates, immunhistochemisch nachweisbar war.

4.1.11 Cytokeratin 17

Keines der getesteten Präparate zeigte eine positive immunhistochemische Reaktion.

4.1.12 Cytokeratin 18

In Haut-, Wangenschleimhaut-, Vaginal- und Penisschnitten war Cytokeratin 18 nicht nachweisbar. Urothel war in acht Fällen positiv, in vier Fällen jedoch negativ. Alle acht Darmpräparate konnten gut bis sehr gut angefärbt werden.

4.1.13 Cytokeratin 19

Haut und Wangenschleimhaut, Vagina und Penis waren stets negativ. Urotheliale Präparate waren allesamt schwach bis deutlich positiv. Auch Darmschnitte waren mit zwei Ausnahmen (1/104 und 1/107, die beide negativ ausfielen) schwach angefärbt.

4.1.14 Cytokeratin 20

Die immunhistochemische Anfärbung von Cytokeratin 20 führte zu einer positiven Farbreaktion in einem von elf urothelialen sowie fünf von acht Darmpräparaten. Sämtliche weiteren Schnitte fielen negativ aus.

4.1.15 Cytokeratin 903

Bis auf einen epidermalen (1/3) sowie alle Darmschnitte konnten sämtliche histologischen Präparate positiv auf Cytokeratin 903 getestet werden.

4.1.16 Pancytokeratin AE1_3

Alle getesteten Schnitte waren positiv für Pancytokeratin AE1_3.

4.1.17 Pancytokeratin CAM 5_2

Das Pancytokeratin konnte mit einer Ausnahme (1/122) in allen urothelialen und sämtlichen Enddarmpräparaten nachgewiesen werden. Die übrigen Schnitte zeigten keine Farbreaktion.

4.1.18 Östrogenrezeptor

Keines der immunhistochemisch gefärbten Präparate zeigte eine positive Anfärbung.

4.2 Cytologie

Diejenigen Cytokeratine, welche sich in den histologischen Untersuchungen als erfolgversprechend für eine spezifische Färbung von Schleimhautepithelien erwiesen (siehe dazu Abschnitt 5.2.1), wurden in einer weiteren Versuchsreihe an cytologischen Präparaten getestet. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

4.2.1 Vorversuche Cytokeratin 4

Tabelle 3 liefert eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse des Versuchsteils zur Fixation und Zellpermeabilisierung für die immunocytochemische Anfärbung von Cytokeratin 4.

Mindestens 80% Anfärbung wurden erzielt mit den folgenden Kombinationen aus Fixation und Permeabilisation:

- CytoRich Red/Trypsin
- CytoRich Red plus Formalin/Trypsin
- InsideFix/Trypsin
- CRR/Digitonin und
- InsideFix/Tween 20

Der Zellzustand war nach Permeabilisierung mit Trypsin in den meisten Fällen schlechter als nach Behandlung mit Digitonin oder Tween 20. Der Zusatz von Formalin zu CytoRich Red führte nicht zu einem besseren Zellzustand.

Wangenschleimhaut konnte zu mindestens 80% nach Behandlung der Abstriche mit folgenden Paaren aus Fixation und Permeabilisation angefärbt werden:

- CytoRich Red/Trypsin
- CytoRich Red/Digitonin
- CytoRich Red mit Zugabe von Formalin/Trypsin
- CytoRich Red mit Zugabe von Formalin/Digitonin

Wiederum war der Zellzustand nach Digitoninbehandlung besser als nach Einsatz von Trypsin. Die Permeabilisierung mit Tween 20 führte zu maximal 20% an positiven Zellen.

Zu einigen positiven Reaktionen bei epidermalen Abstrichen kam es nach zwei Färbungen, bei denen Digitonin zur Permeabilisierung eingesetzt wurde. Alle anderen Methoden lieferten ausschließlich negative Ergebnisse.

Bei allen eingesetzten Fixations- und Permeabilisationsverfahren traten max. 20 % positive Zellen auf Analabstrichen auf.

4.2.2 Vorversuche Cytokeratin 13

Die Ergebnisse der immuncytochemischen Anfärbung von Cytokeratin 13 sind in Tabelle 4 dargestellt.

Es wurde mit Tween 20 als Permeabilisation nur eine schwache Anfärbung sowohl von Vaginal- als auch Wangenschleimhaut erzielt. Wurde zur Permeabilisierung Trypsin eingesetzt, lag der Anteil positiver Zellen für Wangenschleimhaut zwischen 10% nach 30-minütiger Inkubationszeit des Antikörpers und 100% nach zweistündiger Inkubation, für Vaginalschleimhaut zwischen 60% nach 30 Minuten und 100% ab einer Stunde Inkubationszeit.

Während bei Proben mit 30-minütiger Inkubationszeit keinerlei falsch-positive Befunde zu beobachten waren, traten diese ab einer Inkubationszeit von 50 Minuten auf. Betroffen waren sowohl Penis- als auch Leistenhautabstriche. Zudem wurden die getesteten Analabstriche positiv gewertet.

Zwei Negativkontrollen waren auch nach wiederholter immunhistochemischer Färbung positiv.

4.2.3 Vorversuche Christmas tree stain / Spermien

Es wurden Stichproben von Vaginal- und Wangenschleimhautabstrichen mit Kernechtrot-Picroindigocarmin gefärbt. Umgekehrt wurden Spermaproben einer immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern gegen Cytokeratin 4 und 8 unterzogen. Es zeigten sich keine falsch-positiven oder falsch-negativen Resultate.

4.2.4 Vergleich der Fixationsmethoden

4.2.4.1 Anti-Cytokeratin 4-Antikörper, Permeabilisierung Tween 20

In Tabelle 5 (Anhang I) sind die Ergebnisse des Immunocytochemischen Nachweises von Cytokeratin 4 an mit Tween 20 (0,1 %ig) permeabilisiertem Abstrichmaterial dargestellt. Dabei wurden die Fixationsmethoden CytoRichRed Collection fluid („CRR“), Ethanol/Ether („EtOH“) sowie Lufttrocknung („Luft“) hinsichtlich ihres Einflusses auf das Färbeverhalten verglichen.

Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der positiv gefärbten Zellen.

AA = Analabstrich

EP = Epidermis

PA = Penisabstrich

VA = Vaginalabstrich

WS = Wangenschleimhaut

Fixierung mit CytoRich Red

Die Abstriche der Leistenhaut (EP) waren allesamt negativ. Zellen der Wangenschleimhaut (WS) zeigten zu 10% eine positive Farbreaktion. Die Vaginalabstriche (VA) fielen zu 64% positiv aus. Penisabstriche (PE) dagegen waren stets negativ. 9% der Zellen aus analen Abstrichen färbten sich an.

Der Zellzustand war in nahezu allen Proben gut bis sehr gut, lediglich die zweier Analabstriche waren nach der Färbung vollständig lysiert.

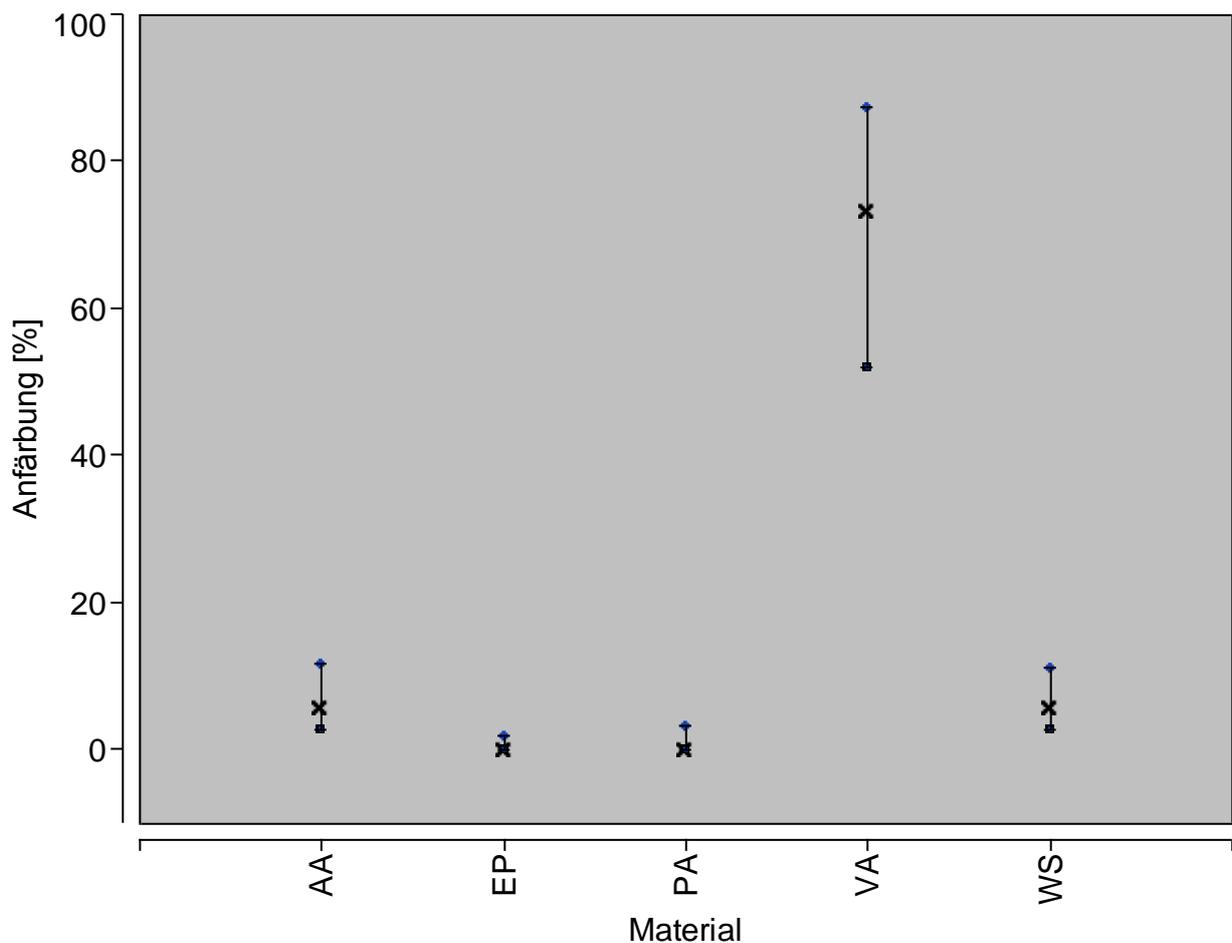


Abb. 8a: Permeabilisierung mit Tween 20, Fixierung mit CytoRich Red

Fixierung per Lufttrocknung:

Auch hier waren sämtliche Leistenhaut-Abstriche negativ. Die Abstriche der Wangenschleimhaut enthielten zu 58% positive Zellen. 79% der Vaginalzellen waren anfärbbar. Die Penisabstriche waren wiederum negativ. Zu 41% waren die aus Analabstrichen gewonnenen Zellen positiv.

Die Zellen waren zum allergrößten Teil in gutem bis sehr gutem Zustand. Ein Vaginal-, ein Leistenhaut- und ein Analabstrich wiesen einen schlechten Zellzustand auf.

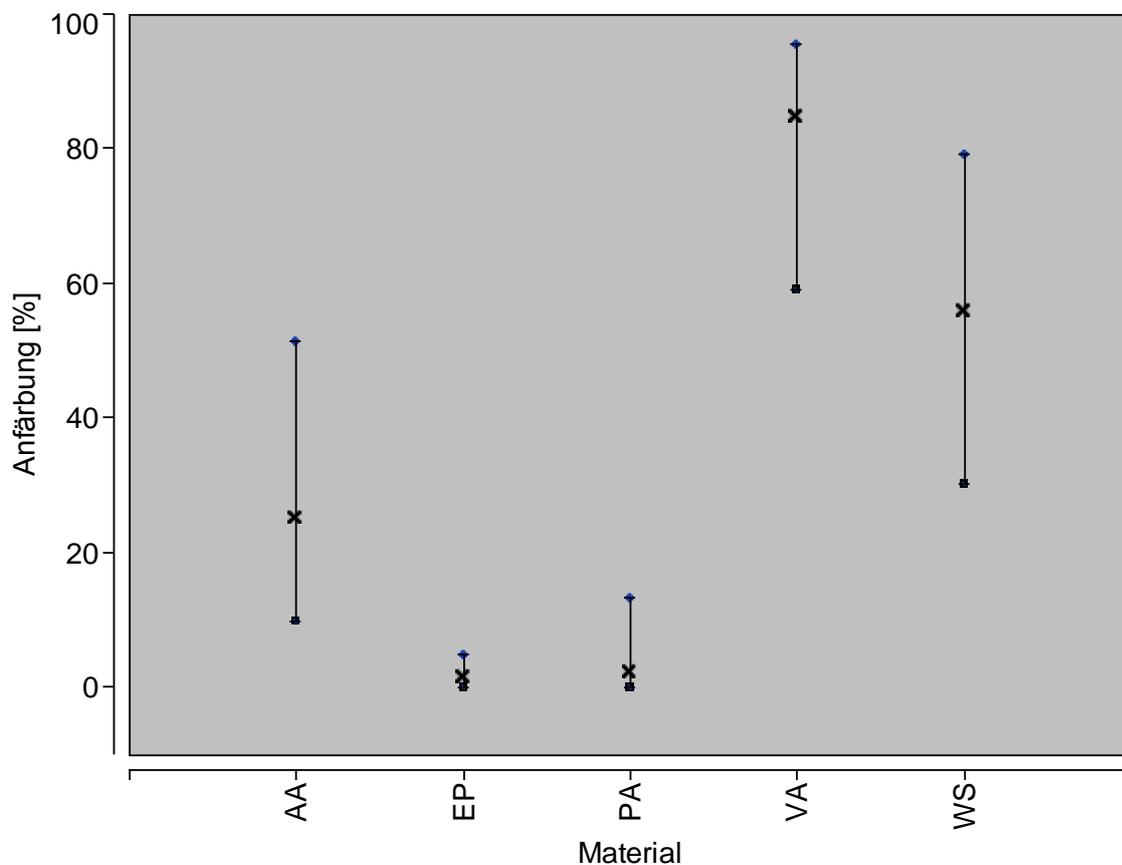


Abb. 8b: Permeabilisierung mit Tween 20, Fixierung mittels Lufttrocknung

Ethanol-Ether-Fixation:

Erneut fiel die Leistenhaut in allen Proben negativ aus. 31% positive Zellen ergab die Anfärbung von Wangenschleimhaut. Vaginale Zellen fielen zu 61% positiv aus. Wie bei den beiden anderen Fixationsmethoden waren alle Penisabstriche negativ. Die getesteten Analabstriche enthielten nach Anfärbung 28% positive Zellen.

Der Zustand der Zellen war bei allen Abstrichen gut oder sehr gut.

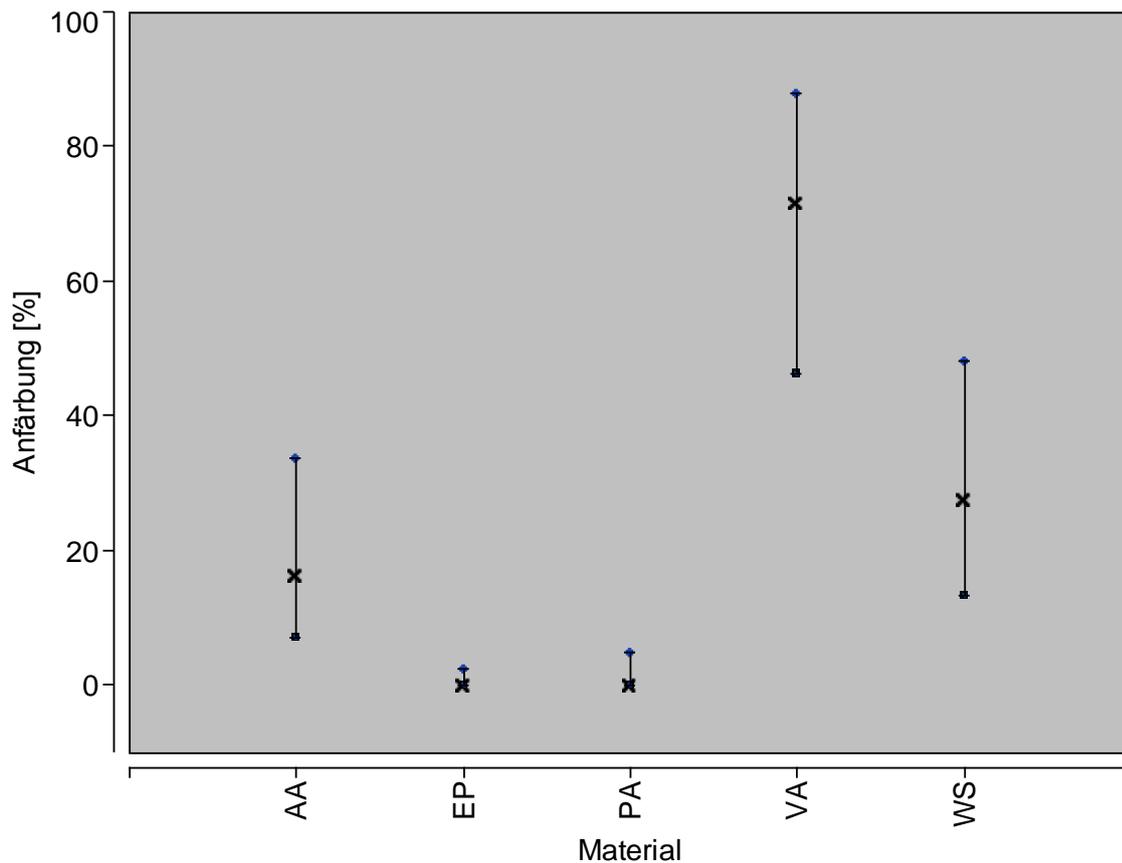


Abb. 8c: Permeabilisierung mit Tween 20, Fixierung mit Ethanol-Ether

4.2.4.2 Anti-Cytokeratin 4-Antikörper, Permeabilisierung mit Trypsin

Siehe dazu Tabelle 6. Sämtliche Abstriche wurden mittels Trypsin permeabilisiert und nach dem unter 3.2.4 angegebenen Protokoll gefärbt. Wiederum wurden die drei Fixationen CytoRichRed (CRR), Lufttrocknung (Luft) und Ethanol-Ether (EtOH) verglichen. Prozentangaben stehen für den Anteil positiv gefärbter Zellen.

AA = Analabstrich

EP = Epidermis

PA = Penisabstrich

VA = Vaginalabstrich

WS = Wangenschleimhaut

Fixierung mit CytoRichRed:

Die Zellen der zehn Abstriche mit Leistenhaut waren allesamt negativ. Wangenschleimhautzellen waren zu 85% anzufärben, Vaginalzellen zu 89%. Keiner der Penisabstriche wies positive Zellen auf. Dagegen waren insgesamt 33% der Zellen aus Analabstrichen positiv.

Der Zellzustand nach immunocytochemischer Färbung war in der Regel gut oder sehr gut. Vier der Analabstriche (Personen 1, 9, 11 und 15), ein Abstrich der Leistenhaut (Person 1), ein Penisabstrich (ebenfalls Person 1) sowie ein Vaginalabstrich (Person 8) waren in schlechtem Zustand.

Die Negativkontrollen waren bis auf zwei Ausnahmen nicht angefärbt: Die Analabstriche der Personen 6 und 15 wiesen eine schwache Färbung auf.

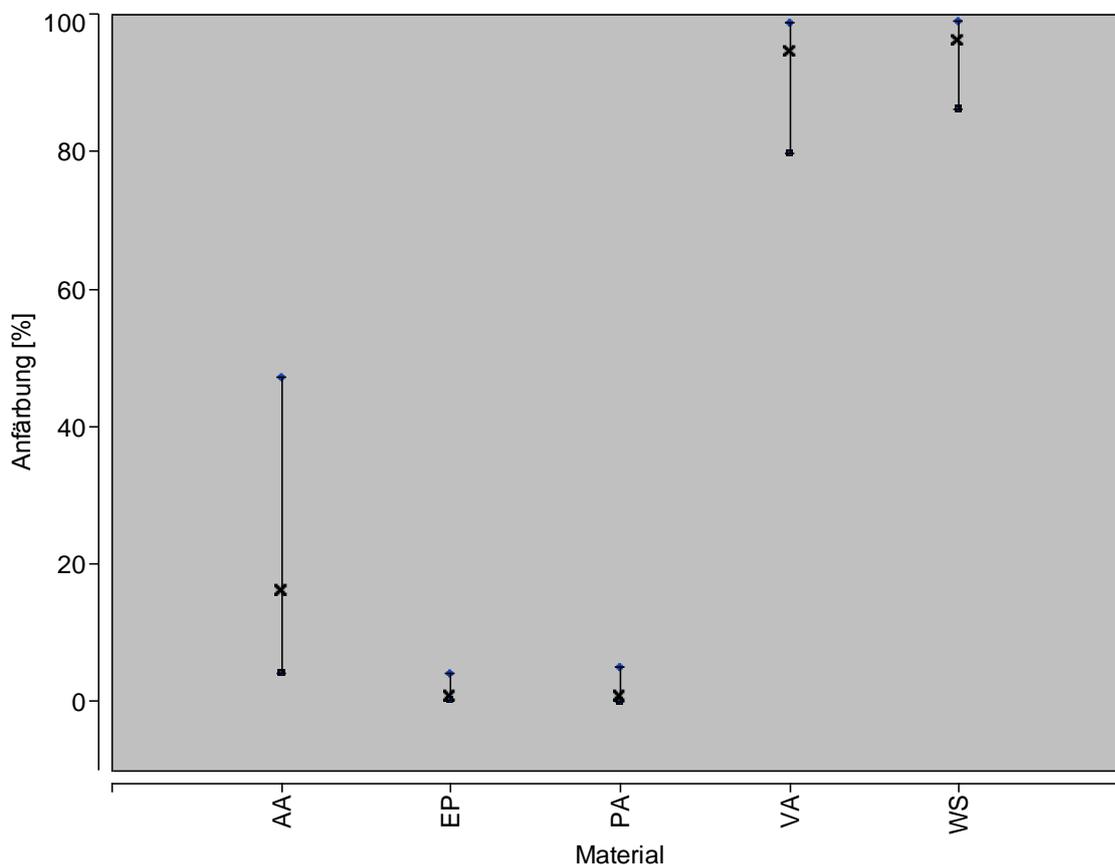


Abb. 9a: Permeabilisierung mit Trypsin, Fixierung mit CytoRich Red

Fixierung per Lufttrocknung:

Die luftgetrockneten Leistenhautabstriche enthielten ausschließlich negative Zellen. 83% der Zellen auf Abstrichen der Wangenschleimhaut waren ebenso positiv wie 93% der Vaginalzellen. Eine positive Anfärbung war bei 1% der Penisabstriche gegeben sowie bei 41% der Analabstriche.

Die Zellen waren größtenteils in gutem bis sehr gutem Zustand. Allerdings wiesen zehn Präparate einen schlechten Zellzustand auf, darunter vier Anal-, ein Penis-, ein Wangenschleimhaut-, ein Leistenhaut- und drei Vaginalabstriche.

Die Negativkontrollen der Wangenschleimhaut von Person 2 und 11 sowie der Analabstriche von Person 11 und 15 waren schwach positiv.

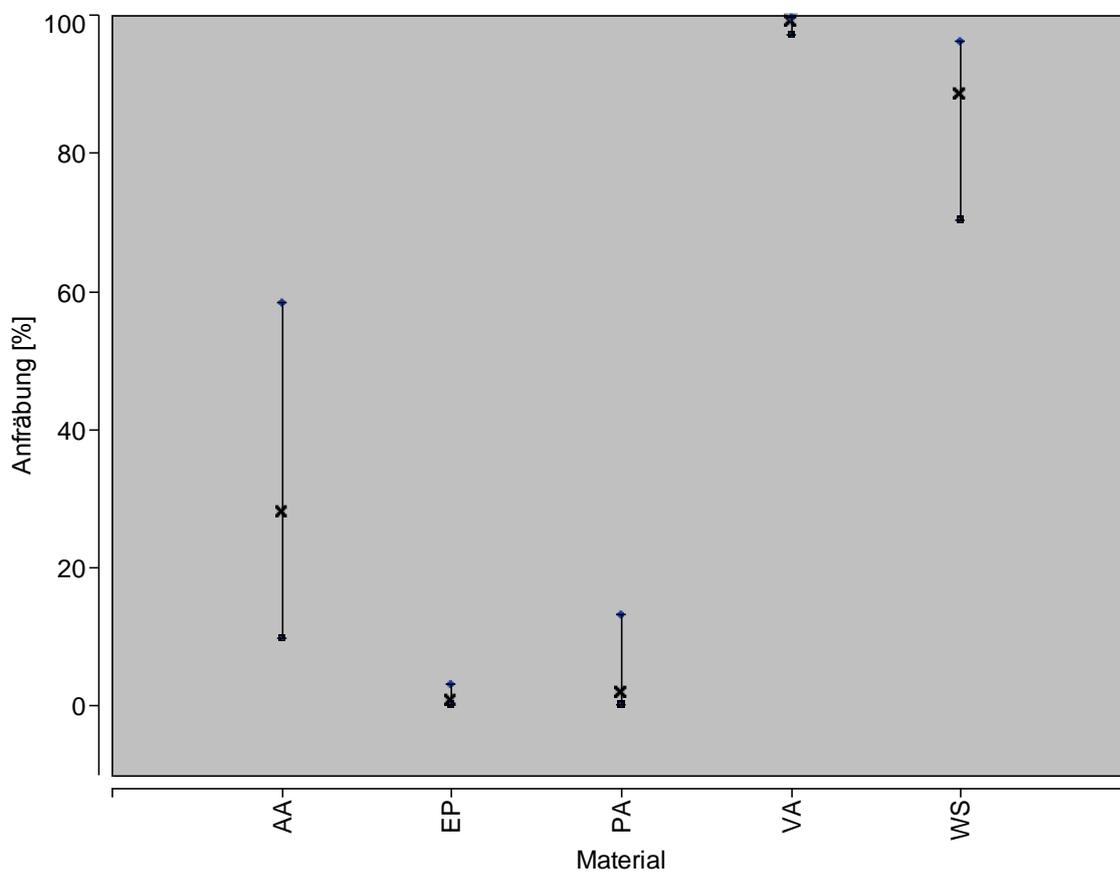


Abb. 9b: Permeabilisierung mit Trypsin, Fixierung mittels Lufttrocknung

Ethanol-Ether-Fixierung:

Wiederum ergab die Färbung keinen immuncytochemischen Nachweis von Cytokeratin 4 in Leistenhaut. Dieser war dagegen in 84% der Zellen aus Wangenschleimhaut möglich. Auch 93% der vaginalen Zellen waren positiv. Zellen aus Penisabstrichen fielen zu 4% positiv aus. Analabstriche enthielten 48% anfärbbare Zellen.

Es lag bis auf Ausnahmen ein guter bis sehr guter Zellzustand vor. Es waren jedoch zwei Analabstriche (Personen 3 und 9) und drei Vaginalabstriche (Personen 4, 9, 14) in schlechtem Zustand.

Zwei Negativkontrollen der Wangenschleimhaut (Personen 2 und 14) waren schwach, eine (Person 15) deutlich positiv. Außerdem waren zwei Analabstriche (Personen 11 und 15) leicht positiv. Die übrigen Negativkontrollen blieben ohne Anfärbung.

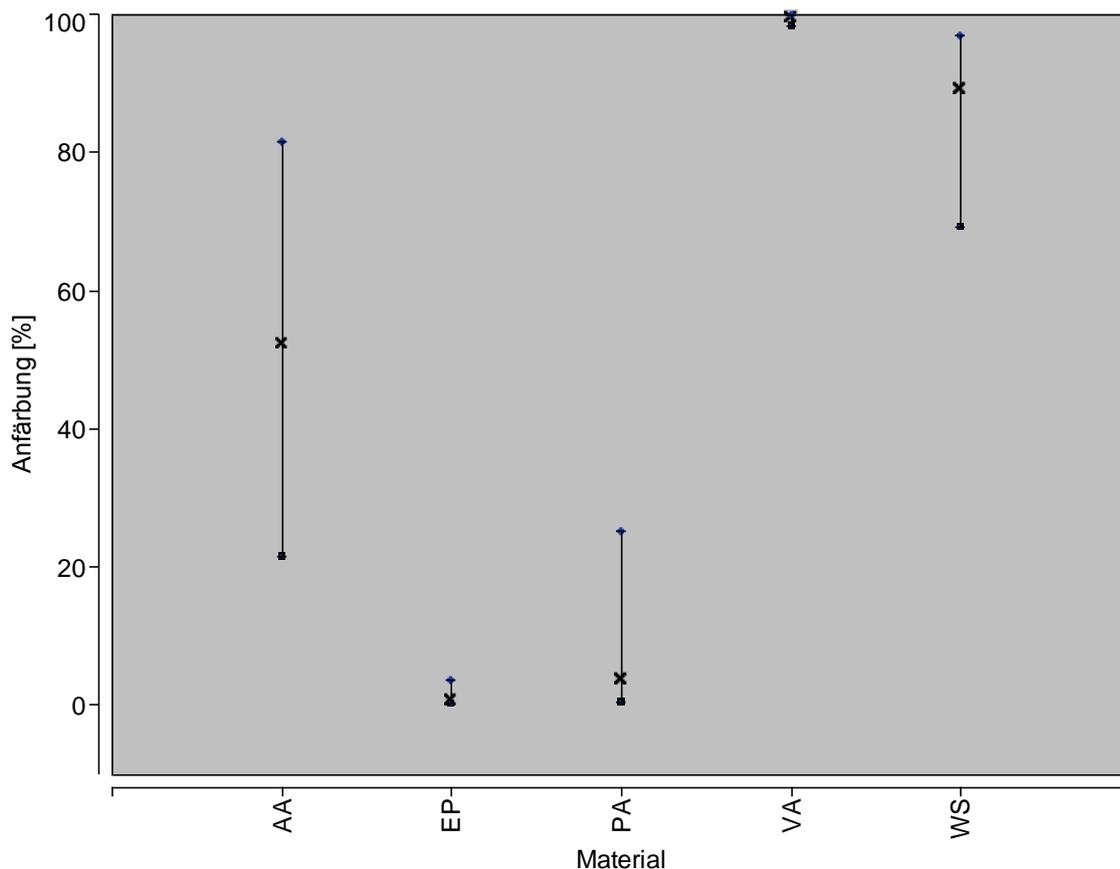


Abb. 9c: Permeabilisierung mit Trypsin, Fixierung mit Ethanol-Ether

4.2.4.3 Anti-Cytokeratin 4-Antikörper, Permeabilisierung mit Digitonin

Siehe Tabelle 7. Sämtliche Abstriche wurden mit Digitonin permeabilisiert und nach dem unter 3.2.4 angegebenen Protokoll gefärbt. Erneut wurden dabei die drei Fixationen CytoRichRed (CRR), Lufttrocknung (Luft) und Ethanol-Ether (EtOH) verglichen. Prozentangaben stehen für den Anteil positiv gefärbter Zellen.

AA = Analabstrich

EP = Epidermis

PA = Penisabstrich

VA = Vaginalabstrich

WS = Wangenschleimhaut

Fixierung mit CytoRich Red

89% der Vaginalzellen und 43% der Wangenschleimhautzellen ließen sich positiv anfärben. Kein immuncytochemischer Nachweis von Cytokeratin 4 gelang an Abstrichmaterial von Leistenhaut. Dagegen waren 3% positive Zellen auf Penisabstrichen nachzuweisen. Die getesteten Analabstriche enthielten 21% an positiven Zellen.

Der Zellzustand stellte sich bis auf zwei Ausnahmen (mit gutem Zellzustand) als sehr gut dar.

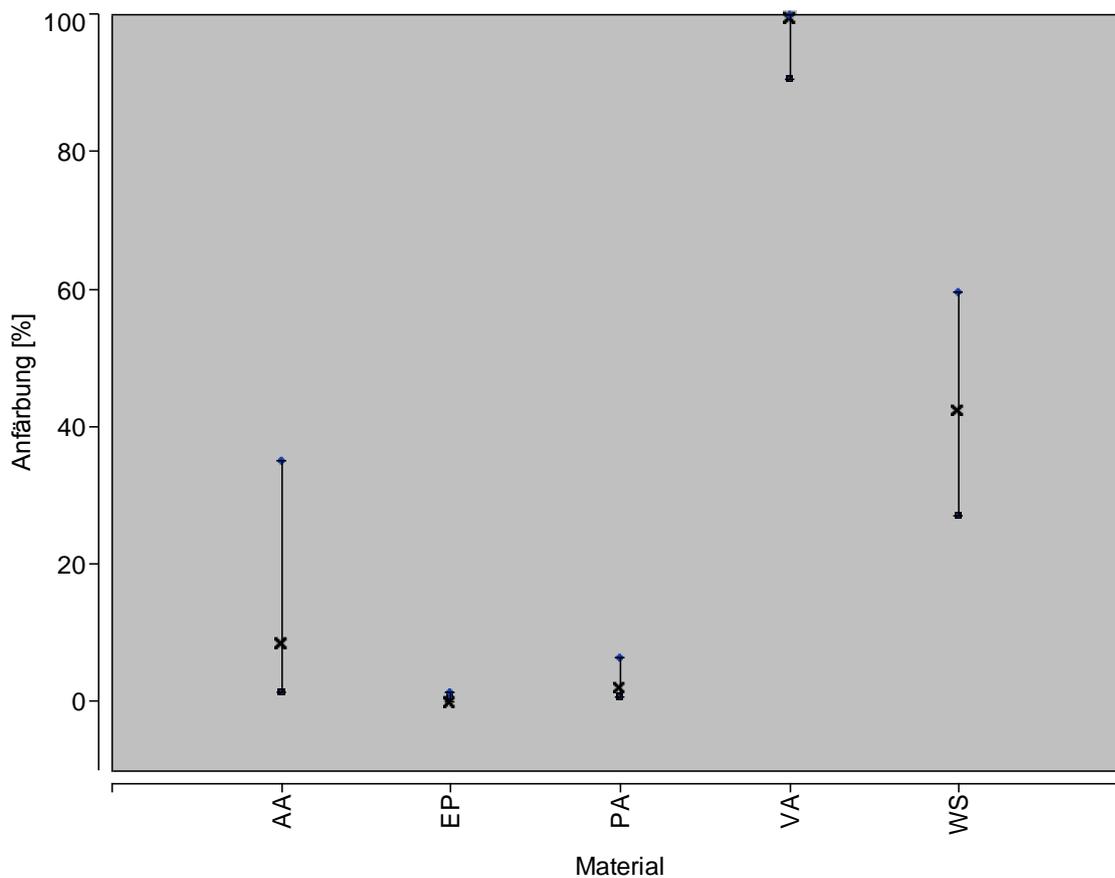


Abb. 10a: Permeabilisierung mit Digitonin, Fixierung mit CytoRich Red

Fixierung per Lufttrocknung

Natives Zellmaterial der Vaginalschleimhaut enthielt 91% positive Zellen, solches der Wangenschleimhaut 69%. Insgesamt 1% der Zellen aus Leistenhaut zeigte eine positive Farbreaktion, Peniszellen waren dagegen allesamt negativ. 20% der aus Analabstrichen gewonnenen Zellen waren positiv.

Der Zellzustand war in nahezu allen Fällen sehr gut, in einem Fall wurde er mit gut bewertet.

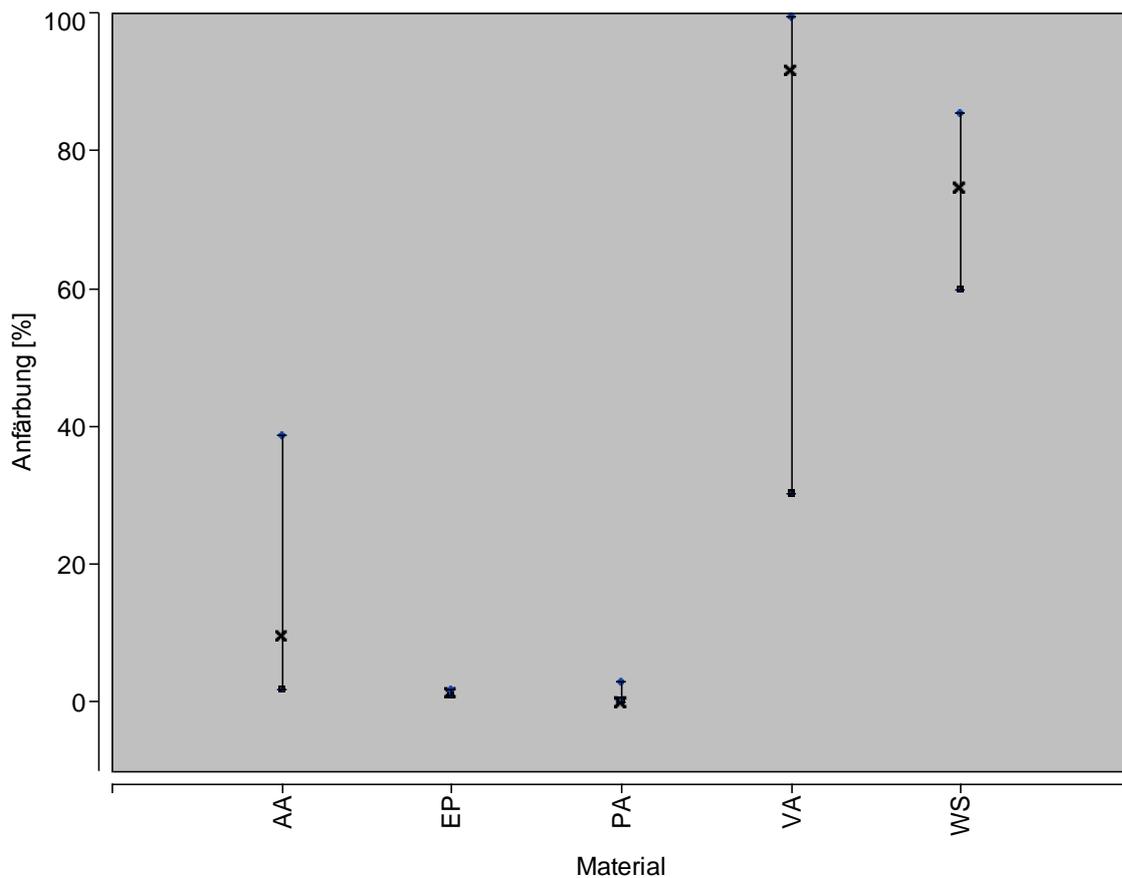


Abb. 10b: Permeabilisierung mit Digitonin, Fixierung mittels Lufttrocknung

Ethanol-Ether-Fixierung:

Die Fixation mit Ethanol-Ether-Gemisch führte zu 90% positiven Vaginal- sowie 59% ebensolcher Wangenschleimhautzellen. Weder Leistenhaut noch Penisepithel wiesen je positive Zellen auf. Die Anfärbung von Zellen aus analem Abstrichmaterial führte bei 12% von ihnen zu einer positiven Färbung.

Auch hier war mit einer Ausnahme stets ein sehr guter Zellzustand nach Färbung gegeben.

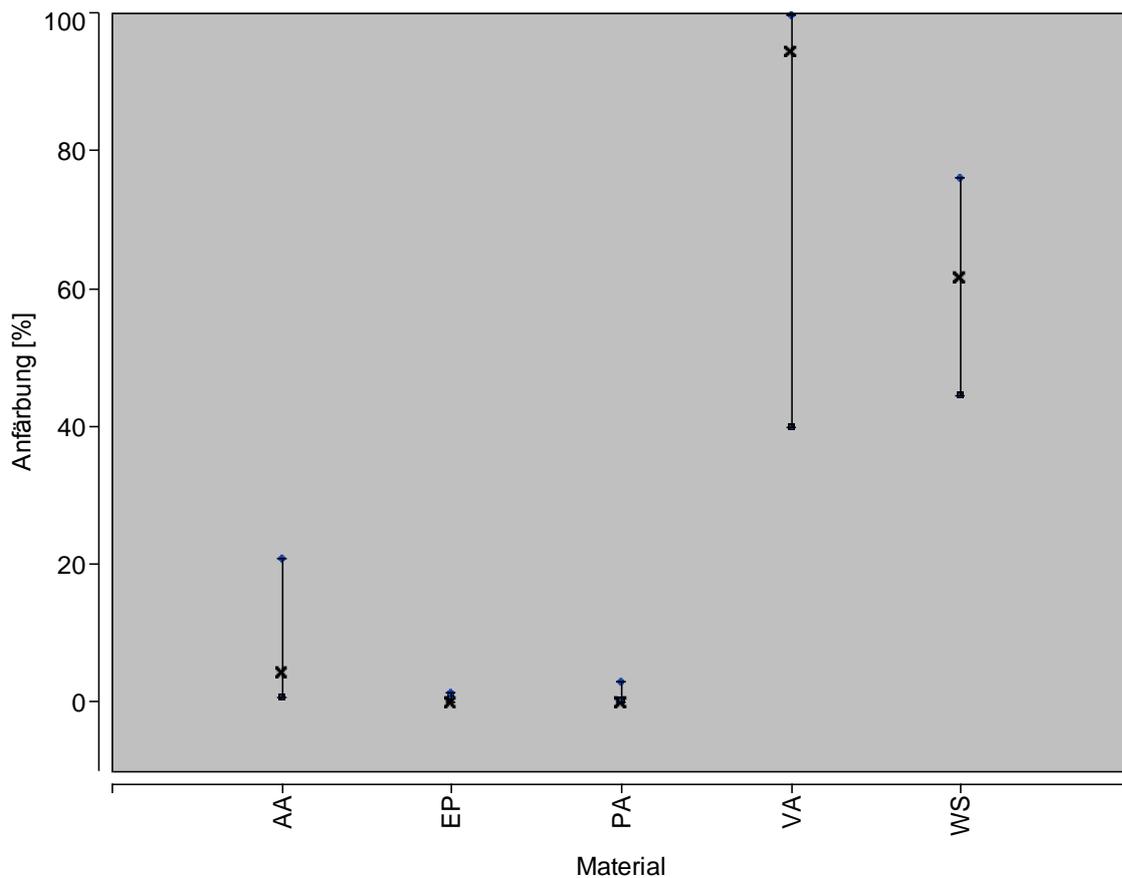


Abb. 10c: Permeabilisierung mit Digitonin, Fixierung mit Ethanol-Ether

4.2.5 Zyklusabstriche

Die über einen gesamten Zyklus gesammelten vaginalen Abstriche von vier Probandinnen wurden einer immunhistochemischen Färbung unterzogen, bei welcher ein Antikörper gegen Cytokeratin 4 zum Einsatz kam. Die Ergebnisse sind Tabelle 8 und Abbildung 11 zu entnehmen (jeweils im Anhang).

4.2.6 Postkoitale Abstriche

In Tabelle 9 sind sämtliche durchgeführten immunocytochemischen Färbungen an postkoitalen Abstrichen aufgeführt.

Es lagen 40 Penisabstriche vor, die nach vaginalem Kontakt und unterschiedlicher Latenzzeit zur Abnahme gefärbt wurden. Dabei variiert der Anteil anti-CK4-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl bei unmittelbar nach dem Verkehr abgenommenen Abstrichen zwischen 10% (M 5/1, 12, 18/1 und 38) und 80% (M 13). Es lagen weiterhin Werte von 20%, 40% und 50% vor.

Wurden die Abstriche zwischen 30 und 60 Minuten postkoital angefertigt, lag die gleiche Variationsbreite vor: 10% der Zellen waren in einem Abstrich (M 21/2) positiv, der von Person 1 nach Kontakt mit Person 4 abgenommen wurde. Dagegen konnte zweimal (M 14/1 und M22) der immunocytochemische Nachweis von Cytokeratin 4 bei 80% der Zellen nach Kontakt zwischen den Personen 3 und 13 erbracht werden. In zwei Fällen wurden je 60% positive Zellen beobachtet.

Zwischen zwei und 24 Stunden postkoitaler Latenz zur Anfertigung der Abstriche erbrachte die immunocytochemische Färbung ein Ergebnis zwischen 10% und 20% an positiven Zellen. Neun Abstriche enthielten 10% positive Zellen (z.B. M 15/2, 2 Stunden postkoital und M 29, 24 Stunden postkoital), drei Abstriche jeweils 20%, eine Probe (M 21/4) wies 30% angefärbte Zellen auf.

Wurden umgekehrt nach dem Geschlechtsverkehr vaginale Abstriche abgenommen, wurden nach Anfärbung bis auf eine Ausnahme stets etwa 90% anti-CK4-positive Zellen beobachtet. Es zeigte sich dabei kein Unterschied zwischen unmittelbar postkoital angefertigten Abstrichen und solchen, die nach einer Zeit von bis zu 12 Stunden abgenommen wurden. Lediglich eine Probe (M 19/1, eine halbe Stunde postkoital angefertigt) enthielt 60% positive Zellen.

4.2.7 Versuchsteil Alte Abstriche

Für keines der Epithelien ergab sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Färbeergebnisses im Vergleich zwischen Asservaten mit langer (über 6 Monate) und solchen mit kurzer Lagerungsdauer. Eine grafische Darstellung (Abb. 12) findet sich in Anhang II.

4.2.8 Cytokeratin 8

Es wurde neben den in den bisherigen Versuchen verwendeten Abstrichen von Leistenhaut, Wangenschleimhaut, Penis, Vagina und Analschleimhaut für diesen Versuch Urin untersucht.

In keinem der untersuchten Abstriche gelang ein immuncytochemischer Nachweis von Cytokeratin 8. Dagegen finden sich in allen untersuchten Urinproben vereinzelte sehr gut anzufärbende Zellen (Abbildungen 36 und 37, Anhang II).

4.3 DNA

Die Ergebnisse der DNA-Typisierung von Abstrichen der Wangenschleimhaut sind in den Abbildungen 43a-e (Anhang II) für jene Proben dargestellt, welche in einer zuvor durchgeführten quantitativen Messung eine als ausreichend anzunehmende DNA-Menge aufwiesen. Es sind dies je eine Probe der Versuchspersonen 1, 2 und 4 sowie zwei Proben von Person 6. Abbildung 44 zeigt die als Leseraster dienende Leiter, auf welcher die gängigen möglichen Allele dargestellt sind.

Es wurden die autosomalen Genloci D3S1358, vWA, FIBRA, THO1, SE33, D8S1179, D21S11, D18S51 sowie das gonosomale Merkmal Amelogenin untersucht, welche allesamt in der forensischen Praxis geläufig sind.

Folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der DNA-Typisierung im Überblick.

DNA-Systeme	D3S1358	VWA	FIBRA	THO1	SE33	D8S1179	D21S11	D18S51	Amel
WS1.1-1	16 / 17	16 / (17+18)	20 / (23) / 24	6 / 7	24.2 / (29.2) / 30.2	14 / 15	27 / 27	12 / (14) / 17	X / Y
WS2.2-1	15 / 16	16 / 18	23 / 24	6 / 10	29.2 / 30.2	12 / 13	28 / 28	12 / 14	X / Y
WS4.1-1	15 / 16 / (17+18)	16 / 18	22 / 24 / (25)	9 / 9.3	(27.2) / 29.2 / 30.2	(12) / 13 / (14)	28 / 32.2	12 / 12	X / (Y)
W6.1-1	17 / 18	15 / (16) / 18	(20) / 21 / (23) / 24	9 / 9	20 / 22.2 / (24.2)	10 / 13	(28) / 31.2	13 / 14 / (19)	X / X
W6.2-1	17 / 18	15 / 18	21 / 24	9 / 9	20 / 22.2	10 / 13	28 / 31.2	13 / 14	X / X

In der Regel waren für jeden Genlocus ein oder zwei eindeutige Peaks nachweisbar, entsprechend einem homo- bzw. heterozygot auftretenden Allel. Einige Proben zeigten jedoch für bestimmte Loci mehr als zwei Ausschläge, die jedoch allesamt deutlich schwächer ausfielen und auf Verunreinigungen zurückzuführen sind. Es handelt sich um vier Allele bei Person 1 (Genloci vWA, FIBRA, SE33 und D18S51), fünf Allele bei Person 4 (D3S1258, FIBRA, SE33, D8S1179 und Amelogenin) sowie ebenfalls fünf fremde Allele in der ersten Probe von Person 6 (vWA, FIBRA, SE33, D21S11 und D18S51). Die entsprechenden Allele sind in obenstehender Tabelle durch runde Klammern, in den Abbildungen 43a-e im Anhang durch „< >“ gekennzeichnet.

4.4 RNA

4.4.1 Biopsien

Die Ergebnisse der quantitativen mRNA-Bestimmung mittels einer reversen Transkription der mRNA in cDNA und anschließender RT-PCR sind für sämtliche untersuchten Gewebeproben in Tabelle 11 (Anhang I) und grafisch in Abb. 13 (Anhang II) dargestellt. Die Expression von Cytokeratin 10-mRNA wurde dabei gleich eins gesetzt. Der Wert von 13, 8678633 für die Proben des Herzmuskels (HE) ergibt sich rechnerisch. Da ein Anstieg der Fluoreszenz auch nach über 45 Zyklen nicht zu verzeichnen war, wurde ein CP-Wert (dieser bezeichnet denjenigen Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt) von 50 gesetzt, der jedoch willkürlich ist und daher nicht dem tatsächlichen CP-Wert für Cytokeratin 4-mRNA im Herzmuskelbiopsat entsprechen muss. Es ist daher nicht notwendigerweise von einem tatsächlichen Unterschied in der Expression von CK 4- und CK 10-mRNA auszugehen.

4.4.2 Abstriche

In Abbildung 14 (siehe Anhang II) sind die Mittelwerte von 7 Wangenschleimhaut- und 6 Vaginalschleimhautabstriche als Verhältnis der Konzentrationen von Cytokeratin 4- zu Cytokeratin 10-mRNA aufgetragen, wobei letztere gleich 1 gesetzt wurde. Es ergibt sich daher eine relative Expression von Cytokeratin 4-mRNA zu derjenigen von Cytokeratin.

Im Mittel ergibt sich für Wangenschleimhaut ein Verhältnis von 9.876:1 (Standardabweichung 12.556) und für Vaginalschleimhaut ein Verhältnis von 78,6:1 (Standardabweichung 34,4). Die Abbildungen 15a und 15b (Anhang II) zeigen die Amplifikationskurven für Cytokeratin 4 und 10 (KRT4 und KRT10 in den Abbildungen) für Wangen- und Vaginalabstriche. Der Abstand der crossing points (Δ CP) ist als waagerechter Strich eingezeichnet. Er beträgt für Wangenschleimhaut 8 und für Vaginalschleimhaut 6.

5 Diskussion

5.1 Material und Methodik

5.1.1 Proben und Fixation

Die Qualität der histologischen Proben war von höchst unterschiedlichem Ausmaß. Aufgrund der zum Teil langen Liegezeit der Leichen vor der Probenentnahme und der darauffolgenden Fixation in Formalin waren die Gewebe mehr oder minder starken autolytischen Prozessen unterworfen. Gerade das Epithel der Proben scheint in hohem Maße unter diesen Prozessen gelitten zu haben und war auf einigen Schnitten nicht einmal mehr vorhanden. So waren vor allem Proben mit Übergangsepithel häufig von minderer Qualität.

Die cytologischen Proben, die von freiwilligen Probanden zur Verfügung gestellt worden waren, wurden zum großen Teil unmittelbar oder kurzfristig nach ihrer Anfertigung fixiert und waren daher in tadellosem Zustand, bevor sie der immunocytochemischen Färbung unterzogen wurden. Auch bei jenen Abstrichen, die bis zu einem Jahr lang gelagert worden waren, bevor die Fixation erfolgte, waren lichtmikroskopisch keinerlei autolytische Veränderungen nachzuweisen. Eine Lagerung unter trockenen Bedingungen bei Raumtemperatur scheint demnach für mindestens ein Jahr möglich ohne eine signifikante Verschlechterung des Zellzustands hinnehmen zu müssen.

5.1.2 Immunhisto- und -cytochemische Färbung

Die für viele der angewandten Antikörper notwendige Antigendemaskierung im Dampfgerat bzw. der Mikrowelle stellt eine nicht zu unterschätzende Herausforderung für die Gewährleistung der Haftung der Zellen auf dem Objektträger dar. Die versuchsweise Anwendung von nicht-silanisierten Objektträgern führte zu einem Verlust sämtlicher aufgebrauchter Zellen. Auch die für die Mikrodissektion benötigten PALM-Objektträger bedürfen einer Vorbehandlung mit Poly-L-Lysin, da es sonst zu großen Zellverlusten kommt.

5.2 Histologie

5.2.1 Identifizierung geeigneter Antikörper

Cytokeratin 1 wurde sowohl in verhornendem wie auch in nicht verhornendem mehrschichtigem Epithel nachgewiesen, wobei die immunhistochemische Markierbarkeit von letzterem fast ausschließlich sehr schwach war. Dennoch widersprechen diese Ergebnisse den gängigen Erkenntnissen [8], wonach Cytokeratin 1 ausschließlich in der Epidermis vorkommt. Dies dürfte am ehesten der vergleichsweise schwierigen Handhabung des Antikörpers zuzuschreiben sein. Da eine in der forensischen Routine anwendbare Methode Ziel der Arbeit war, wurde Cytokeratin 1 als Differenzierungsmarker verworfen.

Die immunhistochemische Anfärbung von Cytokeratin 2e lieferte ausgezeichnete Ergebnisse für epidermale Präparate mit einem eher geringen Grad an Verhornung, wie dies auch in der Literatur beschrieben ist [29]. Allerdings wurden auch in Präparaten der Wangen- und Vaginalschleimhaut positive Farbreaktionen beobachtet. Aus diesem Grund kommt Cytokeratin 2e nicht als Marker zur Differenzierung zwischen Epidermis und Schleimhaut infrage.

Die Cytokeratine 3 und 12 treten lediglich in menschlicher Cornea auf [8] und wurden daher nicht herangezogen.

Es gelang mit Hilfe des Antikörpers gegen Cytokeratin 4 eine sehr gute Darstellung sowohl von Wangen- als auch von Vaginalschleimhaut, wohingegen kein Nachweis dieses Cytokeratins in sämtlichen anderen untersuchten Epithelien erbracht wurde. Angesichts dieser Ergebnisse scheint Cytokeratin 4 ein vielversprechender Ansatz zur Unterscheidung von unverhorntem Plattenepithel gegenüber anderen Epithelien zu sein.

Die Cytokeratine 5 und 6 wurden in allen untersuchten Epithelien nachgewiesen mit Ausnahme des Darmepithels. Somit scheiden sie als Charakteristikum von nicht verhornendem Plattenepithel aus. Da ein eindeutiger Nachweis von Darmepithel auf unbekanntem Probenmaterial anhand eines alleinigen „negativen“ Nachweises nicht realistisch scheint, wurden die Cytokeratine im weiteren Verlauf der Forschungsarbeit nicht angewandt.

Eine gute Anfärbung von Urothel gelang mittels des Anti-Cytokeratin 7-Antikörpers. Leicht positive Reaktionen von Vaginal- und Darmepithel könnten unspezifischer Art sein.

Cytokeratin 8 scheint ebenfalls hervorragend geeignet zum Nachweis von Urothel. Zudem gelang der Nachweis des Proteins in Darmschleimhaut in allen entsprechenden Präparaten. Da es zu keinerlei falsch-positiven Ergebnissen kam, wurde der färbereiche Nachweis von Cytokeratin 8 zum forensischen Nachweis von Urothel demjenigen von Cytokeratin 7 vorgezogen.

Die Literatur beschreibt das Vorkommen der Cytokeratine 9 und 10 in verhorndem Plattenepithel (z.B. [8]). Diese werden an dieser Stelle nicht im Detail wiedergegeben.

Laut Moll et al. zeigen die Cytokeratine 10 und 11 im Peptid-Mapping ein sehr ähnliches Muster und gleichen sich in ihrer Vorkommen im Körper [8]. Es wird diskutiert, ob Cytokeratin 11 einen Polymorphismus der Keratine 10 oder 6 darstellt [30]. Daher wurde auf eine getrennte Untersuchung von Cytokeratin 11 verzichtet.

Da der immunhistochemische Nachweis von Cytokeratin 13 in Wangen- und Vaginalschleimhaut sowie Urothel, nicht jedoch in epidermalen Schnitten und jenen des Darms gelang, schien mit diesem Cytokeratin ein geeigneter Marker zur Unterscheidung der genannten Epithelien gefunden.

In der Literatur ist ein Vorkommen von Cytokeratin 14 hauptsächlich in basalen epithelialen Zellen beschrieben [31]. Dass der immunhistochemische Nachweis dennoch in einigen oberflächlich zur Darstellung gelangten Zellen gelang, ist höchstwahrscheinlich den teils sehr starken autolytischen Veränderungen zuzuschreiben, die zu einer Freilegung der basalen Zellschichten führt.

Da Cytokeratin 15 als Marker für basale epidermale Zellen und Haarfollikel beschrieben wird [32] und damit in keinem der als forensisch relevant eingestuftem Gewebe vorkommt, was hier anhand von Stichproben bestätigt werden konnte, wurde der Ansatz nicht weiter verfolgt.

Cytokeratin 16 ist ein Marker für proliferierende Epithelien [33] und konnte demnach in fast keinem der getesteten Präparate nachgewiesen werden. Lediglich ein Penisschnitt fiel leicht positiv aus. Dies ist leicht dadurch zu erklären, dass es sich um Gewebe aus einer Phimose handelt, welches durch Smegma verunreinigt war und sich unspezifisch färbte.

Keratin 17 ist in basalen Zellen einiger Epithelien wie denen der Trachea oder des Larynx zu finden [34]. Dies erklärt das fehlende Vorkommen in den hier getesteten Gewebeproben.

Cytokeratin 18 entspricht in seinem Vorkommen in den getesteten Geweben Cytokeratin 8 [12]. Allerdings wurden an urothelialen Schnitten etwas schlechtere Ergebnisse erzielt, weshalb Cytokeratin 8 zur Anwendung an cytologischen Präparaten vergezogen wurde.

Ein Vorkommen von Cytokeratin 19 konnte in Präparaten von urothelialelem und Darmgewebe nachgewiesen werden. Da die immunhistochemische Anfärbung jedoch schwächer ausfiel als beispielsweise für Cytokeratin 8, wurde Cytokeratin 19 nicht zur Testung an cytologischem Material herangezogen.

Unter den getesteten Geweben wiesen regelmäßig nur Präparate des Enddarms sowie ein Präparat der Blase ein Vorkommen von Cytokeratin 20 auf, was sich mit den Erkenntnissen von Moll et al. [22] deckt. Ein Nachweis von Cytokeratin 20 kommt daher als Differenzierungsmarker für Schleimhaut gegenüber Epidermis nicht in Frage. Da das vorliegende urotheliale Gewebe deutliche Autolysezeichen vorwies, waren die CK20-positiven Deckzellen großteils nicht mehr vorhanden.

Der gegen die hochmolekularen Cytokeratine 1, 5, 10 und 14 gerichtete Antikörper (Cytokeratin 903) war in allen getesteten Schnitten bis auf diejenigen des Darms nachweisbar. Eine eindeutige Identifizierung von Darmepithel anhand eines negativen Färbeverhaltens auf forensischem Spurenmaterial ist jedoch unrealistisch, da davon auszugehen ist, dass eine Vielzahl nichtepithelialen sowie nichtbiologischen Spurenmaterials ebenso keine Farbreaktion zeigt.

Da die Antikörpermischung AE 1/3 gegen den größten Teil (CK 1-8, 10, 13-16 sowie 18) der bekannten Cytokeratine gerichtet ist [35], wurde erwartungsgemäß eine positive immunhistochemische Reaktion bei allen getesteten Präparaten beobachtet. Dies schließt den Einsatz als Marker zur Unterscheidung zwischen Schleimhaut und anderen Epithelien aus.

Die immunhistochemische Färbung der Präparate mit dem gegen die Cytokeratine 7 und 8 gerichteten Antikörper CAM 5.2 bestätigte die zuvor getrennt mit Antikörpern gegen Cytokeratin 7 und 8 erhobenen Befunde. Es gelang eine Anfärbung von urothelialelem Gewebe und Darmepithel. Da Antikörper gegen einzelnen Cytokeratine jedoch in höherem Maße gewebespezifisch sind, wurde auf die weitere Verwendung von CAM 5.2 verzichtet.

5.3 Cytologie

5.3.1 Vorversuche Zellpenetration

Die zur Identifizierung geeigneter Fixations- und Permeabilisationsmethoden durchgeführten Versuche brachten eine beachtliche Zahl an erfolgversprechenden Kombinationen hervor. Eine Reihe davon wurde in nachfolgenden Versuchsteilen eingehender verglichen. Ausgeschlossen wurde die Fixation mit InsideFix, welches Bestandteil des InsideStain Kits ist, das zusätzlich eine Lösung zur Zellpermeabilisation (InsidePerm) enthält. Da in kleineren Versuchsanordnungen die Permeabilisation mit InsidePerm sich nicht als überlegen gegenüber derjenigen mit Tween 20 herausstellte, jedoch deutlich teurer war, wurde von der Verwendung des Kits und somit derjenigen von InsidePerm im weiteren Verlauf abgesehen. Grundsätzlich sprechen die durchgeführten Versuche selbstverständlich nicht gegen eine Verwendung von InsideFix zur Zellfixation. Anhand größerer Versuchsanordnungen könnte ein möglicher qualitativer Unterschied zu den anderen hier verwendeten Fixationsmethoden genauer eruiert werden.

5.3.2 InCup vs Objektträgerfärbung

In Vorversuchen wurde die immuncytologische Färbung im Reaktionsgefäß mit derjenigen auf dem Objektträger verglichen. Dabei erwies sich die Objektträgerfärbung aufgrund konstanterer Ergebnisse und der einfacheren Durchführbarkeit als überlegen. Die Färbung im Reaktionsgefäß wurde daher verworfen.

5.3.3 Vergleich Fixationsmethoden und Permeabilisation

Die Permeabilisierung mit Tween zeigte vor allem bei der Anfärbung von Wangenschleimhaut schlechte Ergebnisse. Den höchsten Anteil positiver Zellen wies diese bei nativen Präparaten auf. Letztere waren jedoch in teilweise deutlich schlechterem Zustand nach Anfärbung. Mit CytoRich Red oder Ethanol-Ether fixierte Präparate waren hinsichtlich der Anfärbung noch schlechter. Lediglich der Zellzustand war besser, was ja auch primäres Ziel der Fixation ist. Da bei forensischem Untersuchungsgut nicht immer von einem guten Zustand der Zellen ausgegangen werden kann, ist eine weitere Verschlechterung ebendieses Zustands zu vermeiden. Zudem scheint eine maximale Anfärberate von 58% bei Wangenschleimhautzellen, wie sie bei einer Permeabilisierung mittels Tween 20 erreicht wurde, deutlich zu gering.

Wurden die Zellen mit Trypsin permeabilisiert, waren bei jeder Fixationstechnik sehr viel bessere Ergebnisse zu erzielen. Hinsichtlich der Ausbeute der Anfärbung unterschieden sich die Fixationsmethoden untereinander und von Nativpräparaten kaum. Allerdings kam es in einem geringen Prozentsatz der luftgetrockneten und mit Ethanol-Ether fixierten Präparate zu falsch-positiven Ergebnissen bei Penisabstrichen auch nach wiederholter Färbung. Falsch-positive Ergebnisse bei luftgetrockneten Präparaten sind in der Literatur beschrieben [36]. Da eine eindeutige Unterscheidung zwischen epidermalen und Schleimhautzellen gerade im Genitalbereich von großer Bedeutung ist und daher falsch-positive Ergebnisse tunlichst zu vermeiden sind, scheint die Verwendung von nativen und mit Ethanol-Ether fixierten Zellpräparaten keine praktikable Lösung zu sein. Die Fixation mit CytoRich Red stellt dagegen zusammen mit einer Trypsinbehandlung zur Permeabilisierung einen erfolgversprechenden Ansatz dar.

Bei allen Fixationstechniken und Permeabilisierungen trat ein mehr oder minder hoher Anteil positiver Analabstriche auf. Einerseits kommt laut Moll et al. [8] Cytokeratin 4 in der Analschleimhaut vor, andererseits konnten trotz Zentrifugation und sorgfältiger Abnahme des Überstandes nicht sämtliche Verunreinigungen, die auf analen Abstrichen praktisch durchgängig zu finden sind, zuverlässig zu beseitigen. Da der angewandte Farbstoff DAB optisch nicht von derlei Verunreinigungen zu unterscheiden ist, scheint eine Abgrenzung von analem Epithel allein mittels immuncytochemischer Färbung nicht möglich. Dass derartige Verunreinigungen zumindest einen gewissen Anteil an den positiven Farbreaktionen haben, scheint auch aufgrund der Tatsache ersichtlich, dass die Zahl positiver Zellen auf Analabstrichen großen Schwankungen unterliegt. Dies wird beispielsweise aus Tabelle 6 (Ergebnisübersicht der immuncytochemischen Anfärbung von Cytokeratin 4; Permeabilisierung mit Trypsin, Anhang I) deutlich, wenngleich die Schwierigkeit einer ausreichenden Standardisierung der Abstrichentnahme dabei auch eine gewisse Rolle spielen dürfte. Die positive Anfärbung von analem Spurenmaterial kann daher weder als falsch-positiv, noch gänzlich als richtig-positiv gewertet werden. Soll der Anteil der Verunreinigung am Färbeergebnis eliminiert werden, ist die Anwendung eines anderen Farbstoffes als DAB+ zu erwägen. Allerdings deuten die nicht unerheblichen Schwankungen im Färbeverhalten von Analabstrichen an, dass die dargestellte Methode zu falsch-negativen Ergebnissen in der praktischen forensischen Anwendung führen kann und somit ergänzender Verfahren bedarf, um

anales Spurenmaterial, beispielsweise nach analem Geschlechtsverkehr, nachweisen zu können.

5.3.4 Vorversuche Cytokeratin 13

Da Cytokeratin 13 in der immunhistologischen Färbung ähnlich gute Ergebnisse zeigte wie Cytokeratin 4, lag der Schluss nahe, dass dies auch bei cytologischen Präparaten der Fall sein könnte. Daher wurden die aus den Vorversuchen mit Cytokeratin 4 gewonnenen Ergebnisse stichprobenartig auf Cytokeratin 13 angewandt.

Die Permeabilisierung mit Tween 20 erzielte bei der Anfärbung von Cytokeratin 13 jedoch wesentlich schwächere Färbeergebnisse als dies bei Cytokeratin 4 der Fall gewesen war. Wenngleich nur jeweils zwei Wangen- und Vaginalabstriche gefärbt wurden, sind die Ergebnisse zwischen 0 und 30% Anfärbung dieser Epithelien wenig erfolgversprechend. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde daher eine Permeabilisierung mit Trypsin versucht. Diese führte zu Ergebnissen von teilweise bis zu 100% positiv gefärbten Zellen, allerdings erst bei etwa zweistündiger Inkubationszeit des Antikörpers und acht Minuten Inkubation von DAB+. Darunter traten jedoch zunehmend falsch-positive Farbreaktionen auf (siehe Tab. 4, Anhang I). Da diese eine für die forensische Praxis nicht zu tolerierende Fehlerquelle darstellen und mit Cytokeratin 4 ein verlässlicher Marker für Schleimhautzellen gefunden war, wurden keine weiteren Versuche mit Cytokeratin 13 durchgeführt. Es kann selbstverständlich nicht ausgeschlossen werden, dass ausführlichere Versuche zur Etablierung von Methoden führen, die auf einer Anfärbung von Cytokeratin 13 zur Identifizierung von Schleimhautzellen beruhen. Da jedoch Cytokeratin 4 einen verlässlichen Marker für Schleimhaut darstellt, wurde ein solcher Aufwand hier nicht betrieben

5.3.5 Spermien

Eine Anfärbbarkeit der untersuchten Epithelien durch Kernechtrot-Pikroindigokarmin, wie es für die Identifizierung von Spermien angewandt wird [37], konnte an Stichproben ausgeschlossen werden. Umgekehrt waren Spermien nicht mit den für die immunocytochemischen Färbungen angewandten Antikörpern markierbar. Von Möglichkeit einer gleichzeitigen Anwendung beider Färbetechniken ist daher auszugehen.

5.3.6 Zu Zyklusabstriche

Der Vergleich des Färbeverhaltens von Vaginalabstrichen im zeitlichen Verlauf während je eines Zyklus lässt keine Gemeinsamkeiten im Färbeverhalten erkennen. Damit kann die Möglichkeit eines sicheren Rückschlusses auf einen bestimmten Tag innerhalb des Zyklus ausgeschlossen werden. Um die Möglichkeit einer Eingrenzung der Periodenphase zu prüfen, müsste ein ungleich größeres Kollektiv untersucht werden. Bemerkenswert waren die intraindividuellen Unterschiede im Färbeverhalten. Diese lassen sich möglicherweise durch die bei vaginalen Abstrichen gelegentlich anzutreffenden Kontaminationen mit epidermalen Zellen erklären, die sich aus der räumlichen Nähe ergeben. Eine solche Kontamination ist jedoch von untergeordneter Relevanz, da die DNA-Typisierung eine Zuordnung der Zellen zu derjenigen Person erlaubt, von welcher sie stammen.

5.3.7 Postkoitale Abstriche

Die Betrachtung der Ergebnisse im zeitlichen Verlauf zeigt eine tendenzielle Abnahme des Anteils positiver Zellen auf postkoitalen Penisabstrichen. Dies zeigt, dass ein Verlust an über den Kontakt aufgenommenen Schleimhautzellen auch ohne zwischenzeitliches Duschen erfolgt. Dass die Werte dennoch eine starke Überlappung zeigen, kann zum einen der Art und Dauer des sexuellen Kontaktes, weiterhin der individuell unterschiedlichen Abnahmetechnik sowie den jeweiligen Tätigkeiten nach dem Geschlechtsverkehr zugeschrieben werden. Rückschlüsse auf die seit dem Geschlechtsverkehr vergangene Zeitdauer lassen sich allein anhand der Zahl der identifizierten Schleimhautzellen daher nicht.

5.3.8 Alte Abstriche

Da sich im Färbeverhalten von Zellen auf Abstrichen, welche nach ihrer Anfertigung mehr als sechs Monate bei Raumtemperatur gelagert wurden, kein signifikanter Unterschied zu frisch angefertigten Abstrichen zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass auch ältere Spuren aussagekräftige Resultate liefern können. Andererseits zeigen die Ergebnisse, dass die prozentuale Anfärberate auch einer reinen Schleimhautprobe keine Rückschlüsse auf das Alter dieser Probe zulässt.

5.3.9 Cytokeratin 8

Der Nachweis von Cytokeratin 8-positiven Zellen gelang in 2 von 3 Urinfiltraten, dagegen in keiner anderen Schleimhautprobe, abgesehen von Analschleimhaut und

bietet damit die Möglichkeit einer Identifizierung von Urin. Trotz eines filtrierten Urinvolumens von bis zu 500 ml waren lediglich in einer Probe mehr als 50, in einer zweiten hingegen weniger 20 Zellen und in einem Fall keinerlei Zellen immunocytochemisch markierbar, da schlichtweg zu wenig Zellen im Urinfiltrat vorkamen. Eine verlässliche DNA-Typisierung aus derart markierten Zellen einer einzelnen Urinprobe scheint mit den gegenwärtig zur Verfügung stehenden Methoden daher nicht realisierbar.

5.4 DNA

Die im Kapitel 4.3 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine DNA-Typisierung aus forensischem Spurenmaterial auch nach Durchführung einer immunocytochemischen Färbung zum Nachweis schleimhautspezifischer Cytokeratine erfolgreich durchführbar sein kann. Allerdings wurde eine solche Typisierung nur an denjenigen Proben überhaupt versucht, die zuvor in einer quantitativen Bestimmung der in der jeweiligen Probe vorhandenen gesamten DNA einen kritischen Mindestwert erzielten. Etliche Proben scheiterten bereits an dieser Hürde. Als mögliche Gründe hierfür kommen Unterschiede in der Lagerungsdauer, dem Zeitintervall zwischen Probengewinnung und -fixierung, Zellverluste während des Färbeprozesses, eine thermische Schädigung durch die Antigendemaskierung im Dampfgerät und weitere in Frage. Diese Fehlerquellen zu eruieren und zu eliminieren muss Gegenstand weiterer Forschungsarbeit sein.

In einigen der erfolgreich typisierten Proben waren durch Verunreinigungen zu erklärende zusätzliche Allele festzustellen. Die Gewinnung und weitere Verarbeitung des Abstrichmaterials bis hin zur Laser-Mikrodissektion ist mit praktikablem Aufwand nicht gänzlich ohne das Risiko einer minimalen Verunreinigung durchführbar. Das Ausmaß dieser Verunreinigung war jedoch in keinem Fall geeignet eine fehlerfreie und damit eindeutige DNA-Typisierung zu verhindern.

5.5 RNA

Die unter 4.4 dargestellten Ergebnisse der quantitativen mRNA-Bestimmung aus Proben verschiedener Organe bestätigen die zuvor immunhistochemisch und – cytologisch gewonnenen Erkenntnisse. Es zeigt sich wie erwartet eine um ein Vielfaches höhere Expression von Cytokeratin 4-mRNA im Vergleich zu Cytokeratin 10 in den Schleimhäuten der Mundhöhle, des weiblichen Genitaltraktes, des Analkanals sowie der Blase, allerdings auch in der Leber sowie im Gehirn. Da jeweils nur eine kleine Zahl an Proben untersucht wurde, lassen sich die einzelnen Gewebe zwar bislang nicht anhand ihres Expressionsmusters sicher voneinander unterscheiden. Die Ergebnisse stellen jedoch diesbezüglich einen vielversprechenden Ansatz dar und zeigen die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen auf. Insbesondere in Kombination mit einer quantitativen Bestimmung weiterer mRNA-Moleküle, die an der Synthese von Intermediärfilamentproteinen beteiligt sind, könnte so ein genaues Expressionsprofil für eine Vielzahl von Gewebearten erstellt werden.

Die Extraktion und Quantifizierung der Cytokeratin-spezifischen mRNA aus Abstrichen von Wangen- und Vaginalschleimhaut führte zu den in Abschnitt 4.4.2 dargestellten Ergebnissen. Die Auswertung der quantitativen RNA-Bestimmung liefert ein für die untersuchten Schleimhäute charakteristisches Verhältnis von Cytokeratin 4-mRNA zu Cytokeratin 10-mRNA, welches für Vaginalschleimhaut nur eine geringe Schwankungsbreite (Mittelwert 78,6:1 im Verhältnis zur Expression von Cytokeratin 10, Standardabweichung 34,4) zwischen den einzelnen Proben aufweist.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine neue und zuverlässige Methode zur Identifizierung von Schleimhautzellen in forensischen Spuren.

Zunächst wurden aus der Vielzahl an Cytokeratinen und den entsprechenden Antikörpern diejenigen identifiziert, die spezifisch für Schleimhautepithel-Zellen sind. Der nächste Schritt bestand in der Modifikation der Färbeprotokolle, die ursprünglich für histologische Schnitte konzipiert waren, für den Einsatz an cytologischen Präparaten. Weiterhin mussten geeignete Fixations- und Permeabilisationsverfahren gefunden und angepasst werden.

In einer Vielzahl von Vorversuchen kristallisierte sich für den forensischen Einsatz Cytokeratin 4 als schleimhautspezifischer Zellbestandteil heraus. CytoRich Red erwies sich als geeignete Fixationslösung. Die Verwendung von Trypsin zur Permeabilisierung der cytologischen Präparate führte zu ausgezeichneten Färberesultaten, ohne die morphologische Integrität der Zellen zu beeinträchtigen.

Die gemäß den entwickelten Vorschriften gefärbten Zellen konnten in einem nächsten Schritt mittels Laser-Mikrodissektion selektiv gewonnen werden. Es gelang in mehreren Stichproben die Erstellung einer DNA-Typisierung, dem sogenannten „genetischen Fingerabdruck“.

Schließlich gelang es mittels Real-Time-quantitative-PCR Unterschiede in der relativen Expression von Cytokeratin 4 zwischen Vaginal- und Wangenschleimhaut festzustellen. Dieser Ansatz stellt einen ersten Schritt zur eindeutigen Unterscheidung der beiden Schleimhäute dar, was einen weiteren Mosaikstein in der Auswertung biologischer Spuren darstellen kann.

7 Anhang

7.1 Anhang I - Tabellen

Gewebe	Anfärbung	Ck 1	Ck 2e	Ck 4	Ck 5/6	Ck 7
Haut	gesamt	10	10	11	10	9
	+++	2	9	0	0	0
	++	5	1	0	0	0
	+	0	0	0	10	0
	-	3	0	11	0	9
	Pos. Präp.	70%	100%	0%	100%	0%
WS	gesamt	8	10	7	8	8
	+++	0	0	5	0	0
	++	0	1	2	1	0
	+	6	3	0	7	1
	-	2	6	0	0	7
	Pos. Präp.	75%	40%	100%	100%	13%
Urothel	gesamt	13	11	13	13	14
	+++	0	0	0	0	11
	++	1	0	0	2	3
	+	0	0	0	7	0
	-	13	11	13	4	0
	Pos. Präp.	8%	0%	0%	69%	100%
VA	gesamt	9	9	9	9	9
	+++	0	0	3	0	0
	++	3	2	5	1	0
	+	4	2	1	8	1
	-	2	5	1	0	8
	Pos. Präp.	78%	44%	90%	100%	11%
Penis	gesamt	9	7	9	9	9
	+++	3	1	0	0	0
	++	4	4	0	3	0
	+	1	0	0	6	0
	-	1	2	9	0	9
	Pos. Präp.	89%	71%	0%	100%	0%
Enddarm	gesamt	10	10	10	8	10
	+++	0	0	0	0	0
	++	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	1
	-	10	10	10	8	9
	Pos. Präp.	0%	0%	0%	0%	10%

Tabelle 1a: Übersicht der immunhistochemischen Färbung; CK 1 – CK7

Gewebe	Anfärbung	Ck 8	Ck 13	Ck 14	Ck 15	Ck 16
Haut	gesamt	9	10	10	2	9
	+++	0	0	0	0	0
	++	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0
	-	9	10	10	2	9
	Pos. Präp.	0%	0%	0%	0%	0%
WS	gesamt	8	8	9	2	3
	+++	0	7	1	0	0
	++	0	1	1	0	0
	+	0	0	0	0	0
	-	8	0	7	2	3
	Pos. Präp.	0%	100%	22%	0%	0%
Urothel	gesamt	11	11	13	4	4
	+++	6	5	0	0	0
	++	2	2	0	0	0
	+	2	4	0	0	0
	-	1	0	13	4	4
	Pos. Präp.	91%	100%	0%	0%	0%
VA	gesamt	10	9	8	2	4
	+++	0	9	0	0	0
	++	0	0	0	0	0
	+	0	0	6	0	0
	-	10	0	2	2	4
	Pos. Präp.	0%	100%	75%	0%	0%
Penis	gesamt	9	9	9	2	6
	+++	0	0	3	0	0
	++	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	1
	-	9	9	6	2	5
	Pos. Präp.	0%	0%	33%	0%	17%
Enddarm	gesamt	9	8	8	2	4
	+++	2	0	0	0	0
	++	5	0	0	0	0
	+	2	0	0	0	0
	-	0	8	8	2	4
	Pos. Präp.	100%	0%	0%	0%	0%

Tabelle 1b: Übersicht der immunhistochemischen Färbung; CK 8 – CK 16

Gewebe	Anfärbung	Ck 17	Ck 18	Ck 19	Ck 20	Ck 903
Haut	gesamt	3	10	10	10	9
	+++	0	0	0	0	7
	++	0	0	0	0	1
	+	0	0	0	0	0
	-	3	10	10	10	1
	Pos. Präp.	0%	0%	0%	0%	89%
WS	gesamt	2	9	8	9	9
	+++	0	0	0	0	1
	++	0	0	0	0	7
	+	0	0	0	0	1
	-	2	9	8	9	0
	Pos. Präp.	0%	0%	0%	0%	100%
Urothel	gesamt	3	12	10	13	12
	+++	0	0	0	0	5
	++	0	3	4	0	3
	+	0	5	6	1	4
	-	3	4	0	12	0
	Pos. Präp.	0%	67%	100%	8%	100%
VA	gesamt	2	9	9	9	9
	+++	0	0	0	0	7
	++	0	0	0	0	2
	+	0	0	0	0	0
	-	2	9	9	9	0
	Pos. Präp.	0%	0%	0%	0%	100%
Penis	gesamt	2	9	9	9	9
	+++	0	0	0	0	3
	++	0	0	0	0	6
	+	0	0	0	0	0
	-	2	9	9	9	0
	Pos. Präp.	0%	0%	0%	0%	100%
Enddarm	gesamt	2	8	8	8	8
	+++	0	4	0	0	0
	++	0	4	0	1	0
	+	0	0	6	4	0
	-	2	0	2	3	8
	Pos. Präp.	0%	100%	75%	63%	0%

Tabelle 1c: Übersicht der immunhistochemischen Färbung; CK 17 – 20 und Pancytokeratin 903

Gewebe	Anfärbung	AE 1/3	CAM 5/2	Östrogenr.
Haut	gesamt	10	10	9
	+++	1	0	0
	++	7	0	0
	+	2	0	0
	-	0	10	9
	<i>Pos. Präp.</i>	100%	0%	0%
WS	gesamt	9	9	8
	+++	1	0	0
	++	4	0	0
	+	4	0	0
	-	0	9	8
	<i>Pos. Präp.</i>	100%	0%	0%
Urothel	gesamt	12	12	13
	+++	11	1	0
	++	1	6	0
	+	0	4	0
	-	0	1	13
	<i>Pos. Präp.</i>	100%	92%	0%
VA	gesamt	9	9	9
	+++	2	0	0
	++	6	0	0
	+	1	0	0
	-	0	9	9
	<i>Pos. Präp.</i>	100%	0%	0%
Penis	gesamt	9	9	9
	+++	1	0	0
	++	8	0	0
	+	0	0	0
	-	0	9	9
	<i>Pos. Präp.</i>	100%	0%	0%
Enddarm	gesamt	8	8	8
	+++	3	6	0
	++	4	2	0
	+	1	0	0
	-	0	0	8
	<i>Pos. Präp.</i>	100%	100%	0%

Tabelle 1d: Übersicht der immunhistochemischen Färbung; Pancytokeratine AE 1/3 und CAM 5.2 sowie Östrogenrezeptor

Lfd. Nr.	Gewebe	CK 1	CK 2e	CK 4	CK 5/6	CK 7	CK 8	CK 13	CK 14	CK 15	CK 16	CK 17
1	Haut											
2	Haut										-	
3	Haut	+++	+++	-	+	-	-	-	-	-	-	
4	Haut	++	+++	-	+	-	-	-	-	-	-	
5	Haut		+++		+	-		-	-		-	
6	Haut	++	+++	-	+	-	-	-	-	-		
7	Haut	-	+++	-	+	-	-	-	-			-
8	Haut	++	+++	-	+		-	-	-			
9	Haut	++	+++	-	+	-	-	-	-			
11	Haut			-								
12	Haut	++	+++	-								
14	Haut	-	++	-	+	-	-	-	-		-	-
15	Haut		+++								-	
16	Haut	-		-	+	-	-	-	-		-	-
17	Haut	+++		-	+	-	-	-	-		-	
21	WS	+	-	+++	+	-	-	+++	-	-	-	
22	WS	+	-	+++	+	-	-	+++	-	-	-	-
23	WS	+	+	+++	+	-	-	+++	-		-	-
24	WS		-									
25	WS	-	-	++	+	-	-	+++	-			
28	WS	-	-	++	+	-	-	+++	-			
29	WS		-						-			
30	WS	+	+	+++	+	-	-	+++	-			
31	WS	+	+	+++	++	-	-	+++	+++			
32	WS	+	+		+	+	-	++	++			
42	Blase	-	-	-	+	+++			-			
43	Blase	-	-	-	-	+++	+	++			-	
46	Blase		-		+	++	+++	+++	-	-		
48	Blase	-	-	-	-	+++	+++	+	-	-		
49	Blase	-	-	-		++			-			
50	Blase	-	-	-	-	+++	++	+	-			
52	Harnleiter	-		-	++	+++	+++	+++	-			-
53	Blase	++		-	-	++	++	+	-			-
62	Vagina	++	-	++	+	-	-	+++	+	-	-	
63	Vagina	-	-	++	++	-	-	+++	+	-	-	
64	Vagina	++	++	++	+	-	-	+++	+		-	
65	Vagina	+	++	+++	+	-	-	+++	+		-	-
66	Vagina	+	-	+++	+	+	-	+++	+			
67	Vagina	+	-	+++	+	-	-	+++	-			
68	Vagina	++	+	++	+	-	-	+++	+			-
69	Vagina	-	-	-	+	-	-	+++	-			

Lfd. Nr.	Gewebe	CK 1	CK 2e	CK 4	CK 5/6	CK 7	CK 8	CK 13	CK 14	CK 15	CK 16	CK 17
71	Vagina	+	+	+	+	-	-	+++				
72	Vagina			++			-					
81	Penis	+	-	-	+	-	-	-	+++	-	-	
82	Penis	+++	++	-	++	-	-	-	+++	-	-	
83	Penis	-	-	-	+	-	-	-	+++			
85	Penis	++	++	-	++	-	-	-	-			
87	Penis	++	++	-	++	-	-	-	-			-
88	Penis	+++	++	-	+	-	-	-	-		+	
89	Penis	+++	+++	-	+	-	-	-	-		-	
90	Penis	++		-	+	-	-	-	-		-	-
91	Penis	++		-	+	-	-	-	-		-	
101	Enddarm	-	-	-	-	-	++	-	-		-	
102	Enddarm	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	
103	Enddarm	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
104	Enddarm	-	-	-	-	-	++	-	-		-	
105	Enddarm	-	-	-	-	-	+					
106	Enddarm	-	-	-	-	-						
107	Enddarm	-	-	-	-	-	++	-	-			
108	Enddarm	-	-	-	-	-	+++	-	-	-		-
109	Enddarm	-	-	-	-	-	++	-	-			-
110	Enddarm	-	-	-	-	-	+++	-	-			
122	Harnröhre	-		-	+	+++	-		-		-	
123	Harnröhre	-	-	-	+	+++	+	+++	-		-	
125	Harnröhre	-	-	-	++	+++	+++	+++	-	-	-	
126	Harnröhre	-	-	-	+	+++		+	-			-
127	Harnröhre	-	-	-	+	+++	+++	+++	-	-		
128	Harnröhre	-	-	-	+	+++	+++	++	-			

Tabelle 2a: Einzelauswertung der histologischen Präparate; CK 1 -17

Lfd. Nr.	Gewebe	CK 18	CK 19	CK 20	CK 903	AE 1/3	CAM 5.2	Öst.
1	Haut							
2	Haut							
3	Haut	-	-	-	-	++	-	-
4	Haut	-	-	-	+++	++	-	-
5	Haut	-	-	-		+	-	
6	Haut	-	-	-	+++	+	-	-
7	Haut	-	-	-	+++	++	-	-
8	Haut	-	-	-	+++	++	-	-
9	Haut	-	-	-	+++	++	-	-
11	Haut							
12	Haut							
14	Haut	-	-	-	+++	++	-	-
15	Haut							
16	Haut	-	-	-	+++	+++	-	-
17	Haut	-	-	-	++	++	-	-
21	WS	-	-	-	++	+	-	-
22	WS	-	-	-	++	+	-	-
23	WS	-	-	-	++	+	-	-
24	WS							
25	WS	-	-	-	++	++	-	-
28	WS	-	-	-	++	+	-	-
29	WS	-	-	-	++	++	-	-
30	WS	-	-	-	+++	++	-	-
31	WS	-	-	-	++	+++	-	-
32	WS	-	-	-	+	++	-	-
42	Blase							-
43	Blase	++	+	-	+	+++	++	-
46	Blase	++	++	+	++	+++	++	-
48	Blase	+	++	-	+	+++	++	-
49	Blase	-		-				
50	Blase	-		-	+	+++	+	-
52	Harnleiter	+	++	-	+++	+++	+	-
53	Blase	-	+	-	+	+++	++	-
62	Vagina	-	-	-	+++	++	-	-
63	Vagina	-	-	-	++	+++	-	-
64	Vagina	-	-	-	++	++	-	-
65	Vagina	-	-	-	+++	++	-	-
66	Vagina	-	-	-	+++	++	-	-
67	Vagina	-	-	-	+++	+	-	-
68	Vagina	-	-	-	+++	++	-	-
69	Vagina	-	-	-	+++	+++	-	-
71	Vagina	-	-	-	+++	++	-	-

Lfd. Nr.	Gewebe	CK 18	CK 19	CK 20	CK 903	AE 1/3	CAM 5.2	Öst.
72	Vagina							
81	Penis	-	-	-	++	++	-	-
82	Penis	-	-	-	+++	++	-	-
83	Penis	-	-	-	++	+++	-	-
85	Penis	-	-	-	++	++	-	-
87	Penis	-	-	-	++	++	-	-
88	Penis	-	-	-	++	++	-	-
89	Penis	-	-	-	+++	++	-	-
90	Penis	-	-	-	++	++	-	-
91	Penis	-	-	-	+++	++	-	-
101	Enddarm	++	+	-	-	++	++	-
102	Enddarm	+++	+	++	-	+++	+++	-
103	Enddarm	+++	+	+	-	++	+++	-
104	Enddarm	++	-	-	-	++	++	-
105	Enddarm							
106	Enddarm							
107	Enddarm	+++	-	-	-	+	+++	-
108	Enddarm	+++	+	+	-	+++	+++	-
109	Enddarm	++	+	+	-	++	+++	-
110	Enddarm	++	+	+	-	+++	+++	-
122	Harnröhre	-	+	-	+++	+++	-	-
123	Harnröhre			-	+++	+++	+	-
125	Harnröhre	+	+	-	++	+++	++	-
126	Harnröhre	+	+	-	+++	+++	+	-
127	Harnröhre	+	+	-	++	+++	++	-
128	Harnröhre	++	++	-	+++	++	+++	-

Tabelle 2b: Einzelauswertung der histologischen Präparate; CK 18 – 20, Pancytokeratine 903, AE 1/3 und CAM 5.2 sowie Östrogenrezeptor

Mat.	Fixation	Zellzust.	Permeab.	Pos.	Demask.	Inkub. AK [h]	Inkub. HRP [h]	InCup
VA	INS	3	Tween	70	1	0,5	0,5	0
WS	INS	3	Tween	10	1	0,5	0,5	0
EP	INS	3	Tween	0	1	0,5	0,5	0
AA	INS	3	Tween	10	1	0,5	0,5	0
VA	INS	2	Tween	60	0	0,5	0,5	0
WS	INS	3	Tween	0	0	0,5	0,5	0
EP	INS	3	Tween	0	0	0,5	0,5	0
AA	INS	3	Tween	10	0	0,5	0,5	0
VA	CRR	2	Tween	70	1	0,5	0,5	0
WS	CRR	3	Tween	1	1	0,5	0,5	0
EP	CRR	3	Tween	0	1	0,5	0,5	0
AA	CRR	3	Tween	10	1	0,5	0,5	0
VA	CRR	2	Tween	40	0	0,5	0,5	0
WS	CRR	3	Tween	1	0	0,5	0,5	0
EP	CRR	3	Tween	0	0	0,5	0,5	0
AA	CRR	3	Tween	1	0	0,5	0,5	0
VA	INS	3	Tween	80	1	1	0,5	0
WS	INS	3	Tween	20	1	1	0,5	0
EP	INS	3	Tween	0	1	1	0,5	0
AA	INS	2	Tween	20	1	1	0,5	0
VA	INS	3	Tween	80	0	1	0,5	0
WS	INS	3	Tween	10	0	1	0,5	0
EP	INS	3	Tween	0	0	1	0,5	0
AA	INS	3	Tween	0	0	1	0,5	0
VA	CRR	2	Tween	60	1	1	0,5	0
WS	CRR	3	Tween	0	1	1	0,5	0
EP	CRR	3	Tween	0	1	1	0,5	0
AA	CRR	2	Tween	0	1	1	0,5	0
VA	CRR	2	Tween	50	0	1	0,5	0
WS	CRR	3	Tween	10	0	1	0,5	0
EP	CRR	3	Tween	0	0	1	0,5	0
AA	CRR	2	Tween	0	0	1	0,5	0
VA	CRR	3	Trypsin	80	1	1	0,5	0
WS	CRR	3	Trypsin	80	1	1	0,5	0
EP	CRR	3	Trypsin	0	1	1	0,5	0
AA	CRR	3	Trypsin	10	1	1	0,5	0
VA	CRR	3	Trypsin	50	0	1	0,5	0
WS	CRR	3	Trypsin	70	0	1	0,5	0
EP	CRR	3	Trypsin	0	0	1	0,5	0
AA	CRR	3	Trypsin	10	0	1	0,5	0
VA	INS	3	Trypsin	90	1	1	0,5	0
WS	INS	3	Trypsin	10	1	1	0,5	0
EP	INS	3	Trypsin	0	1	1	0,5	0

Mat.	Fixation	Zellzust.	Permeab.	Pos.	Demask.	Inkub. AK [h]	Inkub. HRP [h]	InCup
AA	INS	3	Trypsin	20	1	1	0,5	0
VA	INS	3	Trypsin	50	0	1	0,5	0
WS	INS	3	Trypsin	70	0	1	0,5	0
EP	INS	3	Trypsin	0	0	1	0,5	0
AA	INS	3	Trypsin	10	0	1	0,5	0
VA	CRR	3	Trypsin + Inh.	80	1	1	0,5	0
WS	CRR	3	Trypsin + Inh.	80	1	1	0,5	0
EP	CRR	3	Trypsin + Inh.	0	1	1	0,5	0
AA	CRR	3	Trypsin + Inh.	10	1	1	0,5	0
VA	CRR	3	Trypsin + Inh.	50	0	1	0,5	0
WS	CRR	3	Trypsin + Inh.	70	0	1	0,5	0
EP	CRR	3	Trypsin + Inh.	0	0	1	0,5	0
AA	CRR	3	Trypsin + Inh.	10	0	1	0,5	0
VA	INS	3	Trypsin + Inh.	90	1	1	0,5	0
WS	INS	3	Trypsin + Inh.	10	1	1	0,5	0
EP	INS	3	Trypsin + Inh.	0	1	1	0,5	0
AA	INS	3	Trypsin + Inh.	20	1	1	0,5	0
VA	INS	3	Trypsin + Inh.	50	0	1	0,5	0
WS	INS	3	Trypsin + Inh.	70	0	1	0,5	0
EP	INS	3	Trypsin + Inh.	0	0	1	0,5	0
AA	INS	3	Trypsin + Inh.	10	0	1	0,5	0
VA	CRR	3	Trypsin	10	1	1	0,5	0
WS	CRR	3	Trypsin	50	1	1	0,5	0
EP	CRR	3	Trypsin	0	1	1	0,5	0
VA	CRR F	3	Trypsin	70	1	1	0,5	0
WS	CRR F	3	Trypsin	90	1	1	0,5	0
EP	CRR F	3	Trypsin	0	1	1	0,5	0
VA	CRR	2	Trypsin	40	0	1	0,5	0
WS	CRR	3	Trypsin	40	0	1	0,5	0
EP	CRR	3	Trypsin	0	0	1	0,5	0
AA	CRR	3	Trypsin	10	0	1	0,5	0
VA	CRR F	2	SAP	20	0	1	0,5	0
EP	CRR F	3	SAP	0	1	1	0,5	0
VA	INS	3	Trypsin	30	1	1	0,5	0
WS	INS	3	Trypsin	10	1	1	0,5	0
EP	INS	3	Trypsin	0	1	1	0,5	0
VA	INS	3	Trypsin	0	0	1	0,5	0
WS	INS	3	Trypsin	0	0	1	0,5	0
EP	INS	3	Trypsin	0	0	1	0,5	0
VA	CRR	2	SAP	20	0	1	0,5	0
WS	CRR	3	SAP	10	0	1	0,5	0
EP	CRR	3	SAP	0	0	1	0,5	0
AA	CRR	3	SAP	1	0	1	0,5	0

Mat.	Fixation	Zellzust.	Permeab.	Pos.	Demask.	Inkub. AK [h]	Inkub. HRP [h]	InCup
VA	CRR	3	Digitonin	50	1	20	3	1
VA	CRR	3	Digitonin	40	1	20	3	1
WS	CRR	3	Digitonin	50	1	20	3	1
WS	CRR	3	Digitonin	60	1	20	3	1
ED	CRR	3	Digitonin	0	1	20	3	1
VA	CRR F	3	Digitonin	80	1	20	3	1
VA	CRR F	3	Digitonin	70	1	20	3	1
WS	CRR F	3	Digitonin	60	1	20	3	1
WS	CRR F	3	Digitonin	50	1	20	3	1
ED	CRR F	3	Digitonin	0	1	20	3	1
VA	CRR	3	Digitonin	50	0	20	3	1
VA	CRR	3	Digitonin	60	0	20	3	1
WS	CRR	3	Digitonin	50	0	20	3	1
WS	CRR	3	Digitonin	60	0	20	3	1
ED	CRR	3	Digitonin	0	0	20	3	1
VA	CRR F	2	Digitonin	40	0	20	3	1
VA	CRR F	2	Digitonin	50	0	20	3	1
WS	CRR F	3	Digitonin	50	0	20	3	1
WS	CRR F	3	Digitonin	50	0	20	3	1
WS	CRR F	3	Digitonin	40	0	20	3	1
ED	CRR F	3	Digitonin	0	0	20	3	1
VA	CRR	3	Digitonin	40	1	3	17	1
VA	CRR	3	Digitonin	50	1	3	17	1
WS	CRR	3	Digitonin	20	1	3	17	1
WS	CRR	3	Digitonin	30	1	3	17	1
ED	CRR	3	Digitonin	0	1	3	17	1
VA	CRR F	3	Digitonin	80	1	3	17	1
VA	CRR F	3	Digitonin	90	1	3	17	1
WS	CRR F	3	Digitonin	50	1	3	17	1
WS	CRR F	3	Digitonin	60	1	3	17	1
ED	CRR F	3	Digitonin	0	1	3	17	1
VA	CRR	2	Digitonin	40	0	3	17	1
VA	CRR	3	Digitonin	80	0	3	17	1
WS	CRR	3	Digitonin	40	0	3	17	1
WS	CRR	3	Digitonin	50	0	3	17	1
ED	CRR	3	Digitonin	0	0	3	17	1
VA	CRR F	2	Digitonin	70	0	3	17	1
VA	CRR F	2	Digitonin	70	0	3	17	1
WS	CRR F	3	Digitonin	40	0	3	17	1
ED	CRR F	3	Digitonin	0	0	3	17	1
EP	CRR	1	Trypsin	0	1	1	0,5	0
WS	CRR	1	Trypsin	90	1	1	0,5	0
VA	CRR	2	Trypsin	100	1	1	0,5	0

Mat.	Fixation	Zellzust.	Permeab.	Pos.	Demask.	Inkub. AK [h]	Inkub. HRP [h]	InCup
VA	CRR	1	Trypsin	100	1	1	0,5	0
EP	CRR	1	Trypsin 10'	0	1	1	0,5	0
WS	CRR	1	Trypsin 10'	100	1	1	0,5	0
VA	CRR	1	Trypsin 10'	90	1	1	0,5	0
VA	CRR	1	Trypsin 10'	100	1	1	0,5	0
EP	CRR F	1	Trypsin	0	1	1	0,5	0
WS	CRR F	2	Trypsin	80	1	1	0,5	0
VA	CRR F	2	Trypsin	100	1	1	0,5	0
VA	CRR F	1	Trypsin	100	1	1	0,5	0
EP	CRR F	1	Trypsin 10'	0	1	1	0,5	0
WS	CRR F	1	Trypsin 10'	90	1	1	0,5	0
VA	CRR F	1	Trypsin 10'	100	1	1	0,5	0
VA	CRR F	1	Trypsin 10'	100	1	1	0,5	0
WS	CRR	3	Digitonin	20	1	1	0,5	0
WS	CRR F	3	Digitonin	30	1	1	0,5	0
VA	CRR	3	Digitonin	30	1	1	0,5	0
VA	CRR F	2	Digitonin	20	1	1	0,5	0
EP	CRR	3	Digitonin	10	1	1	0,5	0
EP	CRR F	3	Digitonin	0	1	1	0,5	0
WS	CRR	3	Digitonin	100	1	3	17	0
WS	CRR F	3	Digitonin	92	1	3	17	0
VA	CRR	2	Digitonin	70	1	3	17	0
VA	CRR F	3	Digitonin	50	1	3	17	0
EP	CRR	2	Digitonin	10	1	3	17	0
EP	CRR F	3	Digitonin	0	1	3	17	0

Tabelle 3: Vorversuche Permeabilisierung Cytokeratin 4

Mat.	Pers.	Fix.	Permeab.	AK	HRP	Chromogen	Pos	Zellzust.	Neg	Zellzust.
EP	4	CRR	Trypsin 5'	1 h	pur 30'	DAB+ pur 5'	0	+++	-	+++
WS	4	CRR	Trypsin 5'	1 h	pur 30'	DAB+ pur 5'	3	+++	-	+++
VA	4	CRR	Trypsin 5'	1 h	pur 30'	DAB+ pur 5'	10	+++	-	+++
EP	1	CRR	Trypsin 5'	2 h	pur 30'	DAB+ pur 8'	0	+++	-	++
WS	1	CRR	Trypsin 5'	2 h	pur 30'	DAB+ pur 8'	10	+++	-	+++
PA	1	CRR	Trypsin 5'	2 h	pur 30'	DAB+ pur 8'	0	++	-	++
EP	2	CRR	Trypsin 5'	2 h	pur 30'	DAB+ pur 8'	0	++	-	++
WS	2	CRR	Trypsin 5'	2 h	pur 30'	DAB+ pur 8'	10	++	+	+
PA	2	CRR	Trypsin 5'	2 h	pur 30'	DAB+ pur 8'	3	+	-	+
AA	2	CRR	Trypsin 5'	2 h	pur 30'	DAB+ pur 8'	3	++	-	++
EP	4	CRR	Trypsin 5'	2 h	pur 30'	DAB+ pur 8'	0	++	-	++
WS	4	CRR	Trypsin 5'	2 h	pur 30'	DAB+ pur 8'	10	++	-	+

Mat.	Pers.	Fix.	Permeab.	AK	HRP	Chromogen	Pos	Zellzust.	Neg	Zellzust.
VA	4	CRR	Trypsin 5'	2 h	pur 30'	DAB+ pur 8'	10	++	-	++
EP	9	CRR	Trypsin 5'	2 h	pur 30'	DAB+ pur 8'	0	++	-	++
WS	9	CRR	Trypsin 5'	2 h	pur 30'	DAB+ pur 8'	10	+++	-	+++
VA	9	CRR	Trypsin 5'	2 h	pur 30'	DAB+ pur 8'	10	++	-	++
AA	9	CRR	Trypsin 5'	2 h	pur 30'	DAB+ pur 8'	9	++	-	++
EP	4	CRR	Trypsin 5'	30'	pur 30'	DAB+ pur 5'	0	++	-	+
WS	4	CRR	Trypsin 5'	30'	pur 30'	DAB+ pur 5'	1	++	-	++
VA	4	CRR	Trypsin 5'	30'	pur 30'	DAB+ pur 5'	6	++	-	++
EP	6	CRR	Trypsin 5'	30'	pur 30'	DAB+ pur 5'	0	++	-	++
WS	6	CRR	Trypsin 5'	30'	pur 30'	DAB+ pur 5'	1	+++	-	+++
VA	6	CRR	Trypsin 5'	30'	pur 30'	DAB+ pur 5'	7	++	-	++
WS	9	CRR	Trypsin 5'	15'	pur 30'	DAB+ pur 5'	7	+++	-	+++
VA	9	CRR	Trypsin 5'	15'	pur 30'	DAB+ pur 5'	8	+++	-	+++
EP	2	CRR	Trypsin 5'	70'	pur 30'	DAB+ pur 5'	0,5	+++	-	+++
WS	2	CRR	Trypsin 5'	70'	pur 30'	DAB+ pur 5'	9	+++	-	++
PA	2	CRR	Trypsin 5'	70'	pur 30'	DAB+ pur 5'	3	+	-	+
EP	3	CRR	Trypsin 5'	70'	pur 30'	DAB+ pur 5'	1	++	-	++
WS	3	CRR	Trypsin 5'	70'	pur 30'	DAB+ pur 5'	8	+++	-	+
PA	3	CRR	Trypsin 5'	70'	pur 30'	DAB+ pur 5'	4	+	-	+
EP	16	CRR	Trypsin 5'	70'	pur 30'	DAB+ pur 5'	1	+	-	++
WS	16	CRR	Trypsin 5'	70'	pur 30'	DAB+ pur 5'	10	+++	-	++
VA	16	CRR	Trypsin 5'	70'	pur 30'	DAB+ pur 5'	9	++	-	+
EP	4	CRR	Trypsin 5'	50'	pur 30'	DAB+ pur 5'	0	+	-	++
WS	4	CRR	Trypsin 5'	50'	pur 30'	DAB+ pur 5'	8	+++	-	+++
VA	4	CRR	Trypsin 5'	50'	pur 30'	DAB+ pur 5'	8	++	-	++
EP	4	CRR	Trypsin 5'	50'	pur 30'	DAB+ pur 5'	0	++	-	++
WS	4	CRR	Trypsin 5'	50'	pur 30'	DAB+ pur 5'	7	+++	+	+++
VA	4	CRR	Trypsin 5'	50'	pur 30'	DAB+ pur 5'	7	++	-	++
EP	15	CRR	Trypsin 5'	50'	pur 30'	DAB+ pur 5'	0	+	-	+
WS	15	CRR	Trypsin 5'	50'	pur 30'	DAB+ pur 5'	8	+++	-	++
PA	15	CRR	Trypsin 5'	50'	pur 30'	DAB+ pur 5'	6	++	-	+
WS	9	CRR	Tween	30'	Tween	DAB+ pur 5'	0	+++	-	+++
VA	9	CRR	Tween	30'	Tween	DAB+ pur 5'	1	+++	-	+++
WS	9	CRR	Tween	1 h	Tween	DAB+ pur 5'	0,5	+++	-	+++
VA	9	CRR	Tween	1 h	Tween	DAB+ pur 5'	3	+++	-	+++

Tabelle 4: Übersicht Vorversuche Cytokeratin 13

<i>Mat.</i>	<i>Pers.</i>	CRR		Luft		EtOH	
		<i>pos</i>	<i>Zell.</i>	<i>pos</i>	<i>Zell.</i>	<i>pos</i>	<i>Zell.</i>
EP	P1	0	+++	0	+++	0	+++
WS	P1	1	+++	7	++	6	++
PA	P1	0	+++	0	++	0	+++
AA	P1	3	++	0	++	0	++
EP	P2	0	+++	0	+++	0	+++
WS	P2	1	+++	8	++	1	++
PA	P2	0	+++	0	+++	0	+++
AA	P2	1	+++	1	+++	0	+++
EP	P3	0	+++	0	++	0	+++
WS	P3	0	+++	3	+++	5	++
PA	P3	0	+++	0	++	0	+++
AA	P3	0	-	4	++	5	++
EP	P4	0	+++	0	++	0	+++
WS	P4	0,5	+++	4	+++	3	+++
VA	P4	10	++	10	+	10	++
EP	P6	0	+++	0	++	0	++
WS	P6	0,5	++	6	+++	1	+++
VA	P6	3	+++	5	+	3	++
AA	P6	1	+++	8	++	2	
EP	P8	0	+++	0	++	0	++
WS	P8	0	+++	8	++	3	+++
VA	P8	8	+++	9	+++	8	++
AA	P8	1	+++	9	+	8	++
EP	P9	0	+++	0	+	0	++
WS	P9	0,5	+++	9	+++	5	+++
VA	P9	5	+++	9	++	9	+++
AA	P9	1	+++	4	++	2	++
EP	P11	0	+++	0	+++	0	+++
WS	P11	1	+++	3	+++	1	+++
VA	P11	3	++	8	+++	4	++
AA	P11	1	++	8	+++	6	++
EP	P14	0	+++	0	+++	0	+++
WS	P14	3	+++	6	++	4	+++
VA	P14	8	++	6	++	3	++
AA	P14	1	-	2	++	1	++
EP	P15	0	+++				
WS	P15	0	++				
PA	P15	0	+++				
AA	P15	0	+++				
EP	P16	0	+++	0	+++	0	+++
WS	P16	3	++	4	++	2	+++
VA	P16	8	+++	8	++	6	+++
AA	P16	0	-	1	++	1	++

Tab. 5: Ergebnisübersicht der immunocytochemischen Anfärbung von Cytokeratin 4; Permeabilisierung mit Tween 20

Mat.	Pers.	CRR		Luft		EtOH		Mat.	Pers.	CRR	
		pos	Zell.	pos	Zell.	pos	Zell.			pos	Zell.
AA	P1	0	+	1	+	1	++	EP	P16	0	++
EP	P1	0	+	0	++	0	++	WS	P16	8	+++
PA	P1	0	+	0	+	0	+++	VA	P16	9	++
WS	P1	8	++	9	+++	7	+++	AA	P16	0	++
AA	P2	0	+++	0	+++	0	+++	PA	P19	0	++
EP	P2	0	+++	0	+++	0	+++	PA	P32	0	++
PA	P2	0	++	0,5	++	0,5	+++	PA	P36	0	++
WS	P2	10	+++	10	++	10	+++	VA	P34	10	+++
AA	P3	6	++	6	++	6	+	VA	P18	9	++
EP	P3	0	++	0	++	0	++	VA	P30	9	+++
PA	P3	0	+++	0,5	+++	0,5	+++				
WS	P3	8	++	8	+	8	++				
EP	P4	0	+++	0	+++	0	+++				
WS	P4	10	++	8	++	8	+++				
VA	P4	10	+++	10	+	10	+				
VA	P6	8	++	7	++	6	++				
EP	P6	0	++	0	++	0	++				
WS	P6	9	++	7	++	8	+++				
AA	P6	6	+++	7	++	8	++				
AA	P14	10	+++	4	++	5	++				
EP	P14	0	+++	0	++	0	+++				
VA	P14	9	++	10	+	10	+				
WS	P14	6	+++	8	++	8	+++				
VA	P8	8	+	10	++	10	++				
EP	P8	0	++	0	+	0	++				
WS	P8	7	++	8	++	9	++				
AA	P8	0	++	9	++	10	++				
VA	P9	9	++	9	+	10	+				
EP	P9	0	++	0	++	0	++				
WS	P9	10	++	9	++	9	++				
AA	P9	0	+	0	+	6	+				
VA	P11	8	+++	10	++	10	++				
EP	P11	0	++	0	++	0	++				
WS	P11	7	+++	7	+++	8	+++				
AA	P11	6	+	8	+	5	++				
PA	P15	0	++	0	++	1	++				
EP	P15	0	++	0	++	0	+++				
WS	P15	10	++	9	++	9	++				
AA	P15	2	+	2	+	2	++				

Tabelle 6: Ergebnisübersicht der immuncytochemischen Anfärbung von Cytokeratin 4; Permeabilisierung mit Trypsin

<i>Mat.</i>	<i>Pers.</i>	CRR		nativ		EtOH	
		<i>pos</i>	<i>Zell.</i>	<i>pos</i>	<i>Zell.</i>	<i>pos</i>	<i>Zell.</i>
PA	1	10	+++	0	+++	0	+++
WS	1	35	+++	70	+++	60	+++
Epi	1	0	+++	0	+++	0	+++
Anal	1	10	+++	0	+++	0	+++
PA	2	0	+++	0	+++	0	+++
WS	2	50	+++	50	+++	40	+++
EP	2	0	+++	0	+++	0	+++
Anal	2	0	+++	10	+++	0	+++
PA	3	0	+++	0	+++	0	+++
WS	3	40	+++	60	+++	50	+++
EP	3	0	+++	0	+++	0	+++
Anal	3	0	+++	50	+++	50	+++
VA	4	100	+++	95	+++	90	+++
WS	4	40	+++	55	+++	50	+++
EP	4	0	+++	0	+++	0	+++
VA	6	85	+++	80	+++	80	+++
WS	6	6	+++	80	+++	80	+++
EP	6	0	+++	0	+++	0	+++
Anal	6	55	+++	55	+++	25	+++
VA	8	80	+++	90	+++	100	+++
WS	8	50	+++	95	+++	90	+++
EP	8	0	+++	10	+++	0	+++
Anal	8	70	+++	55	+++	10	+++
VA	9	100	+++	95	+++	100	+++
WS	9	50	++	95	+++	65	+++
EP	9	0	+++	0	+++	0	+++
Anal	9	15	+++	0	+++	0	+++
VA	14	80	++	90	++	80	++
WS	14	20	+++	50	+++	40	+++
EP	14	0	+++	0	+++	0	+++
Anal	14	0	+++	0	+++	0	+++

Tabelle 7: Ergebnisübersicht der immuncytochemischen Anfärbung von Cytokeratin 4; Permeabilisierung mit Digitonin

Zyklustag	Person 4			Person 5			Person 6			Person 10		
	LZ	ZZ	Pos.	LZ	ZZ	Pos.	LZ	ZZ	Pos.	LZ	ZZ	Pos.
1	235	2	90	79	1	90	322	3	89	274	1	70
3	233	2	100	77	2	90	319	2	70	272	2	50
5	231	1	90	75	1	90	317	2	80	270	2	40
7	229	2	90	73	1	90	315	3	100	268	2	70
9	227	2	90	71	1	90	311	3	100	266	3	80
11	225	2	90	69	1	90	308	3	100	264	2	50
13	223	2	90	67	2	90	306	3	100	262	3	40
15	221	2	90	58	2	90	303	2	90	260	2	40
17	219	3	100	55	1	90	301	2	80	258	2	40
19	218	3	100	53	2	90	298	2	60	256	3	50
21	216	2	100	43	2	90	295	2	70	254	2	50
23	214	2	90	41	2	90	293	3	90	252	1	60
25	212	1	90	39	2	91	290	2	100	250	1	30
27	210	3	90	37	1	93	288	2	90	248	2	60

Tabelle 8: Immuncytochemische Anfärbung von Cytokeratin 4 an Vaginalabstrichen im Verlauf des weiblichen Zyklus

Lfd. Nr.	Mat.	Kontakt	Zeit pk	pos	Zell.
M 1/1	PA	vaginal	6	20	+++
M 1/2	PA	vaginal	12	10	+++
M 1/3	PA	vaginal	24	10	+++
M 2/1	PA	vaginal	12	10	++
M 2/2	VA	Penis	12	90	++
M 3/3	PA	vaginal	12	10	+
M 3/1	PA	vaginal	0	20	++
M 3/2	PA	vaginal	6	10	++
M 4/1	PA	vaginal	6	10	++
M 4/2	PA *	vaginal	6	20	++
M 5/1	PA	vaginal	0	10	++
M 5/2	PA	vaginal	7	20	++
M 6/1	VA	Penis	0,25	90	++
M 7	PA	vaginal	8	30	+++
M 8	PA	vaginal	unbekannt	50	++
M 8 x	PA	vaginal	unbekannt	50	++
M 9	PA	vaginal	0		-
M 12	PA	vaginal	0	10	++
M 13	PA	vaginal	0	80	++
M14/1	PA	vaginal	0,5	80	+++
M14/2	PA	vaginal	1	60	+++
M15/2	PA	vaginal	2	10	+++
M15/3	PA	vaginal	8*	-	-
M 16	PA	Sperma.	0	-	-
M 18/1	PA	VA	0	10	+

Lfd. Nr.	Mat.	Kontakt	Zeit pk	pos	Zell.
M 18/2	PA	VA	1*		-
M 18/3	PA	VA	3*	10	++
M 19/1	VA	Penis	0,5	60	++
M 19/2	VA	Penis	2*	30	++
M 19/3	VA	Penis	8*	-	-
M 20/3	LH	WS	unbekannt	50	+++
M 20/4	WS	LH	unbekannt	90	+++
M 21/1	VA	PA	1	80	+++
M 21/3	VA	PA	2	90	+++
M 21/2	PA	VA	1	10	+++
M 21/4	PA	VA	12	30	+++
M 22	PA	vaginal	0,5	80	+++
M 23/1	PA	vaginal	0	0	+++
M 23/2	PA	vaginal	6	10	+++
M11	PA	vaginal	2	20	+++
M10	FB	vaginal	2	10	++
M24/1	VA	Penis	0,5	90	+++
M24/2	VA	Penis	3*	90	+++
M24/3	VA	Penis	7*	80	++
M24/6	PA	vaginal	0,5	60	+++
M24/8	PA	vaginal	7*	10	+++
M24/9	PA	vaginal	30**	10	++
M 25 LC 10 (Max)	FB	vaginal	2	10	++
M 26			unbekannt	10	+++
M 27			unbekannt	10	+++
M 28	VA	Penis	2	90	+++
M 29	PA	vaginal	24	10	+++
M 30	FH	WS	0	10	++
M 31	WS	FH	0	80	+++
M 32	PE	VA	0	50	++
M 33	LH	AA	0	10	++
M 34	AA	LH	0	60	+++
M 35	WS	LH	0	90	++
M36	LH	WS	0	80	++
M 37/ 1	LH	PE	0	0	+++
M 37/ 2	PE	LH	0	0	-
M 38	PE	VA	0	10	+++
M 39	PE	WS	6	10	+++
M 40	PE	WS	0	80	+++
M 41/ 1	PE	WS	2	<5	+
M 41/ 2	PE	WS	4	<10	++
M 41/ 3	PE	WS	12	<10	++
M 41/ 4	PE	WS	24	<5	++
M 42	PE	VA	0	40	+++

Tabelle 9: Immuncytochemische Anfärbung von Cytokeratin 4 an postkoitalen Abstrichen

Material	Liegezeit	Zellzust.	Pos
AA	241	2	10
AA	266	2	20
AA	296	2	60
AA	246	2	60
AA	194	3	0
EP	284	3	0
EP	241	2	0
EP	240	3	0
EP	266	3	0
EP	192	2	0
EP	296	3	0
EP	277	2	0
PA	243	2	0
PA	240	2	0
PA	192	3	5
PA	277	3	0
PA	246	1	0
VA	194	2	8
VA	194	2	8
VA	194	2	100
VA	249	2	90
VA	189	2	10
VA	200	3	90
VA	202	3	90
VA	206	1	80
VA	296	3	90
VA	184	1	80
VA	198	2	90
WS	206	2	60
WS	296	3	90
WS	194	2	70
WS	626	3	100
WS	200	3	90
WS	202	1	60
UT	296	1	0
UT	277	1	0
UT	246	1	0

Tab. 10: Ergebnisse der immuncytochemischen Anfärbung von Cytokeratin 4 nach langer Liegezeit.

	relative Expression	Standardabweichung vom Mittelwert
LH	0,00034951	0,000709035
VA	78,5664594	34,38327366
BL	56100,658	125444,8842
AA	42551,6917	95135,8237
FT	0,00142908	0,00145409
PE	0,00634651	0,013107472
WS	9875,66013	12555,53632
HI	908941,385	1257414,628
LB	263587,344	18419,85675
HE	13,8678633	0

Tabelle 11: relative Expression von Cytokeratin 4-mRNA zu Cytokeratin 10-mRNA in Gewebebiopsien

7.2 Anhang II - Abbildungen

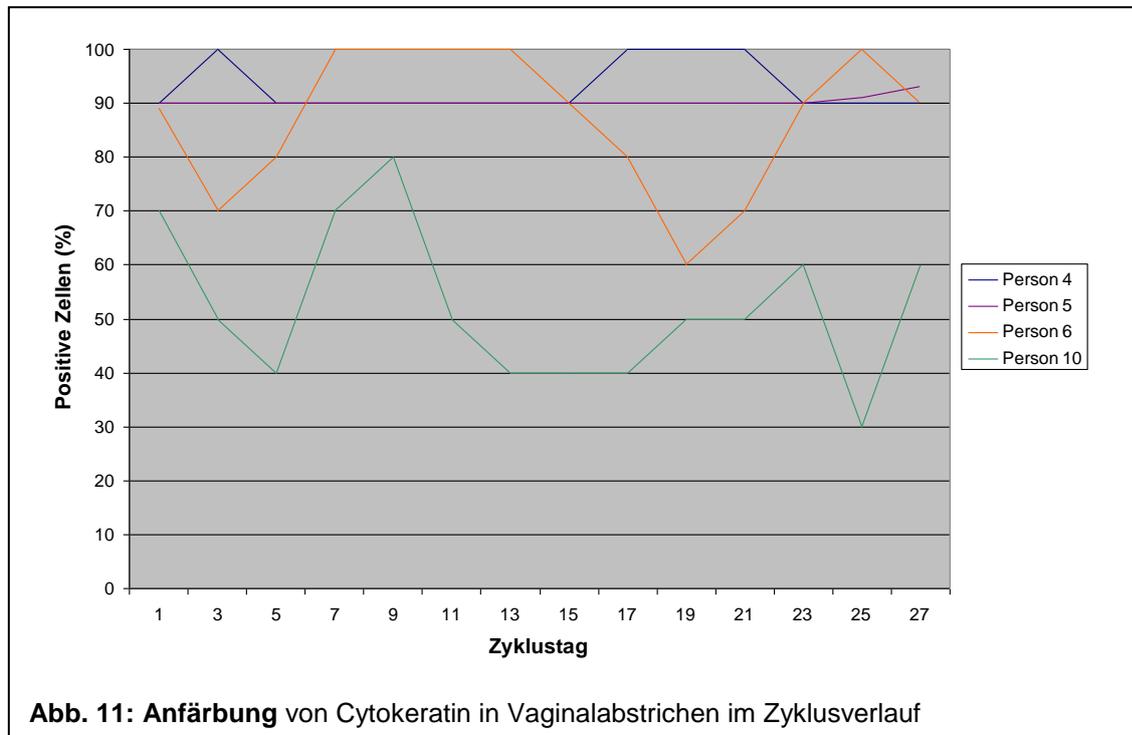
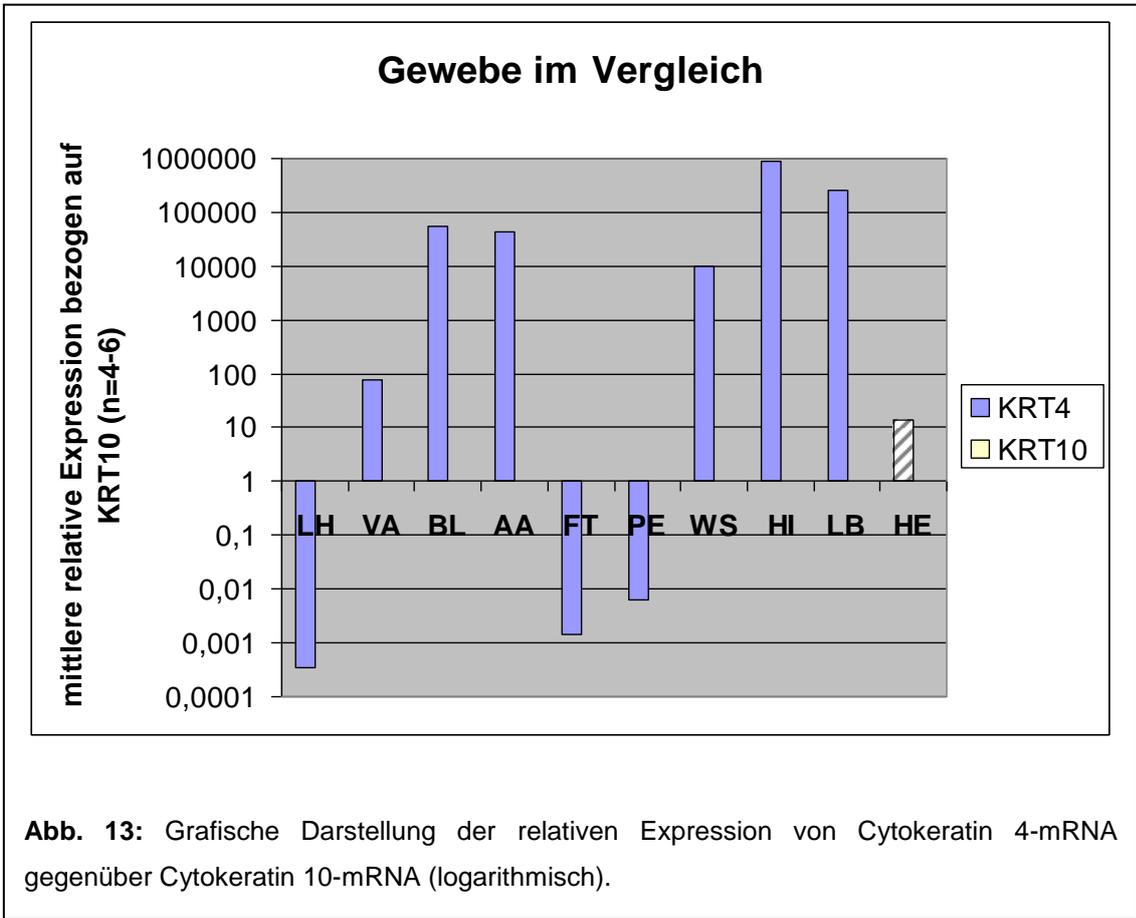
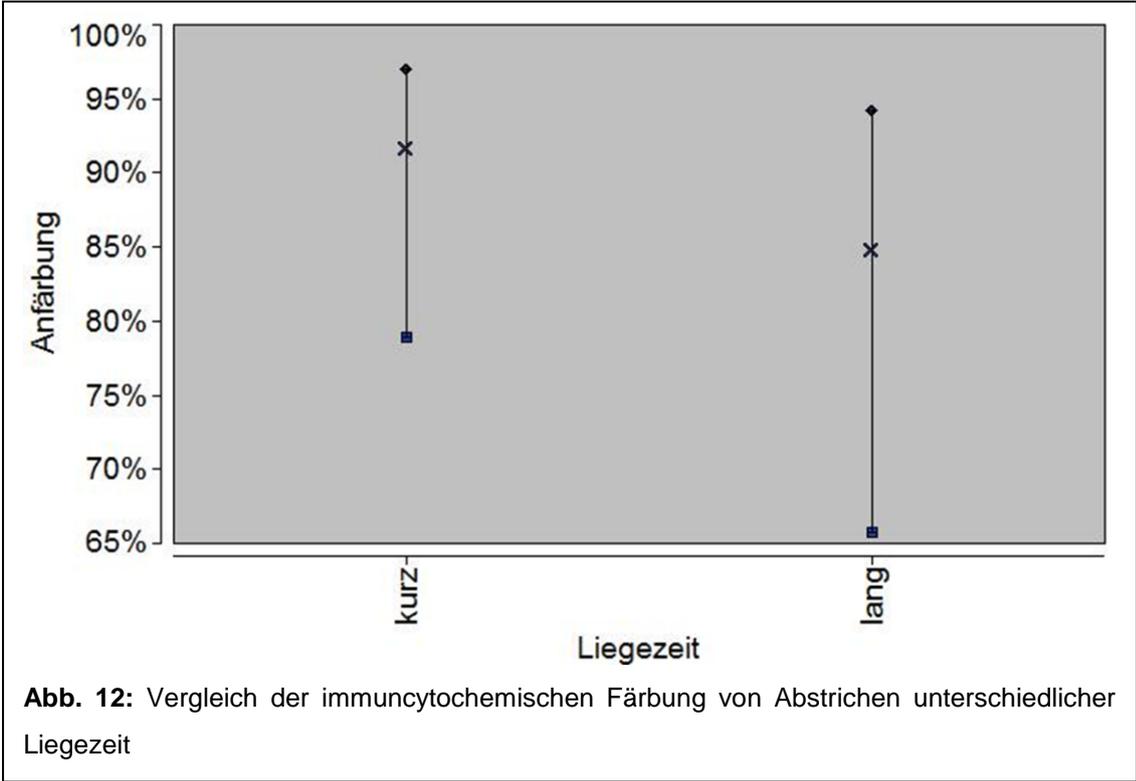


Abb. 11: Anfärbung von Cytokeratin in Vaginalabstrichen im Zyklusverlauf



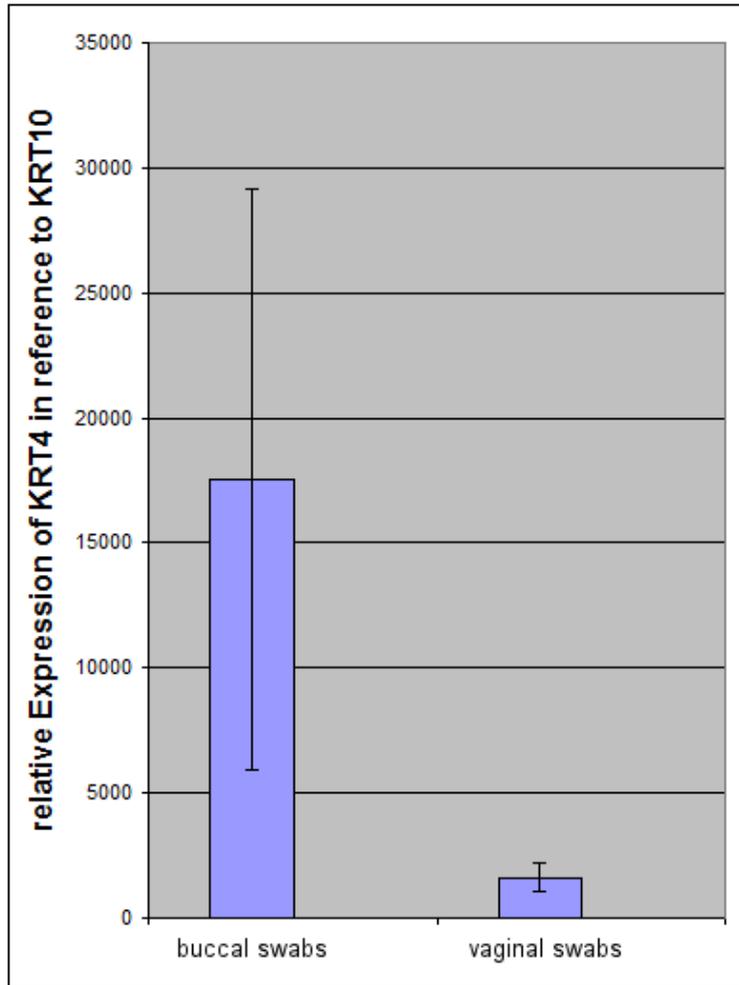


Abb. 14: relative Expression von Cytokeratin 4-mRNA im Verhältnis zu Cytokeratin 10-mRNA für Wangen- und Vaginalschleimhaut

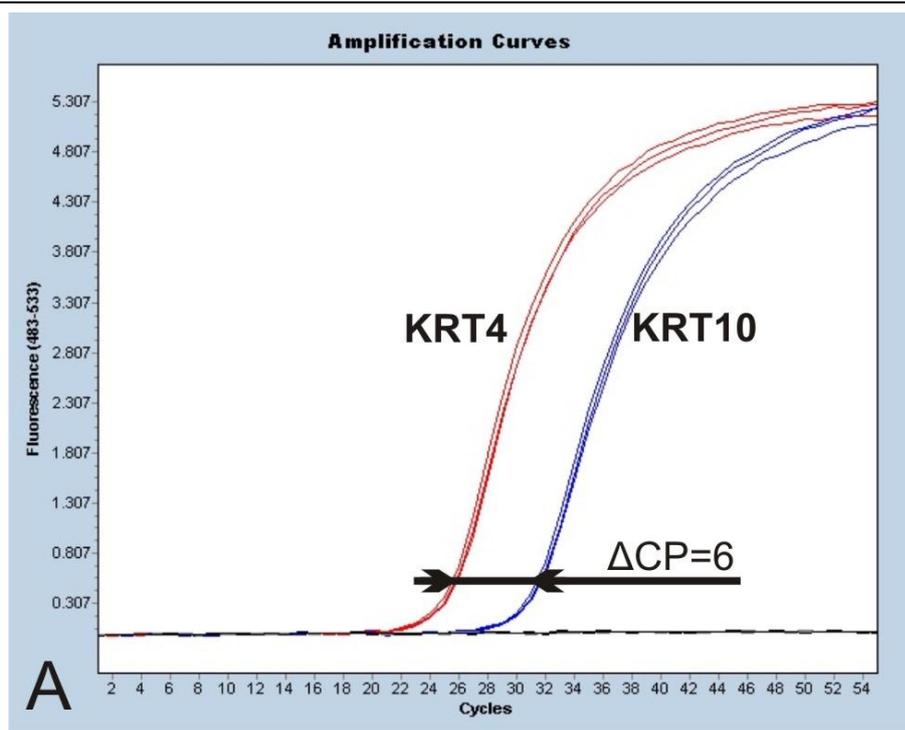


Abb.15a: Amplifikationskurven Cytokeratin 4 und 10, Vaginalschleimhaut

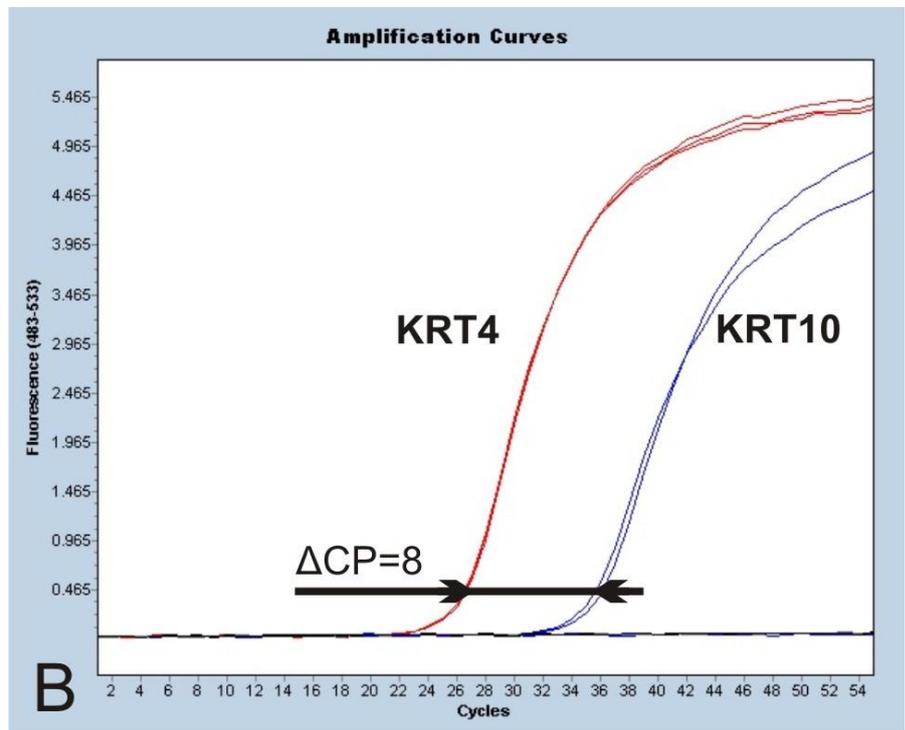


Abb.15b: Amplifikationskurven Cytokeratin 4 und 10, Wangenschleimhaut

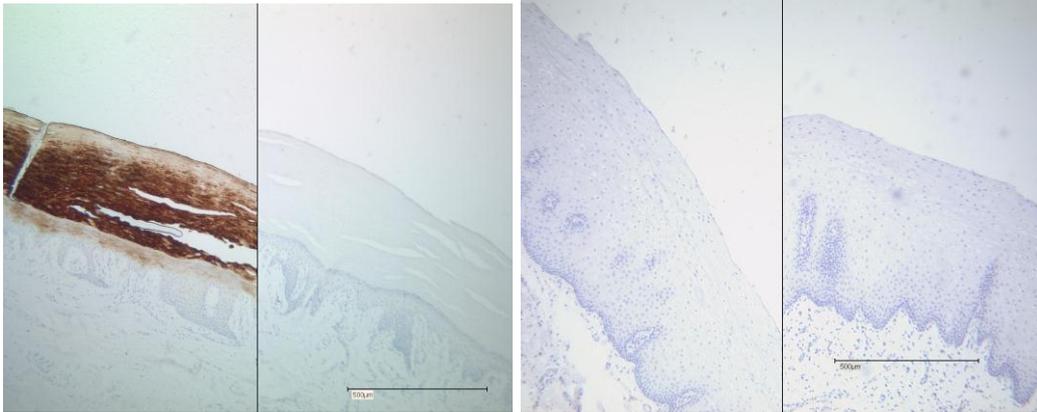


Abb. 16a und b: Cytokeratin 2e; Fingerbeere (1/16) und Wangenschleimhaut (1/30)

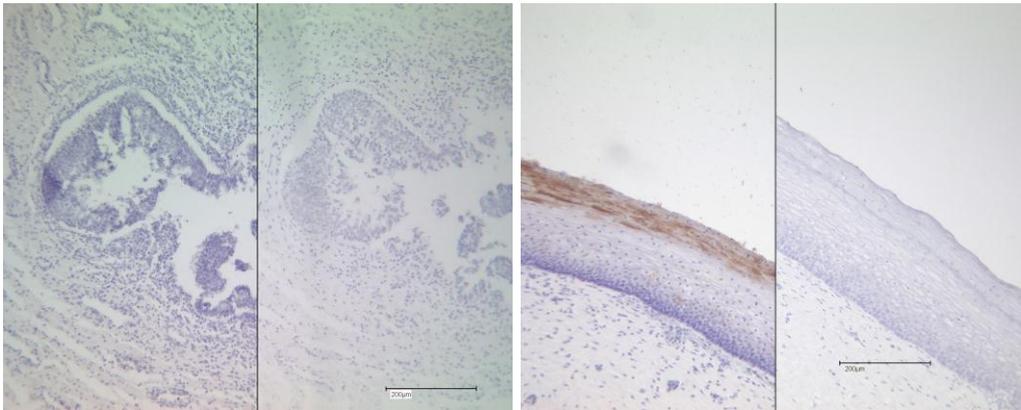


Abb. 16c und d: Cytokeratin 2e; Urothel (1/127) und Vaginalschleimhaut (1/64)

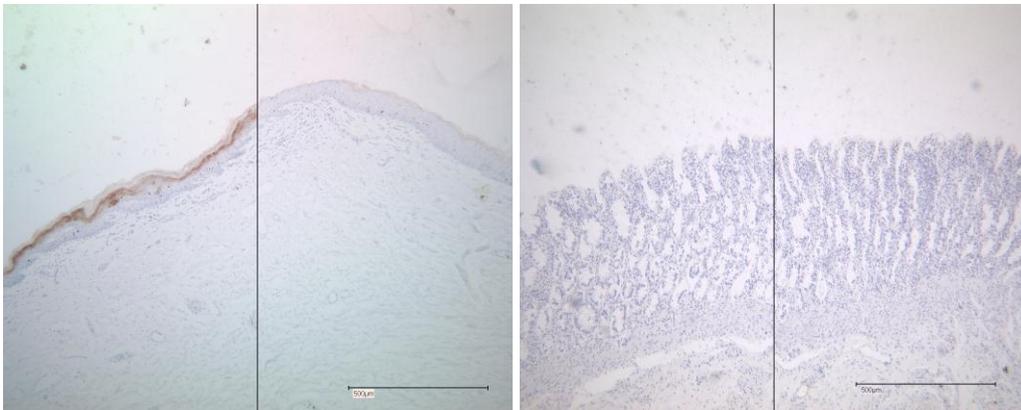


Abb. 16e und f: Cytokeratin 2e; Glans penis (1/91) und Darmepithel (1/107)

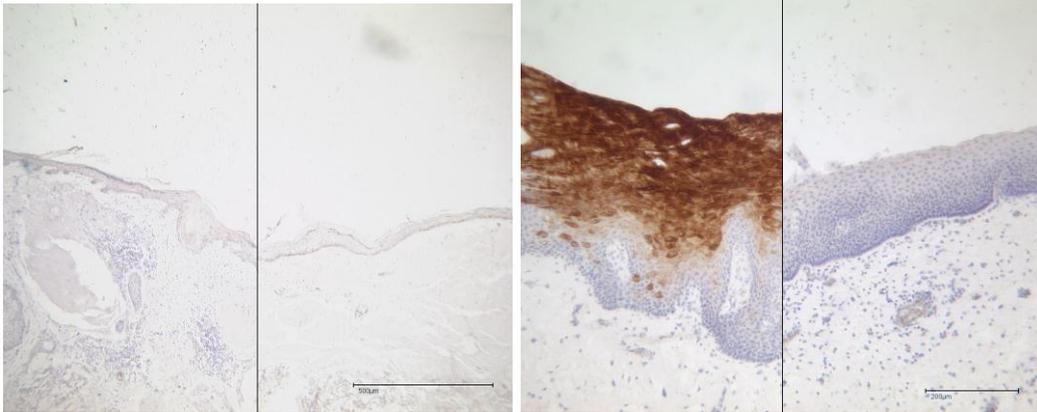


Abb. 17a und b: Cytokeratin 4; Felderhaut (1/9) und Wangenschleimhaut (1/22)

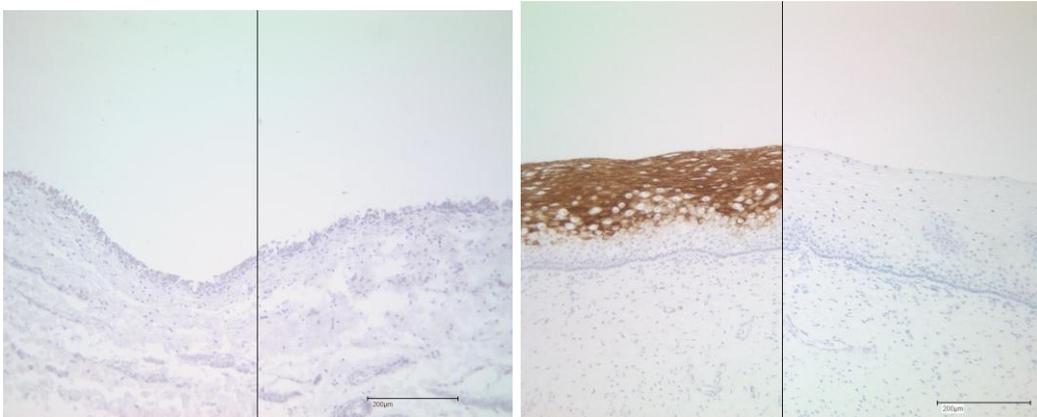


Abb. 17c und d: Cytokeratin 4; Urothel (1/53) und Vaginalschleimhaut (1/65)

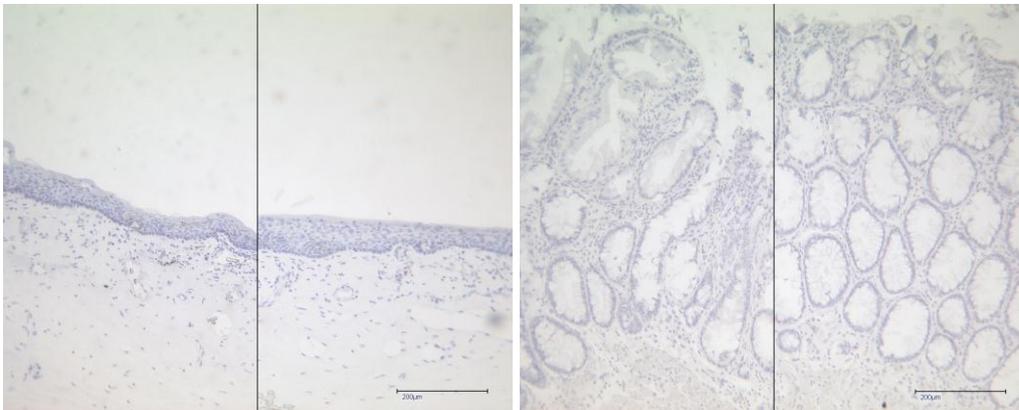


Abb. 17e und f: Cytokeratin 4; Glans penis (1/90) und Darmepithel (1/102)

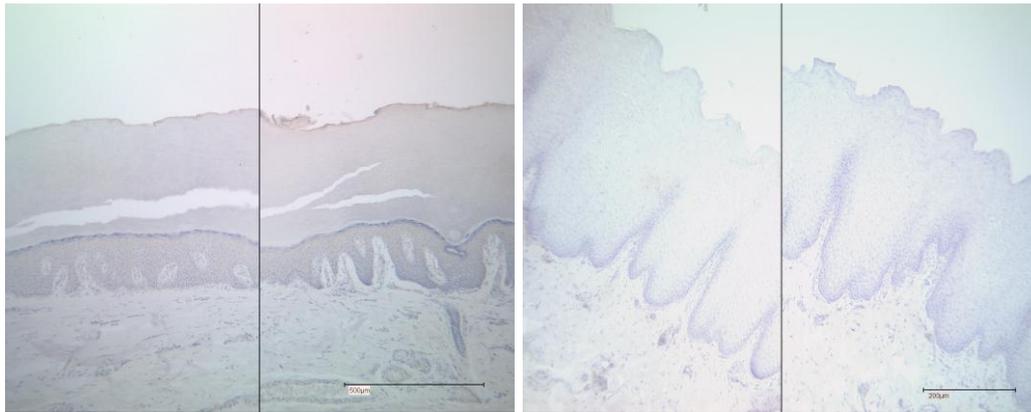


Abb. 18a und b: Cytokeratin 7; Fingerbeere (1/17) und Wangenschleimhaut (1/21)

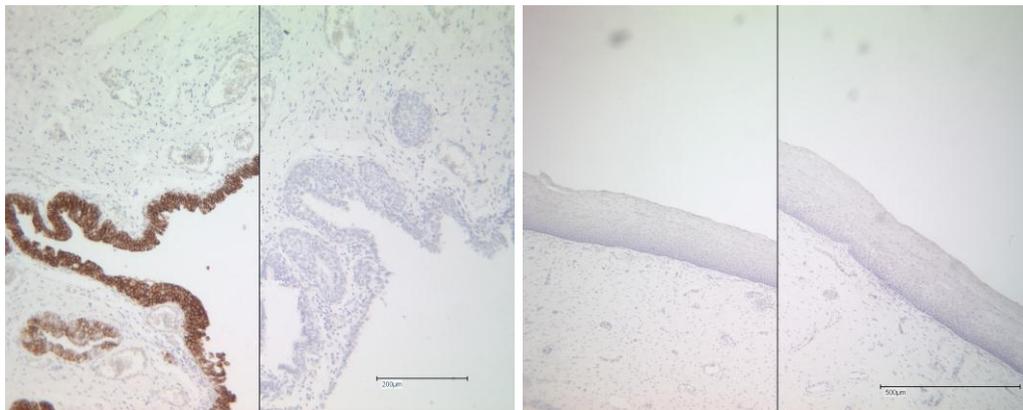


Abb. 18c und d: Cytokeratin 7; Urothel (1/125) und Vaginalschleimhaut (1/64)

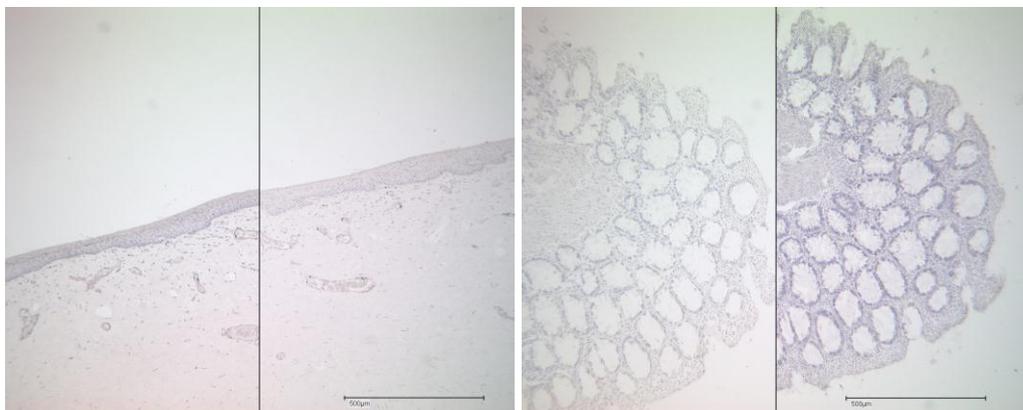


Abb. 18e und f: Cytokeratin 7; Glans penis (1/91) und Darmepithel (1/108)

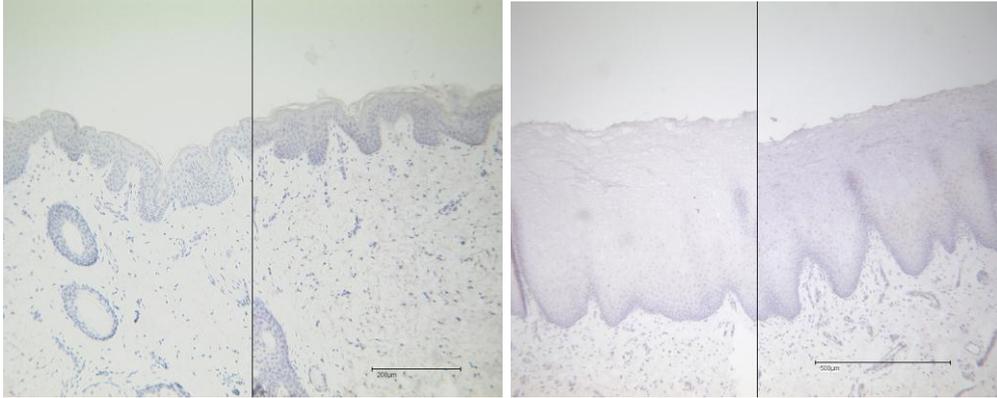


Abb. 19a und b: Cytokeratin 8; Felderhaut (1/8) und Wangenschleimhaut (1/30)

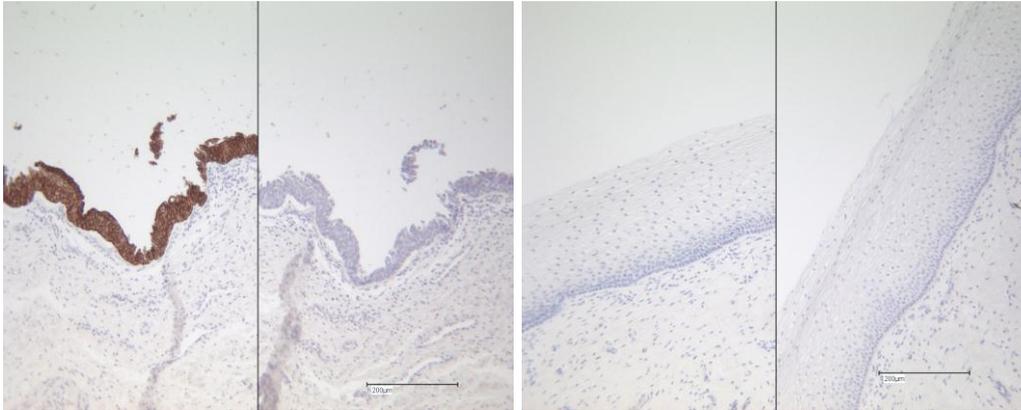


Abb. 19c und d: Cytokeratin 8; Urothel (1/127) und Vaginalschleimhaut (1/67)

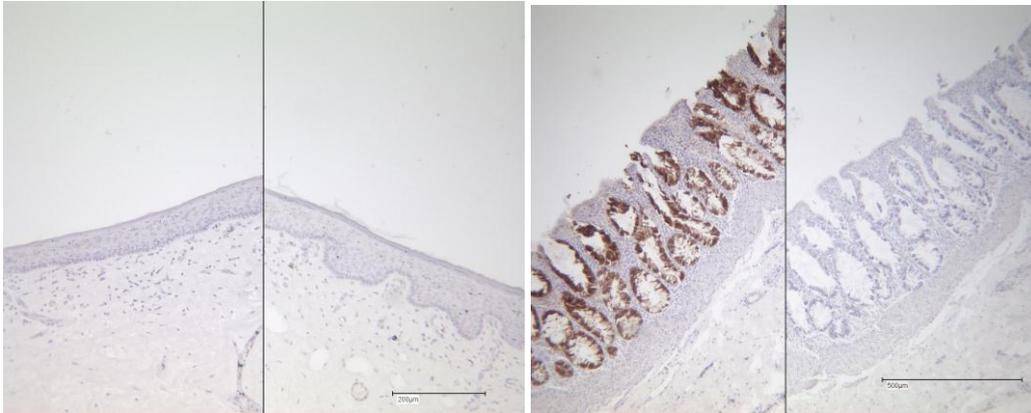


Abb. 19e und f: Cytokeratin 8; Glans penis (1/90) und Darmepithel (1/108)

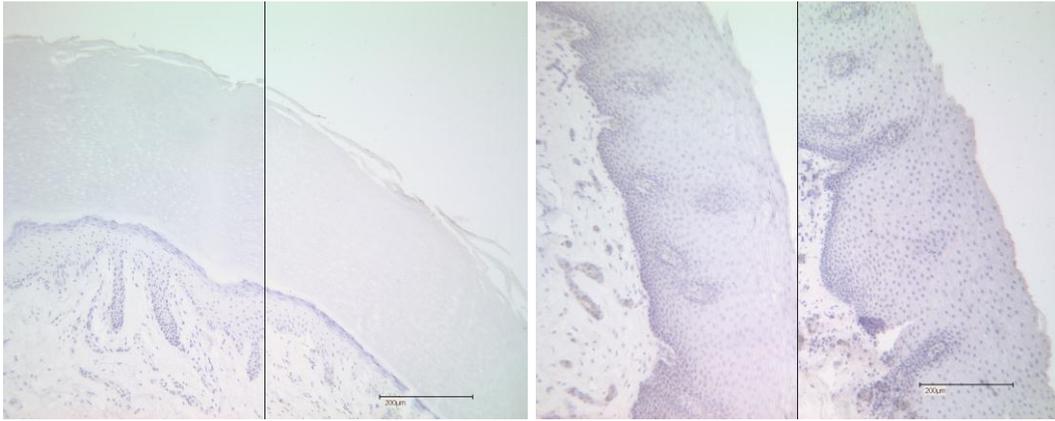


Abb. 20a und b: Cytokeratin 15; Felderhaut (1/3) und Wangenschleimhaut (1/22)

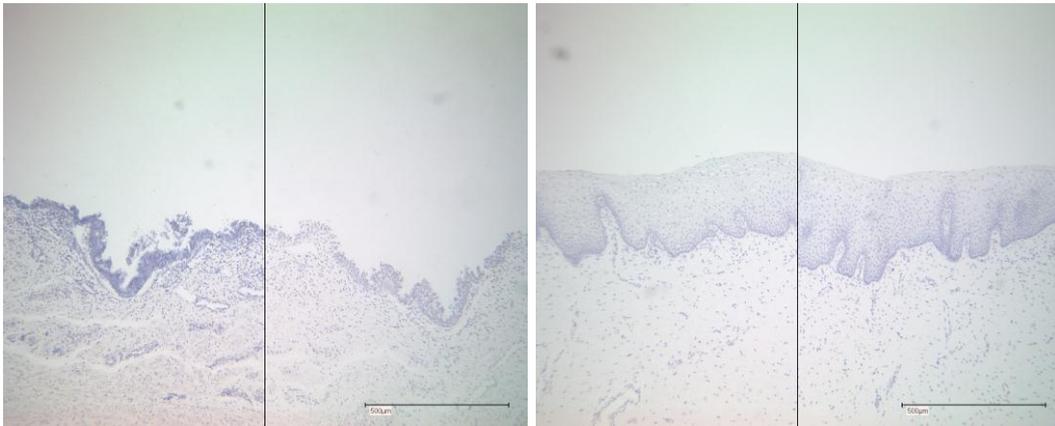


Abb. 20c und d: Cytokeratin 15; Urothel (1/127) und Vaginalschleimhaut (1/62)

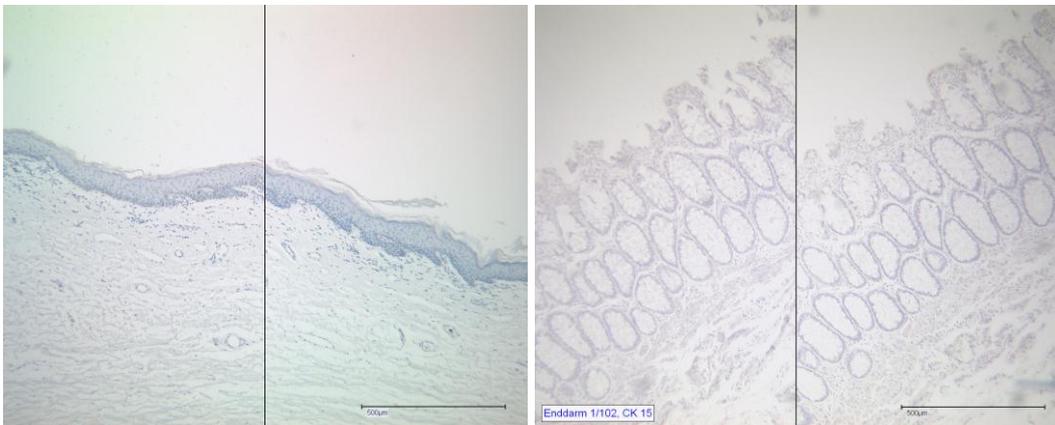


Abb. 20e und f: Cytokeratin 15; Glans penis (1/91) und Darmepithel (1/102)

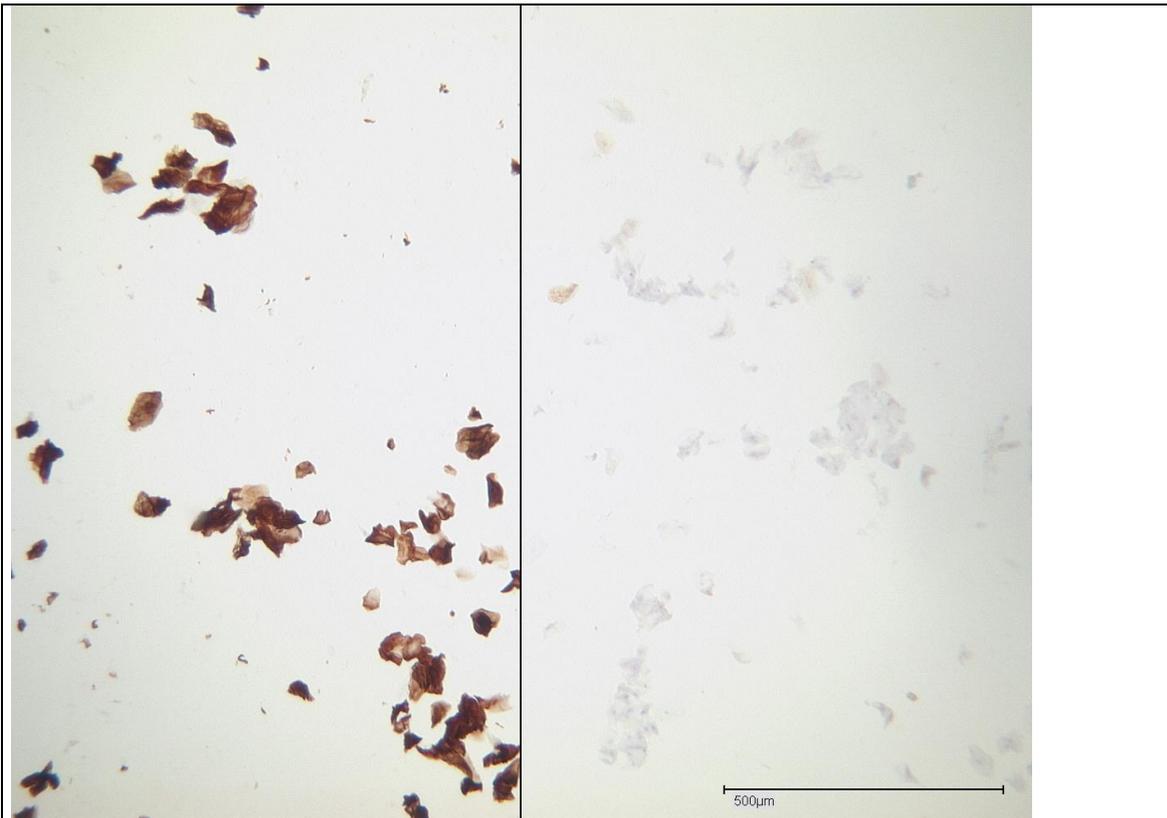


Abb. 21: CK 4, Wangenschleimhaut, Trypsin, CytoRich Red

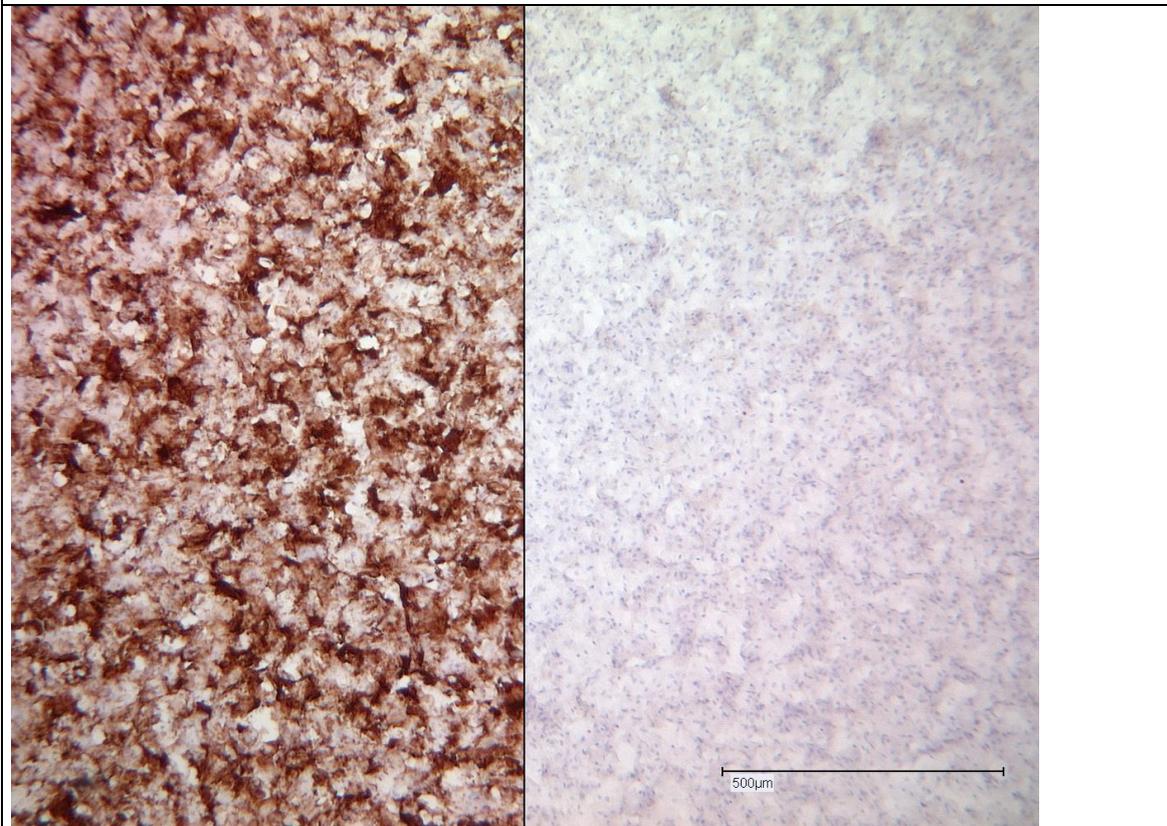


Abb. 22: Cytokeratin 4, Vaginalschleimhaut, Trypsin, CytoRich Red

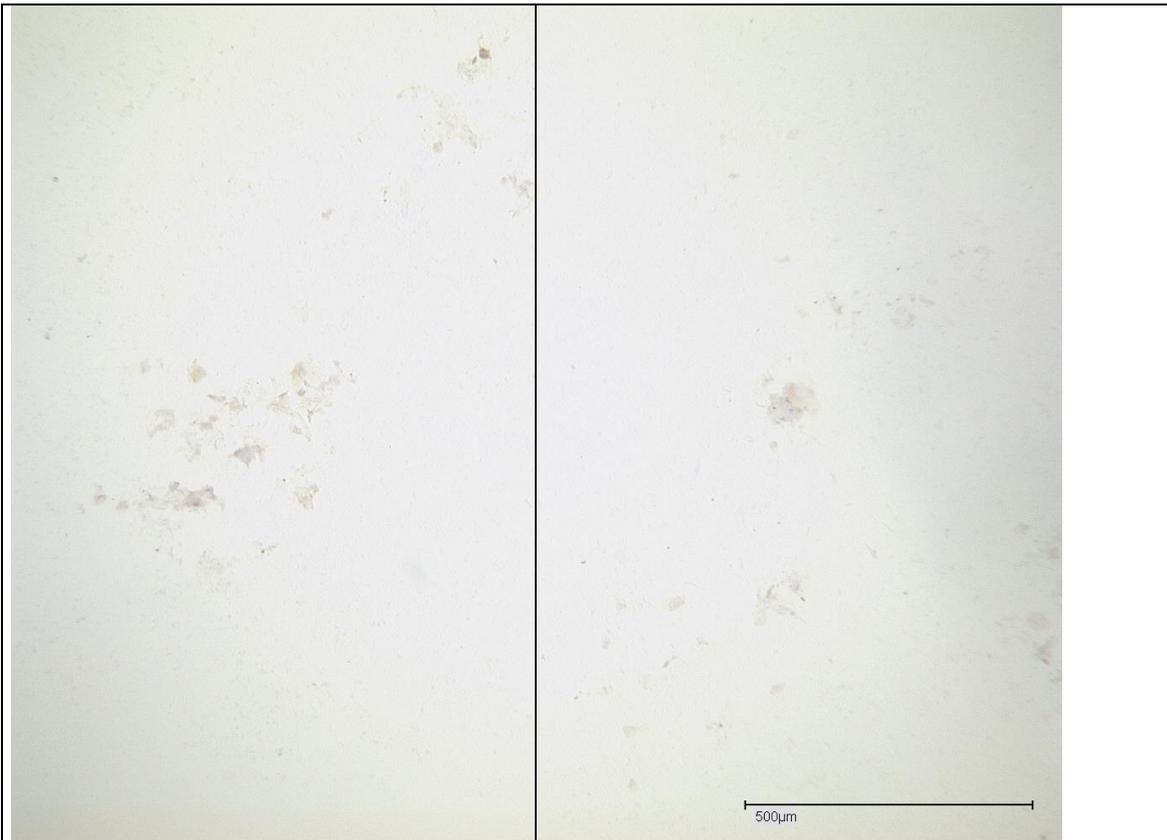


Abb. 23: Cytokeratin 4, Penisabstrich, Trypsin, CytoRich Red

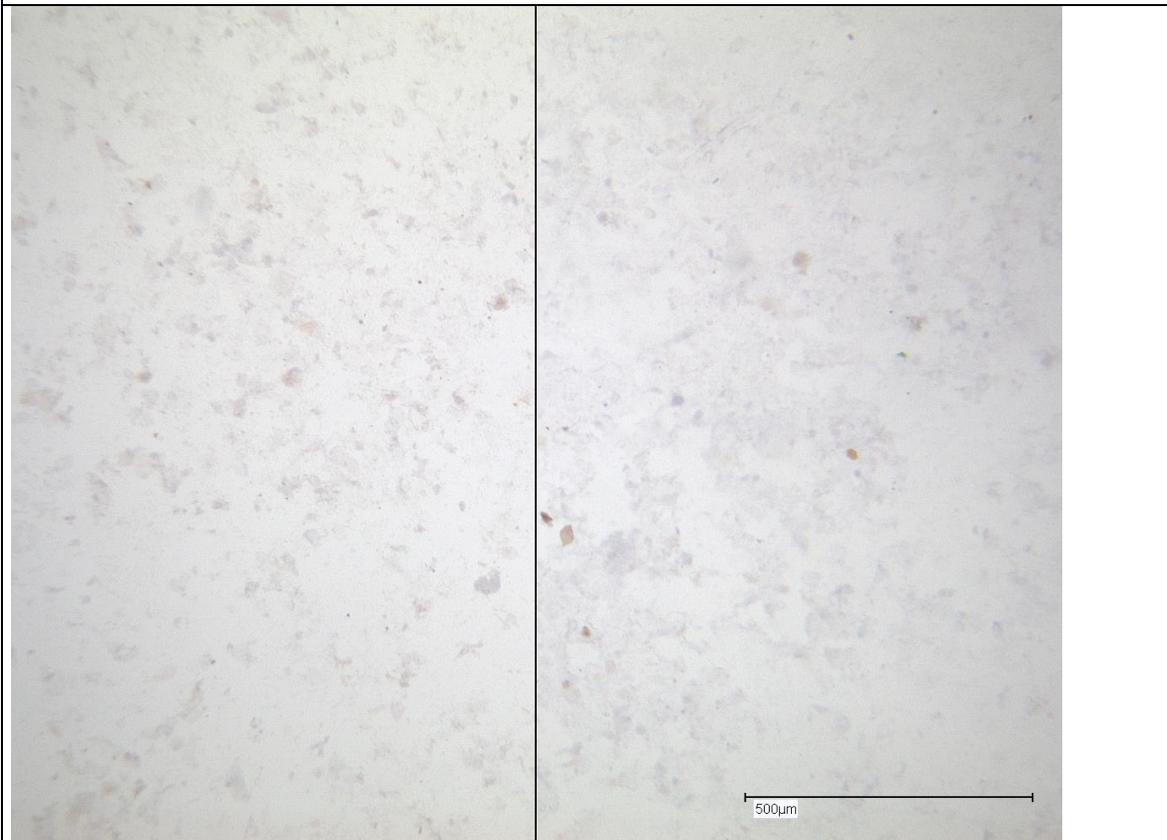


Abb. 24: Cytokeratin 4, Analabstrich, Trypsin, CytoRich Red

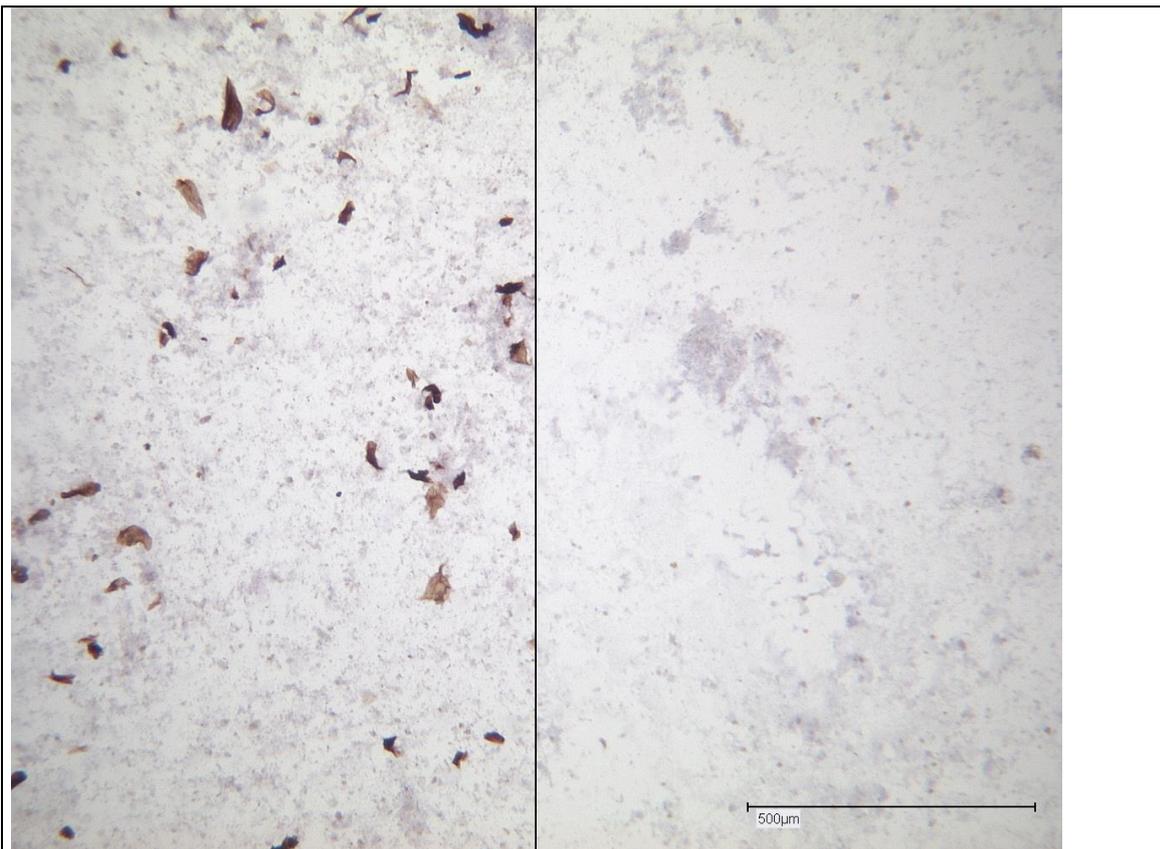


Abb. 25: Cytokeratin 4, Analabstrich II, Trypsin, CytoRich Red

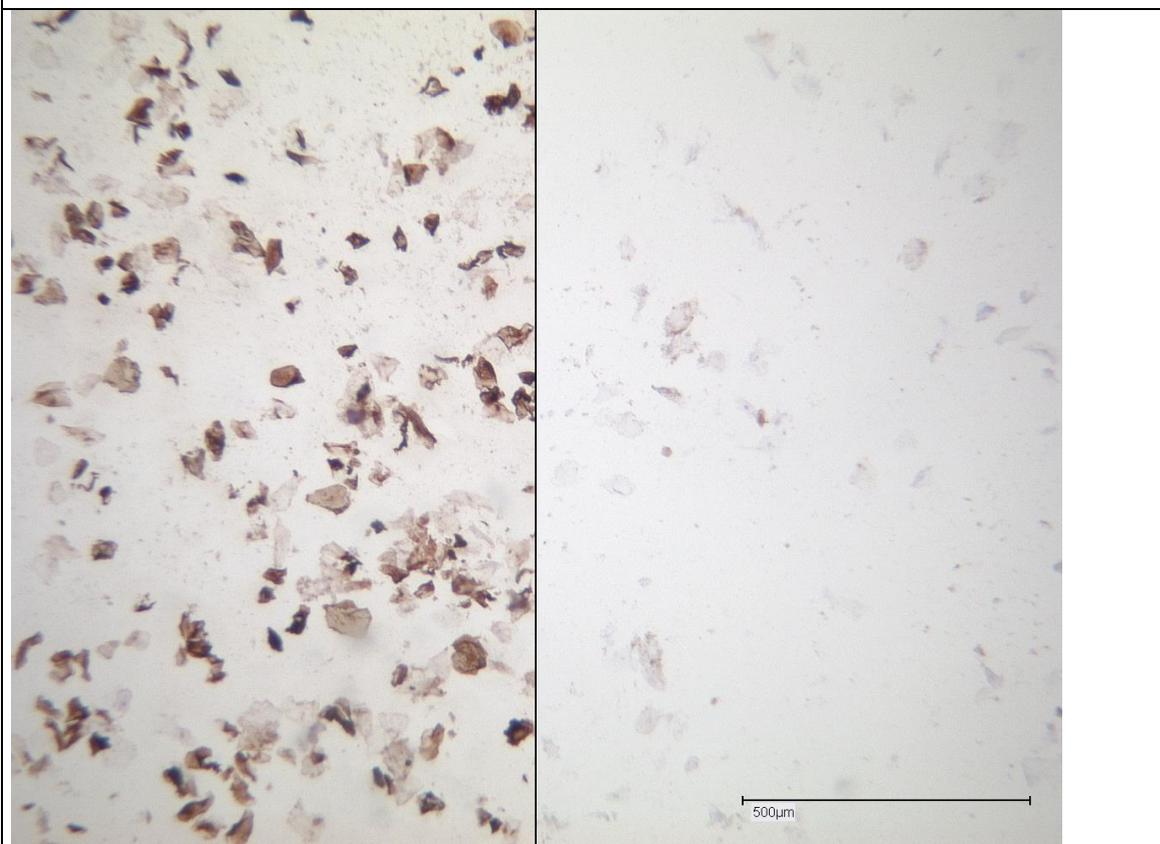


Abb. 26: Cytokeratin 4, Wangenschleimhaut, Trypsin, nativ

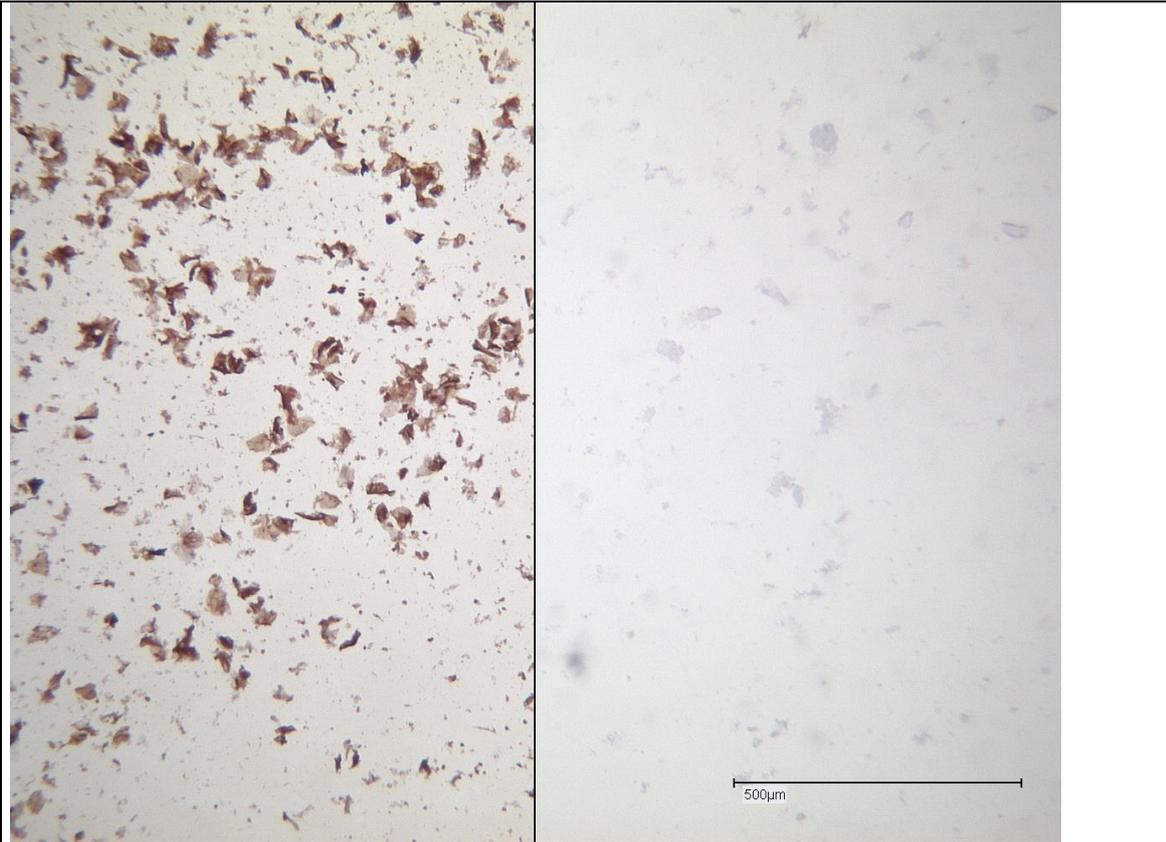


Abb. 27: Cytokeratin 4, Vaginalschleimhaut, Trypsin, nativ

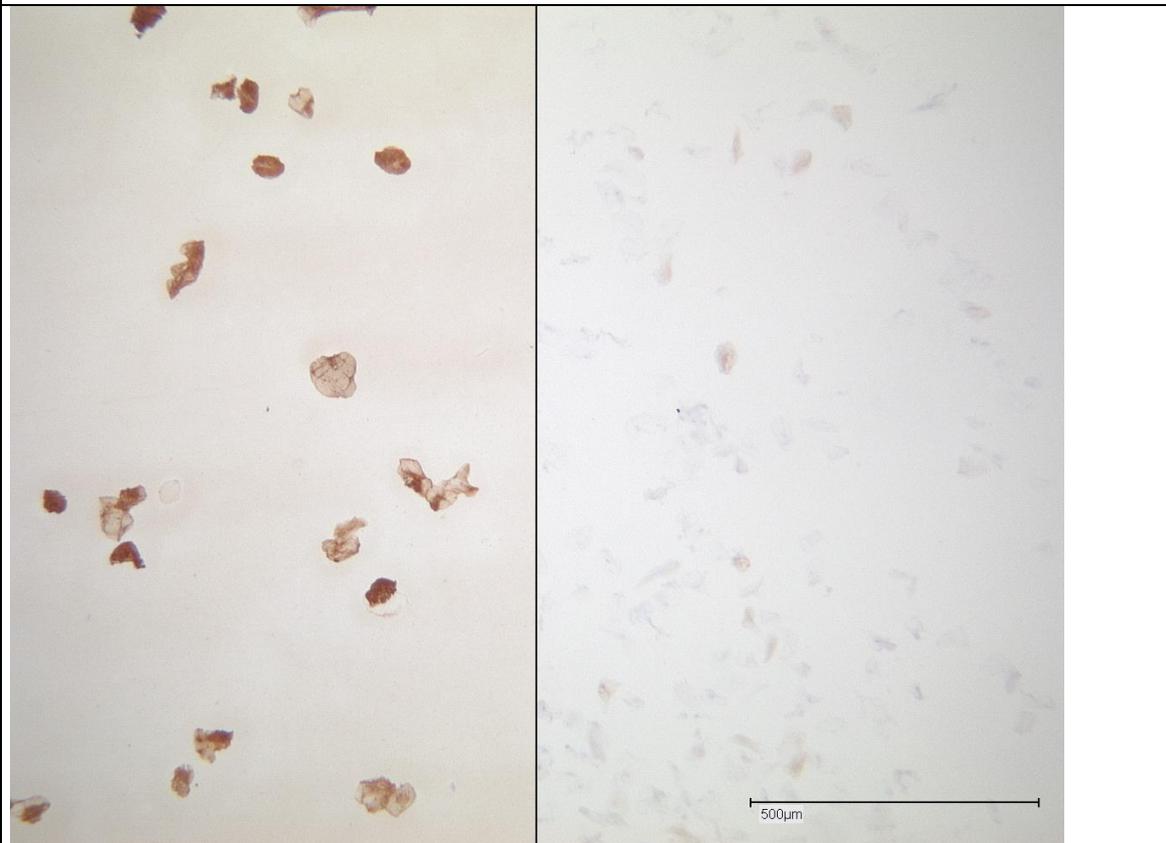


Abb. 28: Cytokeratin 4, Penisabstrich, Trypsin, Ethanol-Ether-Fixation

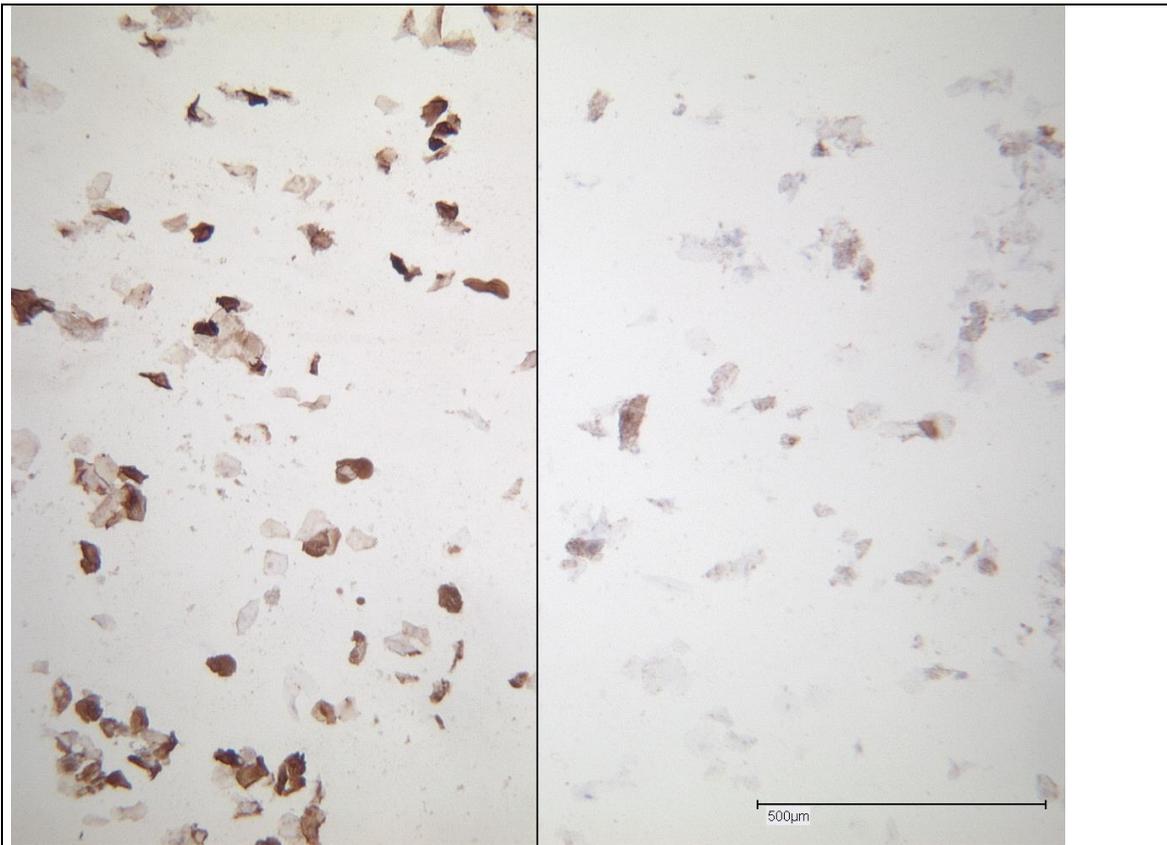


Abb. 29: Cytokeratin 4, Vaginalschleimhaut, Trypsin, Ethanol-Ether-Fixation

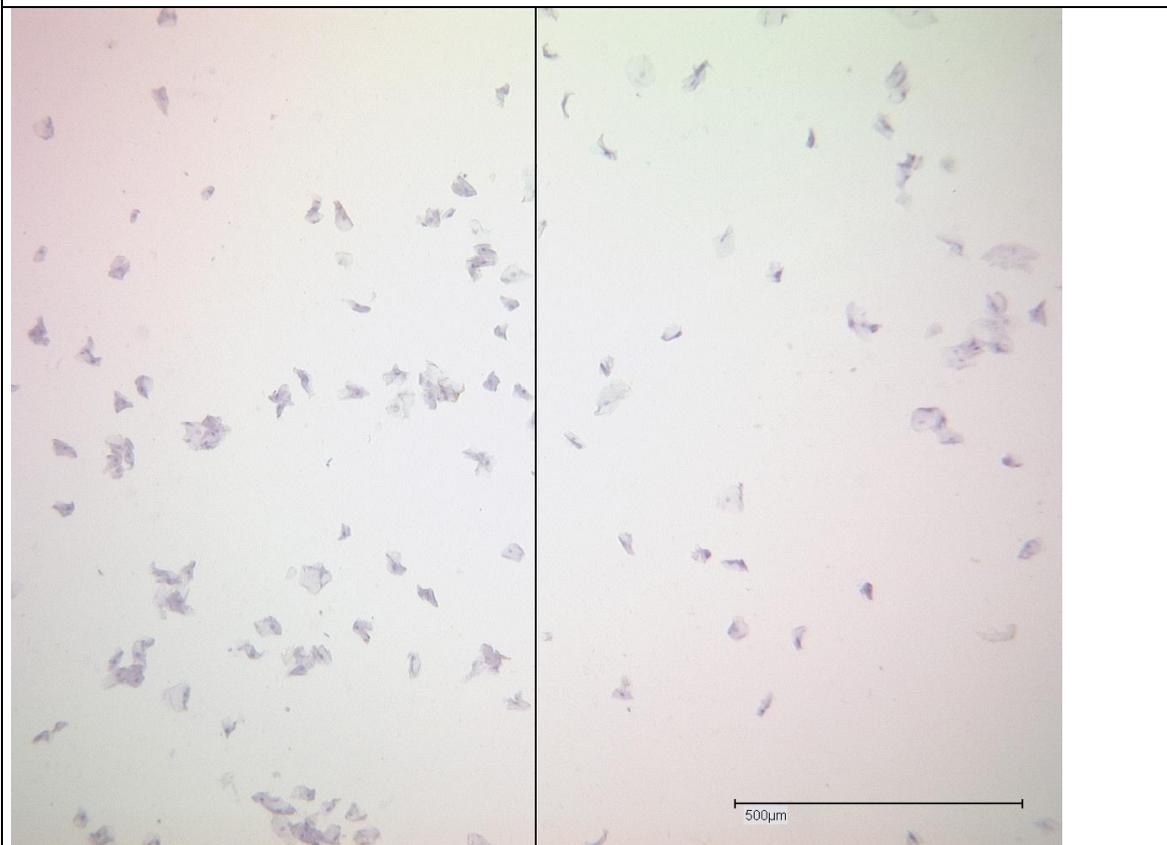


Abb. 30: Cytokeratin 4, Wangenschleimhaut, Tween 20, CytoRich Red

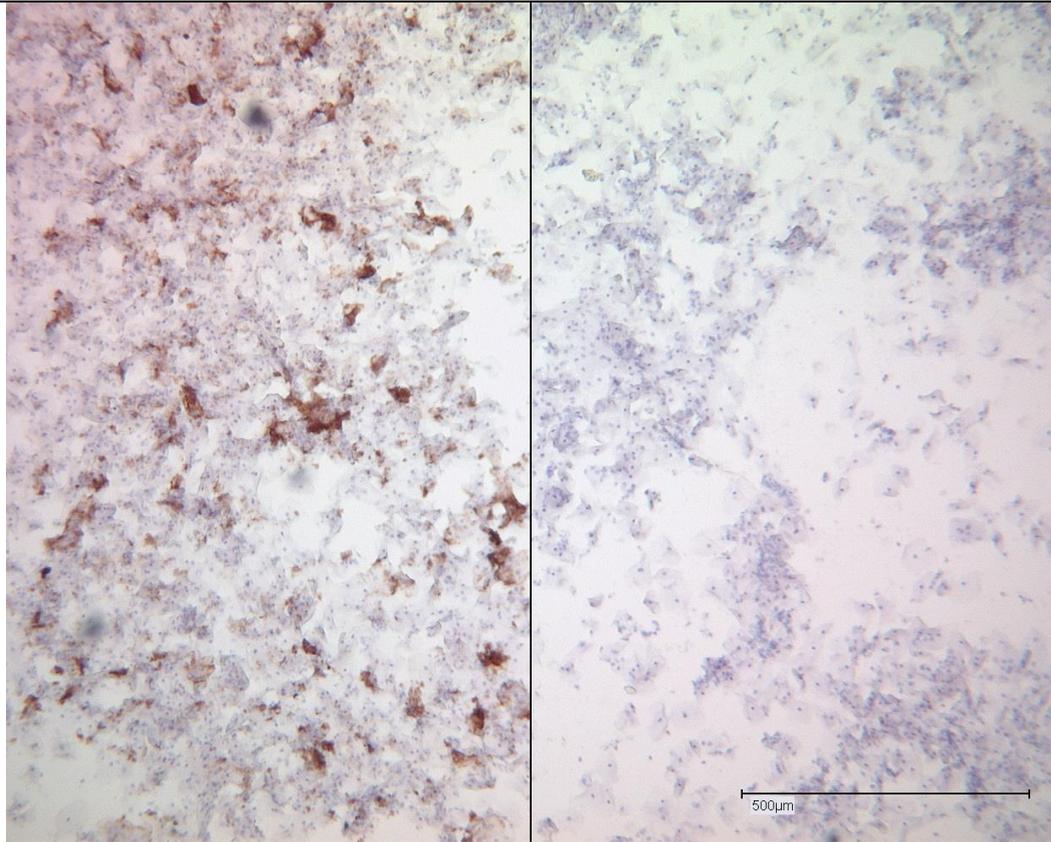


Abb. 31: Cytokeratin 4, Vaginalschleimhaut, Tween 20, CytoRich Red

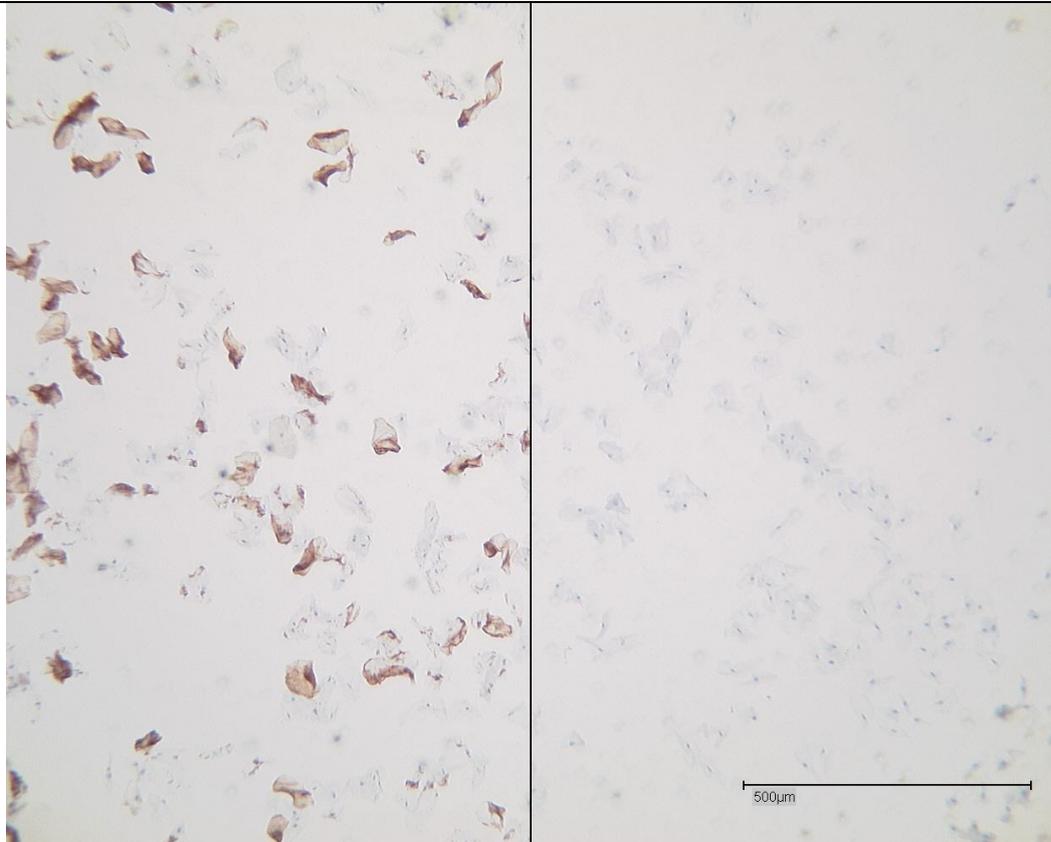


Abb. 32: Cytokeratin 4, Wangenschleimhaut, Tween 20, nativ

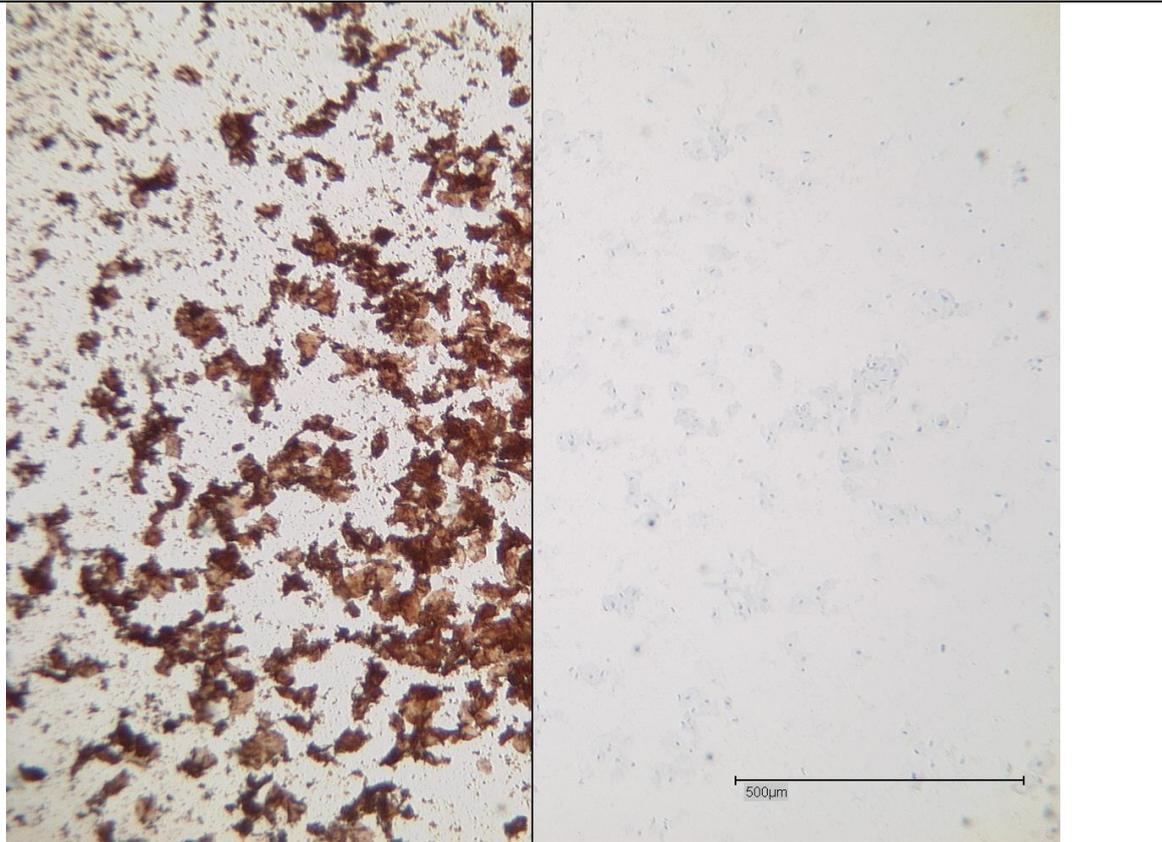


Abb. 33: Cytokeratin 4, Vaginalschleimhaut, Tween 20, nativ

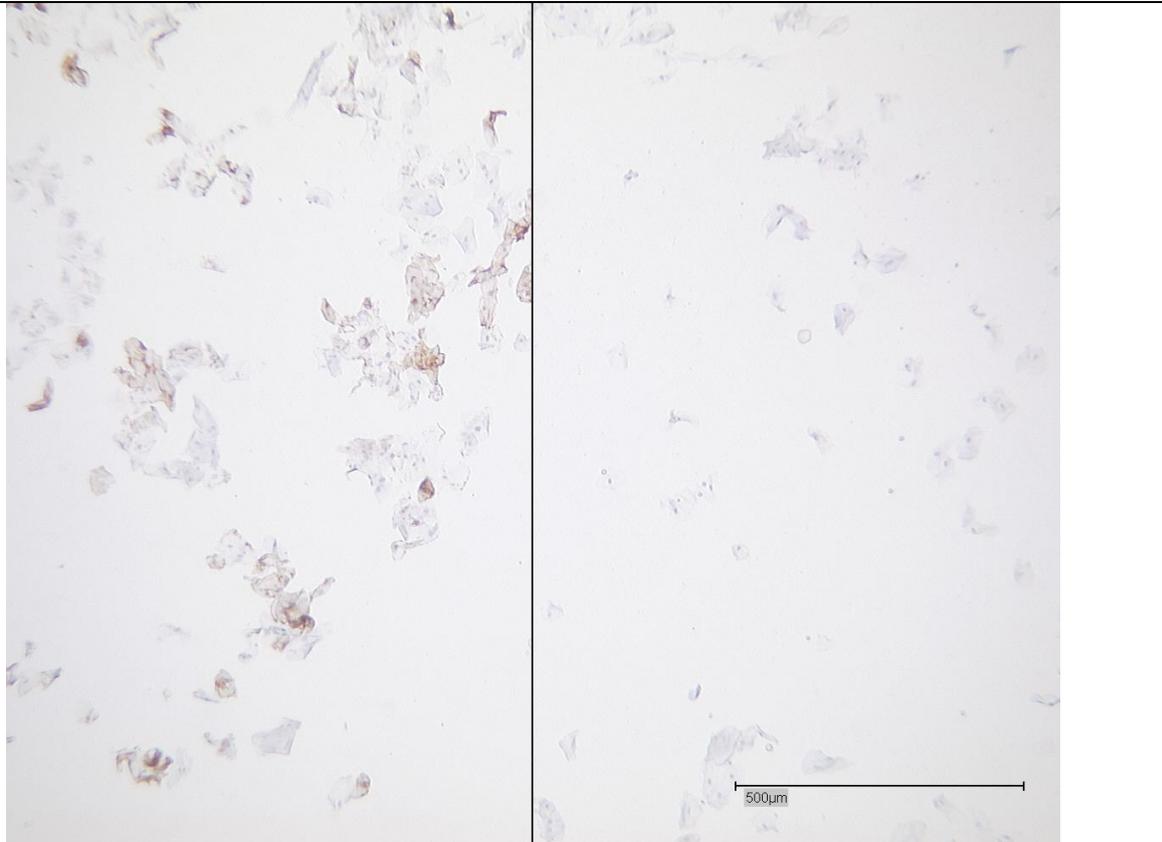


Abb. 34: Cytokeratin 4, Wangenschleimhaut, Tween 20, Ethanol-Ether

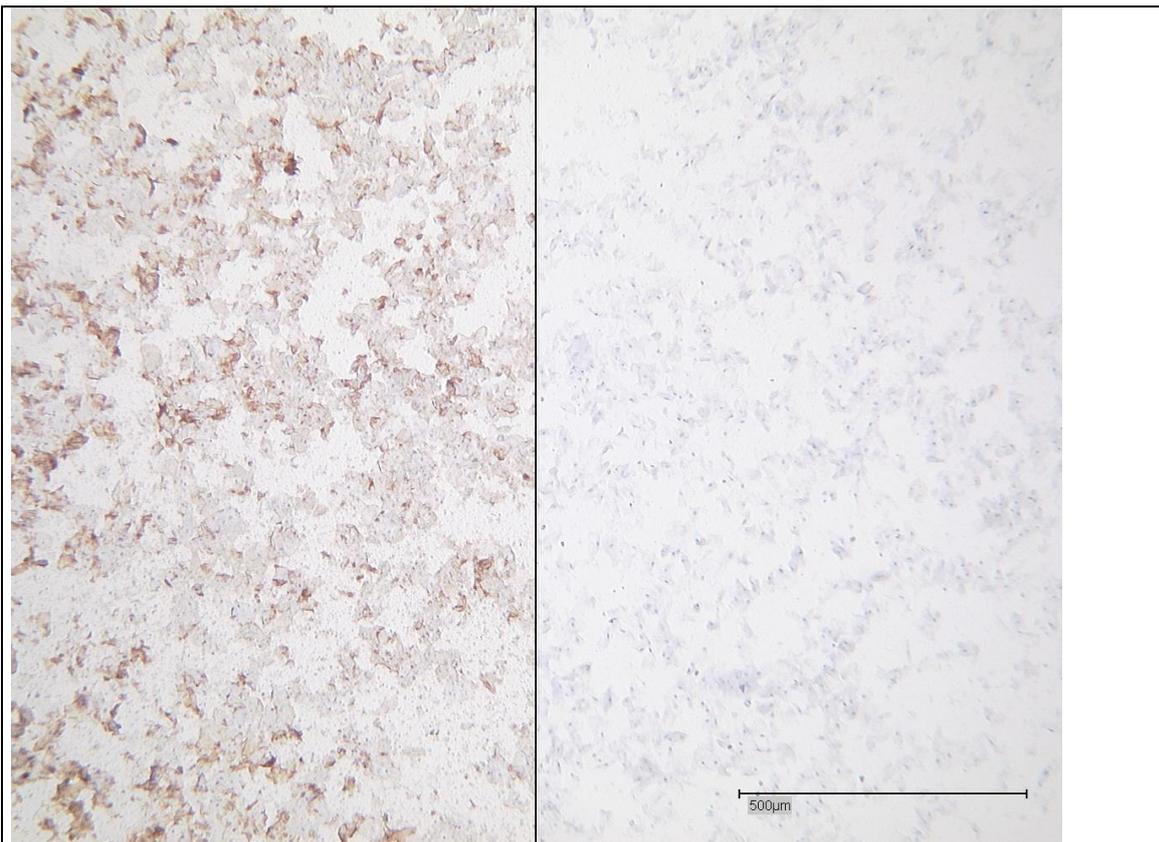


Abb. 35: Cytokeratin 4, Vaginalschleimhaut, Tween 20, Ethanol-Ether

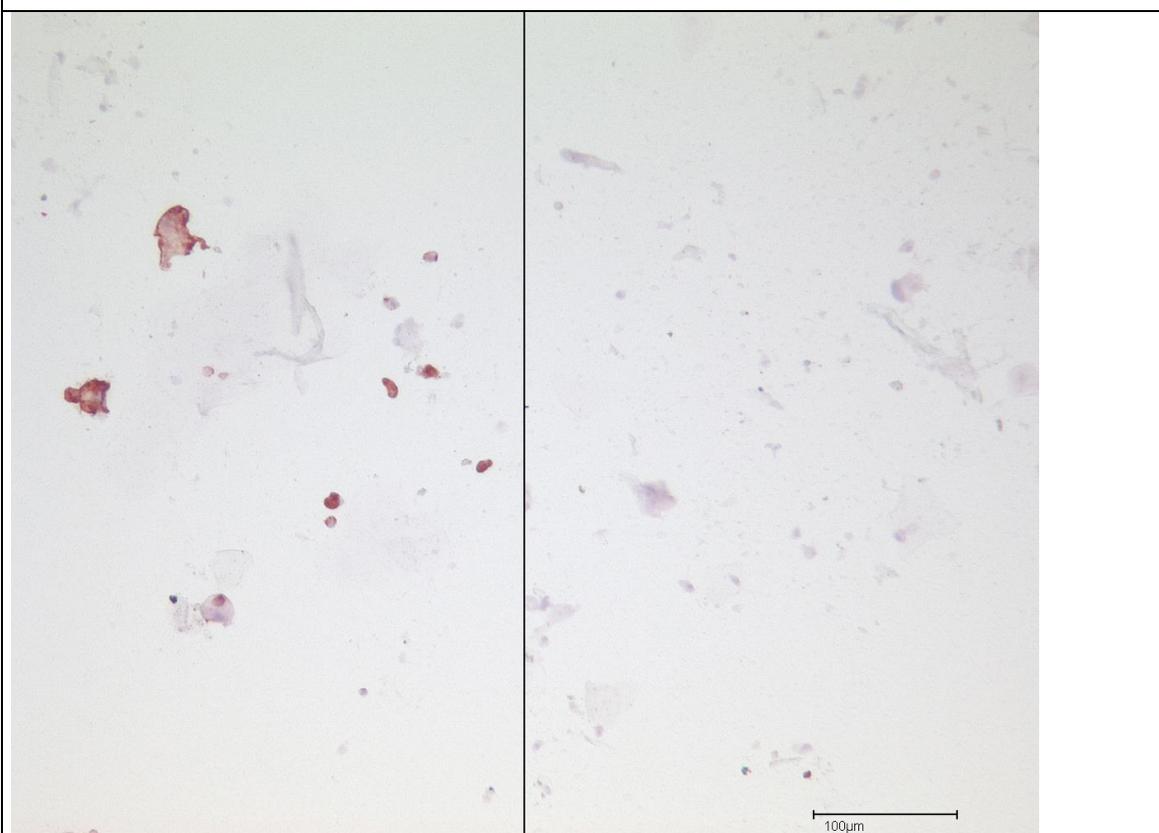


Abb. 36: Cytokeratin 8 Urinfiltrat, CytoRich Red

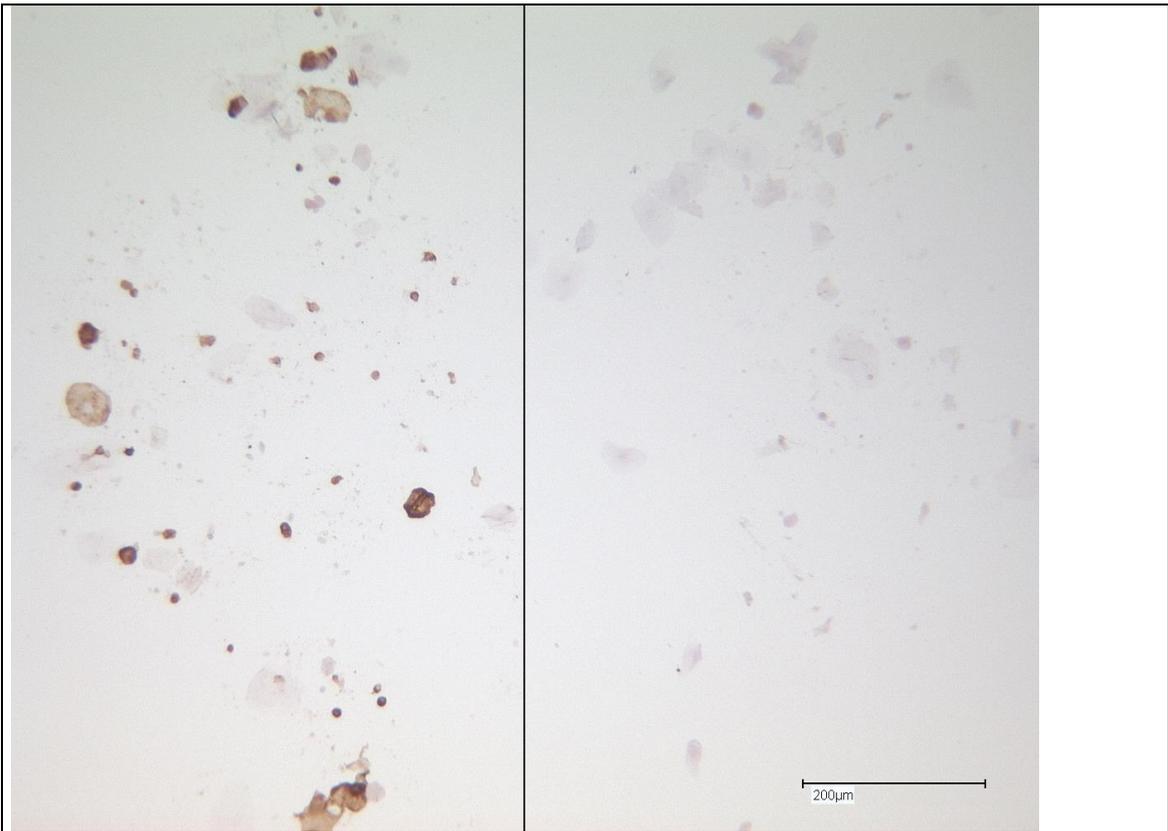


Abb. 37: Cytokeratin 8 Urinfiltrat, CytoRich Red

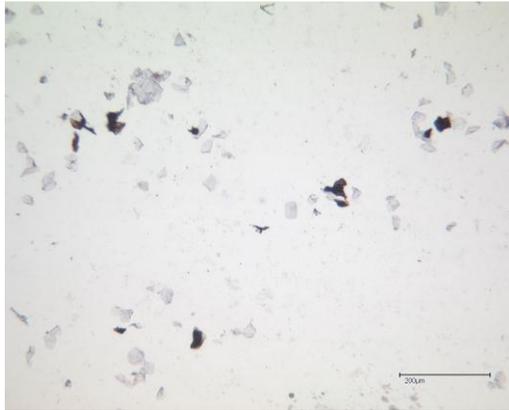
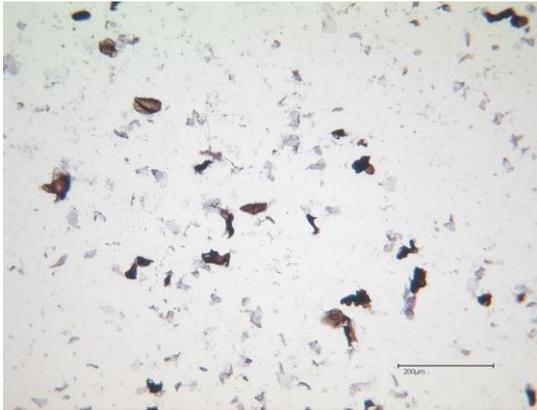


Abb. 38a und b: M7, M14/1

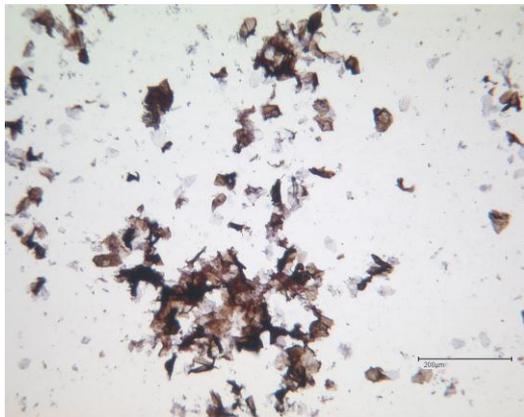
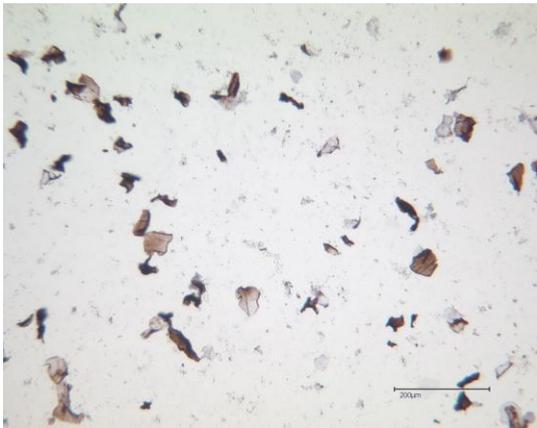


Abb. 39a und b: M 20/4, M22

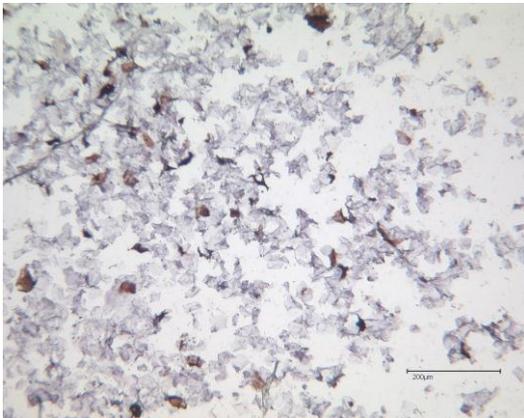
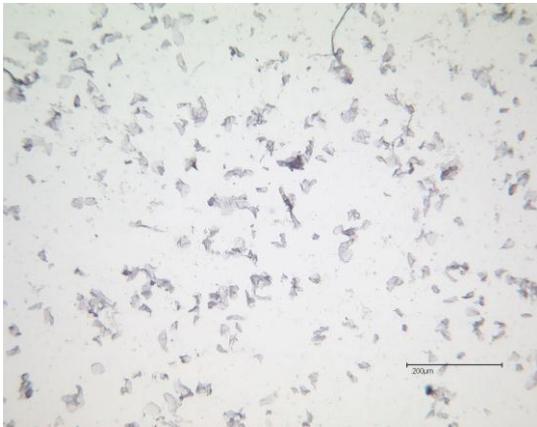


Abb. 40a und b: M23/1, M23/2

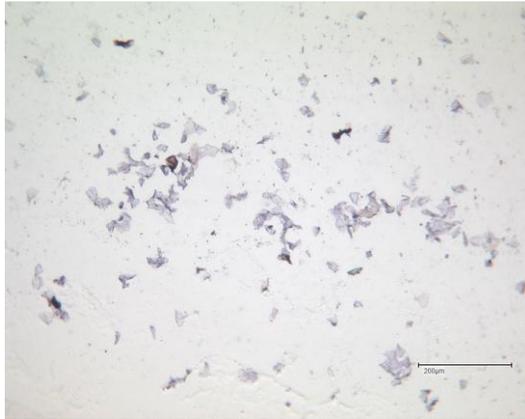
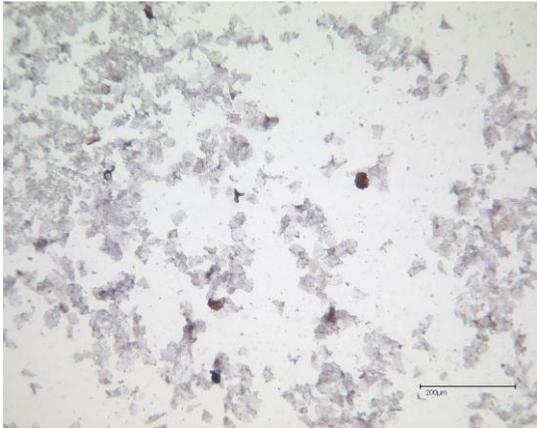


Abb. 41a und b: M24/9, M29

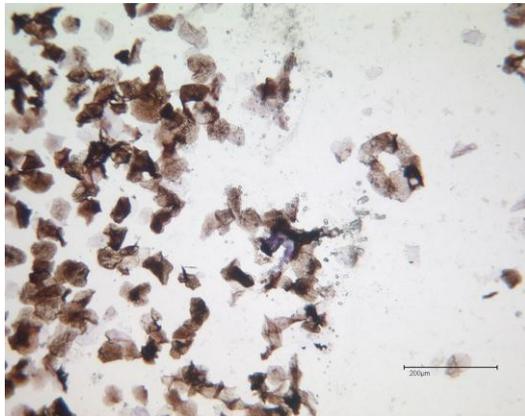
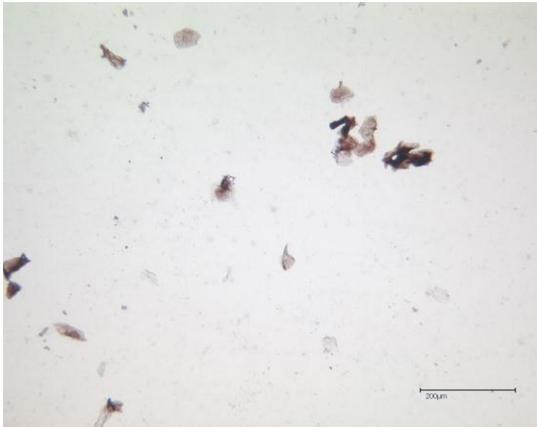
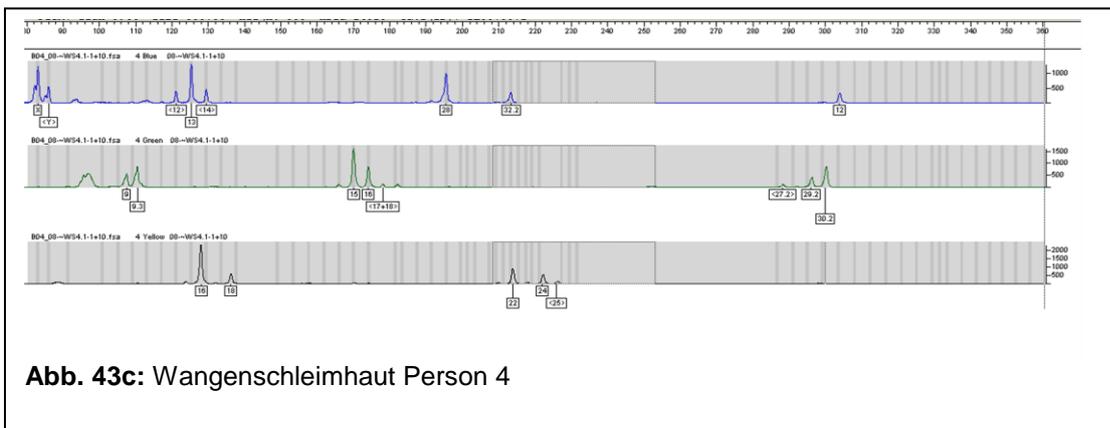
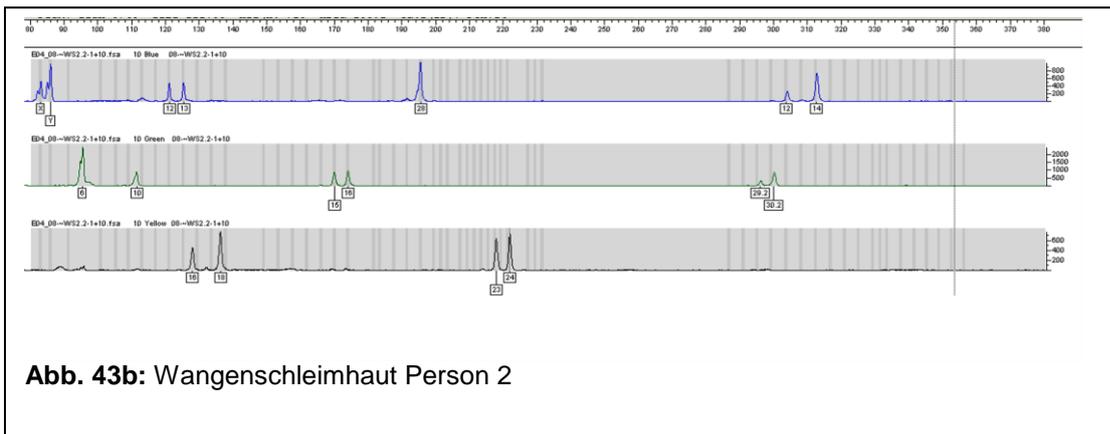
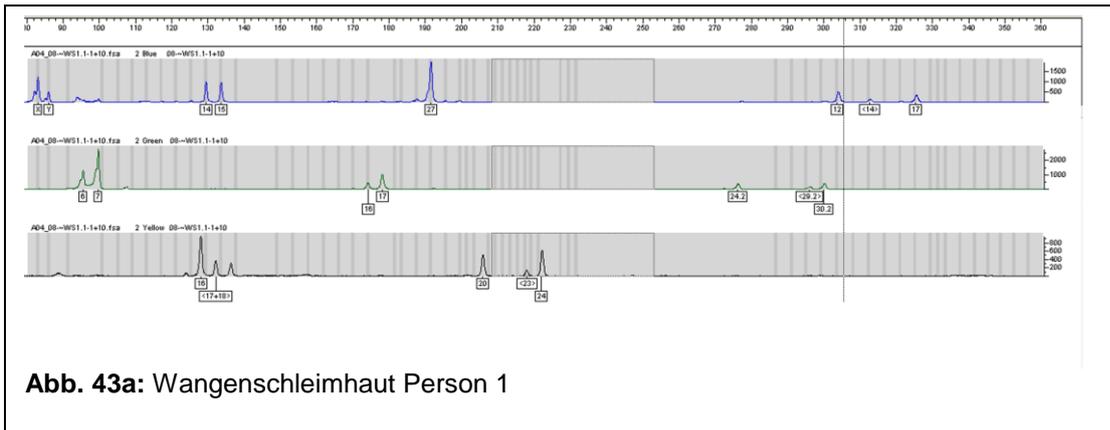
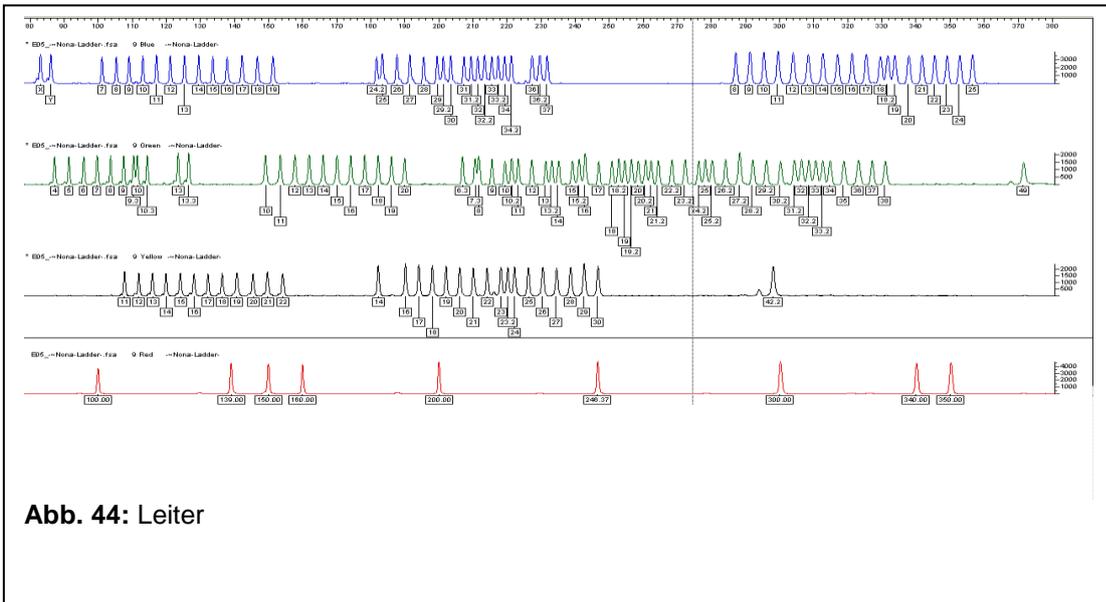
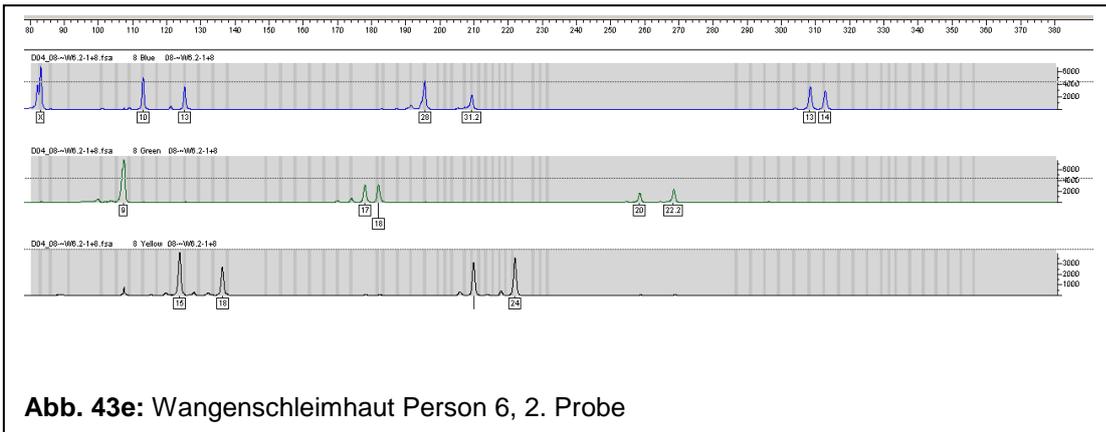
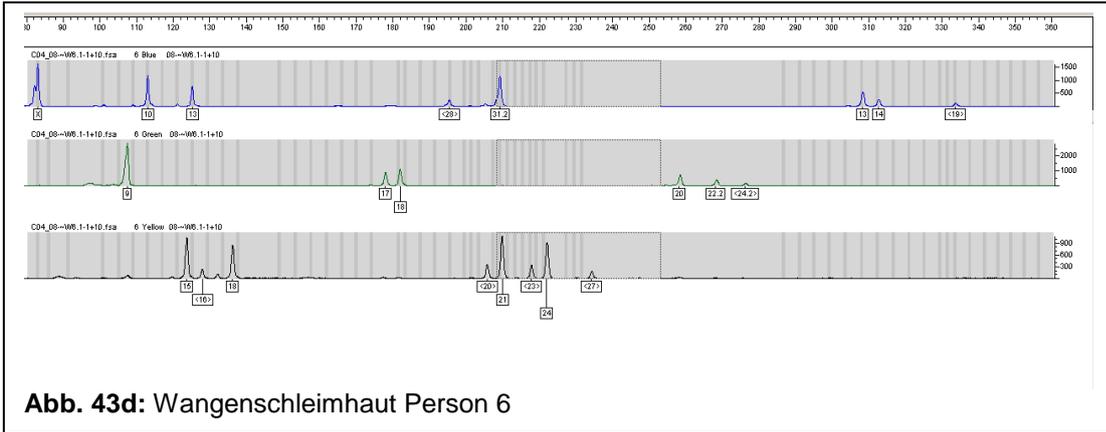


Abb. 42a und b: M 31/4, M35





8 Abkürzungsverzeichnis

AA	Anal(abstrich)
BL	Blase
BSA	bovine serum albumin
CK	Cytokeratin
CP	Crossing point
CRR	CytoRich Red Collection Fluid
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Epidermis(abstrich)
EtOH	Ethanol-Ether-Mischung
Fix.	Fixierung
FT	Felderhaut Thorax
HE	Herz
HI	Hirn
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
Ig	Immunglobulin
LB	Leber(parenchym)
LH	Leistenhaut
LZ	Liegezeit
Mat.	Material
Neg.	Negativkontrolle
P	Person
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Penis(abstrich)
Permeab.	Permeabilisierung
Pers.	Person
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
TBS	TRIS-Buffered Saline
TBST	TRIS-Buffered Saline with Tween
UT	Uterus
VA	Vaginal(abstrich)
W	Watt
WS	Wangenschleimhaut(abstrich)
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZZ	Zellzustand

9 Literaturverzeichnis

1. Finkelhor, D., *The International Epidemiology of Child Sexual Abuse*. Child Abuse & Neglect, 1994. 18(5): p. 409-417.
2. Bundesministerium für Familie, S., Frauen und Jugend, *Lebenssituation, Sicherheit und Gesundheit von Frauen in Deutschland*. 2004.
3. Statistisches Bundesamt www.destatis.de.
4. Paterson, S.K., et al., *Immunohistochemical Staining as a Potential Method for the Identification of Vaginal Epithelial Cells in Forensic Casework*. J Forensic Sci, 2006. 51: p. 1136-1143.
5. French, C.E.V., et al., *A novel histological technique for distinguishing between epithelial cells in forensic casework*. For Sci Int, 2008. 178: p. 1-6.
6. Marchuk, D., S. McCrohon, and E. Fuchs, *Remarkable conservation of structure among intermediate filament genes*. Cell, 1984. 39: p. 491-8.
7. Herrmann, H. and U. Aebi, *Intermediate Filaments: Molecular Structure, Assembly Mechanism, and Integration Into Functionally Distinct Intracellular Scaffolds*. Annu Rev Biochem, 2004. 73: p. 749–89.
8. Moll, R., et al., *The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells*. Cell, 1982. 31: p. 11-24.
9. Moll, R., *Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors*. Veroff Pathol., 1993. 142: p. 1-197.
10. Knapp, A.C. and W.W. Franke, *Spontaneous Losses of Control of Cytokeratin Gene Expression in Transformed, Non-Epithelial Human Cells Occurring at Different Levels of Regulation*. Cell, 1989. 59: p. 67-79.
11. Hatzfeld, M. and K. Weber, *The coiled coil of in vitro assembled keratin filaments is a heterodimer of type I and II keratins: use of site-specific mutagenesis and recombinant protein expression*. 1990. 110(4): p. 1199-1210.
12. Franke, W.W., et al., *Protein complexes of intermediate-sized filaments: Melting of cytokeratin complexes in urea reveals different polypeptide separation characteristics*. Proc Natl Acad Sci, 1983. 80: p. 7113-7117.
13. Nagle, R.B., *A review of intermediate filament biology and their use in pathologic diagnosis*. Mol Biol Rep, 1994. 19: p. 3-21.

14. Leube, E.L., et al., *Molecular characterization and expression of the stratification-related cytokeratins 4 and 15*. J Cell Biol, 1988. 106: p. 1249-1261.
15. Fuchs, E. and K. Weber, *Intermediate Filaments: Structure, Dynamics, Function, and Disease*. Annu Rev Biochem, 1994. 63: p. 345-382.
16. Chan, Y.M., et al., *A human keratin 14 "knockout": the absence of K14 leads to severe epidermolysis bullosa simplex and a function for an intermediate filament protein*. Genes Dev, 1994. 8(21): p. 2574-87.
17. McKenna, K.E., et al., *Linkage of epidermolysis bullosa simplex to keratin gene loci*. J Med Genet, 1992. 29(8): p. 568-70.
18. Coulombe, P.A., et al., *Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses*. Cell, 1991. 66(6): p. 1301-11.
19. Müller, F.B., et al., *A human keratin 10 knockout causes recessive epidermolytic hyperkeratosis*. Hum Mol Genet, 2006. 15: p. 1133-1141.
20. Rothnagel, J.A., et al., *Mutations in the rod domains of keratins 1 and 10 in epidermolytic hyperkeratosis*. Science, 1992. 257(5073): p. 1128-30.
21. Oosterwijk, E., et al., *Expression of Intermediate-sized Filaments in Developing and Adult Human Kidney and in Renal Cell Carcinoma*. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1990. 38: p. 385-392.
22. Moll, R., et al., *Cytokeratin 20 in Human Carcinomas: A New Histodiagnostic Marker Detected by Monoclonal Antibodies*. Am J Pathol, 1992. 140(2): p. 427-447.
23. Aishima, S.-i., et al., *The Utility of Keratin 903 as a New Prognostic Marker in Mass-Forming-Type Intrahepatic Cholangiocarcinoma*. Mod Pathol, 2002. 15: p. 1181-1190.
24. Tanière, P., et al., *Molecular and Clinical Differences between Adenocarcinomas of the Esophagus and of the Gastric Cardia*. American Journal of Pathology, 2001. 158: p. 33-40.
25. Smedts, F., et al., *Changing Patterns of Keratin Expression During Progression of Cervical Intraepithelial Neoplasia*. American Journal of Pathology, 1990. 136.

26. Malzahn, K., et al., *Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas*. Virchows Arch, 1998. 433: p. 119-129.
27. Miettinen, M., *Keratin 20: Immunohistochemical Marker for Gastrointestinal, Urothelial, and Merkel Cell Carcinomas*. Mod Pathol, 1995. 8(4): p. 384-388.
28. Wurmb-Schwark, N.v., et al., *Fast and simple DNA extraction from saliva and sperm cells obtained from the skin or isolated from swabs*. Leg Med, 2006. 8(177-181).
29. Collin, C., et al., *Characterization of human cytokeratin 2, an epidermal cytoskeletal protein synthesized late during differentiation*. Exp Cell Res, 1992. 202: p. 132-141.
30. Hesse, M., T.M. Magin, and K. Weber, *Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18*. J Cell Sci, 2001. 114: p. 2569-2575.
31. Woodcock-Mitchell, J., et al., *The 50- and 58-kdalton Keratin Classes as Molecular Markers for Stratified Squamous Epithelia: Cell Culture Studies*. J Cell Biol 1983. 97: p. 244-251.
32. Jih, D.M., et al., *Cytokeratin 15 expression in trichoepitheliomas and a subset of basal cell carcinomas suggests they originate from hair follicle stem cells*. J Cutan Pathol, 1999. 26: p. 113-118.
33. Wetzels, R.H.W., et al., *Basal Cell-specific and Hyperproliferation-related Keratins in Human Breast Cancer*. Am J Pathol, 1991. 138: p. 751-763.
34. Troyanovsky, S.M., et al., *Patterns of expression of keratin 17 in human epithelia: dependency on cell position*. J Cell Sci, 1989. 93: p. 419-426.
35. Nelson, W.G. and T.-T. Sun, *The 50- and 58-kdalton Keratin Classes as Molecular Markers for Stratified Squamous Epithelia: Cell Culture Studies* Journal of Cell Biology, 1983. 97: p. 244-251.
36. Dinges, H.-P., G. Wirnsberger, and H. Höfler, *Immunocytochemistry in Cytology Comparative Evaluation of Different Techniques*. Anal Quant Cytol, 1989. 11: p. 22-32.
37. Allery, J.P., et al., *Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods*. J Forensic Sci, 2001. 46: p. 349-351.

Danksagung

Diese Doktorarbeit wäre niemals fertiggestellt worden ohne die Unterstützung, Hilfsbereitschaft, Geduld, Inspiration und Freundschaft dieser Menschen (in der Reihenfolge ihres Erscheinens):

Marianne und Thomas Buschner, Peter Buschner, Gabriel Pfaff, Dr. Richard Leidig, Jessica Jesser, Dr. Kai Januschowski, Dr. Martin M. Schulz, Prof. H.-W. Wehner und Prof. F. Wehner