

Aus dem Medizinischen Zentrum für Pathologie

Institut für Pathologie des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Immunreaktivität der Knochenmatrixproteine am normalen  
Knochengewebe und bei Tumorosteopathien**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Christoph Reh aus Gießen

Gießen 2001

Aus dem medizinischen Zentrum für Pathologie

Institut für Pathologie

Leiter: Prof. Dr. A. Schulz

Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. A. Schulz

Gutachter: Prof. Dr. H. Stracke

Tag der Disputation: 27.11.2001

<b>Inhalt</b>	<b><u>Seite</u></b>
<b><u>1</u>    <b>Abkürzungsverzeichnis</b></b>	4
<b><u>2</u>    <b>Einleitung</b></b>	5
<b>2.1    <b>Aufbau des normalen Knochengewebes</b></b>	5
<b>2.2    <b>Die Rolle des Zellsystems</b></b>	6
2.2.1    Osteoblasten	6
2.2.2    Osteozyten	7
2.2.3    „Lining Cells“	8
2.2.4    Osteoklasten	8
<b>2.3    <b>Anorganische Knochenbestandteile: Mineral</b></b>	10
<b>2.4    <b>Organische Knochenbestandteile: Proteine</b></b>	10
2.4.1    Kollagen	10
2.4.2    Osteocalcin	13
2.4.3    Osteopontin	15
2.4.4    Osteonectin	16
2.4.5    Decorin	16
<b>2.5    <b>Veränderungen des Knochengewebes bei Tumorinfiltration</b></b>	17
2.5.1    Epidemiologische Daten	17
2.5.2    Das paraneoplastische Hyperkalzämiesyndrom	18
2.5.3    Pathophysiologie der Metastasierung	19
2.5.4    Pathophysiologie der osteolytischen Metastasen	20
2.5.5    Pathophysiologie der osteoblastischen Metastasen	21
2.5.6    Sonderfall multiples Myelom	21
<b><u>3</u>    <b>Fragestellung</b></b>	23
<b><u>4</u>    <b>Material und Methoden</b></b>	24
<b>4.1    <b>Untersuchungsmaterial</b></b>	24
<b>4.2    <b>Antikörper und immunologische Methode</b></b>	24
<b>4.3    <b>Photodokumentation der unterschiedlichen Verteilungsmuster</b></b>	27
<b>4.4    <b>Vorgehen bei der deskriptiven Auswertung</b></b>	27
<b>4.5    <b>Gruppenbildung</b></b>	27
<b>4.6    <b>Histomorphometrische Berechnungen</b></b>	28
4.6.1    Berechnung des „Bone Volume“	28
4.6.2    Berechnung der COL-I-C markierten Oberflächen	29
<b><u>5</u>    <b>Ergebnisse</b></b>	31
<b>5.1    <b>Deskription der Verteilungseigenschaften</b></b>	31
<b>5.2    <b>Darstellung der Ergebnisse</b></b>	32
<b>5.3    <b>Ergebnisse der histomorphometrischen Berechnungen</b></b>	57
5.3.1    Zugrundeliegende Anfärbbeeigenschaft	57
5.3.2    Ergebnis der rechnerischen Auswertung	57
<b><u>6</u>    <b>Diskussion</b></b>	59
<b><u>7</u>    <b>Zusammenfassung</b></b>	63
<b><u>8</u>    <b>Literatur</b></b>	64

## 1 Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
BMP	Bone Morphogenetic Proteins
CAM	Cell Adhesion Molecule
COL-I-C	N-terminales Propeptid des Typ-I-Kollagens
DEC	Decorin
FGF	Fibroblast Growth Factor
Gla	Gamma-carboxy-Glutaminsäurerest
HA	Hydroxylapatit [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ].
IGF	Insulin like Growth Factor
IL	Interleukin
OAF	Osteoklasten-aktivierender Faktor
OC	Osteocalcin
ON	Osteonectin
OPN	Osteopontin
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGE2	Prostaglandin E2
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTH	Parathormon (Parathyroid Hormone)
PTH-rP	Parathyroid Hormone-related Protein
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumornekrosefaktor

## 2 Einleitung

### 2.1 Aufbau des normalen Knochengewebes

Einteilungen des Knochengewebes sind in mehrerlei Hinsicht möglich. Einerseits wird die Kompakta von der Spongiosa unterschieden. Die Kompakta weist dicht gepackte Knochensubstanz ohne größere mineralfreie Areale auf. Die Spongiosa hingegen besteht aus mehr oder wenig locker- aber systematisch- angeordneten Knochenbälkchen, die eine gute Anpassungsfähigkeit des Knochengewebes ermöglicht (DERMIETZEL, 1994). Weiterhin kann eine Einteilung je nach Entwicklungsverlauf vorgenommen werden. Unterschieden wird eine Entwicklung aus einer bindegewebigen Vorstufe, desmale Ossifikation genannt, und eine Entwicklung aus einer knorpeligen Vorstufe, bezeichnet als chondrale Ossifikation. Die desmale Ossifikation tritt im Embryonalstadium bei der Bildung des knöchernen Schädeldachs, der meisten Knochen des Gesichtsschädels und der Schlüsselbeine auf. Bei der chondralen Ossifikation werden aus Knorpel vorgeformte Skelettanteile sukzessive durch Knochengewebe ersetzt. Dieser Vorgang erfordert mehrere Einzelschritte, da eine direkte Metaplasie von Knorpel- zu Knochengewebe nicht möglich ist (DERMIETZEL, 1994).

Letztlich läßt sich das Knochengewebe auch nach seiner mikroskopischen Organisation einteilen. Faserknochen enthält Kollagenbündel, die wie im Bindegewebe angeordnet sind. Beim Erwachsenen tritt diese Organisationsform hauptsächlich an der Einstrahlungsstelle von Sehnen in das Knochengewebe auf und bei rasch ablaufenden Reparaturprozessen. Der Lamellenknochen stellt einen höheren Spezialisierungsgrad dar und ist reich an verkalkter Grundsubstanz, enthält dafür aber weniger Kollagenfibrillen. Die Kollagenfibrillen verlaufen in einer Lamelle parallel zueinander. An den Oberflächen des Knochengewebes bilden die Grundlamellen die Grenze zum übrigen Gewebe. Sogenannte Speziallamellen bilden Osteone. Diese entstehen, indem von Osteoklasten geschaffene Hohlräume wieder bis auf einen gefäßführenden Kanal durch Osteoblasten knöchern durchbaut werden. Diese Lamellensysteme bilden die umbaufähige Grundlage der Kompakta (BUCHER und WARTENBERG, 1989).

Die Blutversorgung des Knochengewebes wird zum größten Teil durch Gefäße gewährleistet, die durch die hohle Achse der Osteone verlaufen (Haverssche Kanäle). Andere Gefäße durchbrechen

die Lamellenstruktur und stellen eine Verbindung zu dem Gefäßsystem des Periosts her (Volkmannsche Kanäle). In diesen Kanalsystemen bilden sich Gefäße vom Kapillartyp. Möglicherweise können Änderungen der Blutflußrichtung je nach Druckverhältnis auftreten (DERMIETZEL, 1994).

Auf zellulärer Ebene wird die Nährstoffversorgung durch das System der Knochenkanälchen gewährleistet. Diese sind im Durchschnitt 1 µm weit. In ihrem Inneren befinden sich die Fortsätze der Osteozyten. Diese sind durch Nexus untereinander verbunden. Der Stoffaustausch erfolgt zwischen der Gewebsflüssigkeit in den Knochenkanälchen und den Osteozytenfortsätzen (BUCHER und WARTENBERG, 1989).

## 2.2 Die Rolle des Zellsystems

Reife Osteoblasten, Osteozyten und „lining cells“ gehören zu einer Zellfamilie. Sie können aus Bindegewebsstammzellen ebenso entstehen wie Adipozyten, Chondrozyten und Fibroblasten (MUNDY, 1999). Osteoklasten hingegen stammen von den Makrophagen ab, stellen also eine von den osteoblastären Zellen unabhängige Zellfamilie dar.

### 2.2.1 Osteoblasten

Reife Osteoblasten besitzen die Fähigkeit, die Proteine der Knochenmatrix zu synthetisieren, wie z. B. Typ-I-Kollagen und OC. Sie enthalten außerdem das membran-gebundene Enzym alkalische Phosphatase, das sowohl histologisch als auch klinisch als Marker der Osteoblastenaktivität eingesetzt wird. Osteoblasten sezernieren außerdem die dann in der Knochenmatrix vorhandenen Wachstumsfaktoren, wie TGF-beta, PDGF, IGF und die sog. BMP (MUNDY, 1999).

Ungeklärt ist die Aufgabe der Osteoblasten bei der Mineralisierung der neugebildeten Knochenmatrix. Das frisch gebildete weiche organische Material, auch Osteoid genannt, wird durch Einlagerung von Calciumphosphat-Kristallen in harte Knochenmatrix umgewandelt (ALBERTS et al., 1995).

Noch nicht endgültig geklärt ist, inwieweit Osteoblasten für die Resorptionsvorgänge nötig sind. Sie könnten einerseits die Funktion der Osteoklasten unterstützen, möglicherweise über Zellkontakte zu Osteoklasten oder deren Vorläufern oder durch die Sekretion von Botenstoffen. Andererseits könnten sie die Knochenoberfläche durch das Ausscheiden proteolytischer Enzyme für die Resorption durch Osteoklasten vorbereiten (MUNDY, 1999).

### 2.2.2 Osteozyten

Osteoblasten, die in die Knochenmatrix eingebettet sind, werden als Osteozyten bezeichnet. Diese Zellen kommunizieren untereinander und mit den Zellen an der Matrixoberfläche über ihre dendritischen Fortsätze. Diese Fortsätze scheinen jedoch die Grenzen der Osteone nicht zu überschreiten.

Innerhalb eines Osteons formen die Osteozyten untereinander über Gap junctions an ihren Ausläufern ein synzytiales System. Insgesamt entstehen zwei „Netzwerke“: eines intrazellulär und ein zweites extrazellulär zwischen Osteozytenmembran und Knochenmatrix (NIJWEIDE et al., 1996).

Funktionell sind die Osteozyten an der Matrixsynthese beteiligt, wobei jedoch die begrenzte Sekretion spezifischer Matrixproteine im Vordergrund steht. Da die Mineralisationsfront hinter der Osteoidbildung zurückbleibt, wird vermutet, daß die Osteozyten zur Osteoidreifung benötigt werden; eine Rolle bei der Kalzifizierung scheint möglich. Mittels Immunhistochemie und In-Situ-Hybridisierung läßt sich die Synthese von OC, ON und auch Fibronectin, OPN bzw. Typ-I-Kollagen nachweisen. Diese Proteine sind an der Mineralisierung beteiligt (siehe unten) (NIJWEIDE et al., 1996).

Es lassen sich Hormonrezeptoren für PTH, 1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D<sub>3</sub> und Östrogen nachweisen. Parathormon kann die Anzahl der Verbindungen zwischen den Osteozyten verändern und so Einfluß auf die Regulation nehmen. Die PTH-induzierte Resorption von Knochenmatrix wird jedoch hauptsächlich durch die Osteoklasten vermittelt. Während die Osteoblasten und -klasten die Grobeinstellung der Kalzium-Homöostase gewährleisten, scheinen die Osteozyten für die Feinregulation nötig zu sein.

Es gibt Anhaltspunkte dafür, daß die Hauptaufgabe in der Reaktion auf mechanischen Streß liegt. Durch mechanische Veränderungen wird ein sog. „stress induced fluid flow“ der interstitiellen Flüssigkeit erzeugt. Auf diese Weise läßt sich der Einfluß mechanischer Veränderungen auf Resorptions- und Formationsvorgänge erklären (NIJWEIDE et al., 1996).

### 2.2.3 „Lining Cells“

„Lining cells“ sind flache Zellen mit schmalen Zellkernen, die auf der Oberfläche inaktiven Knochens liegen. Im System der Knochenkanälchen befindet sich eine spezifische Knochenflüssigkeit („bone fluid“). Diese wird von der Flüssigkeit des Extrazellulärraumes durch eine Membran getrennt. Diese Membran wird möglicherweise durch die „lining cells“ gebildet. Es scheint so, als ob eine Barriere für Calcium besteht, welches in der Extrazellulärflüssigkeit wesentlich höher konzentriert vorkommt. Auf diese Weise könnte die Knochenmatrix vor kurzfristigen Schwankungen der Calcium- Konzentration abgeschirmt werden (MUNDY, 1999).

### 2.2.4 Osteoklasten

Das Vorkommen der Osteoklasten ist auf endostale Knochenoberflächen, auf die Oberflächen der Haversschen Systeme und -seltener- auf die periostalen Oberflächen beschränkt. Es handelt sich um große multinukleäre Zellen mit bis zu 100 Kernen. Beim M. Paget ist die Anzahl der Nuclei eher erhöht, bei hämatologischen Neubildungen eher vermindert (MUNDY, 1999).

Auf zellulärer Ebene findet man ein bis zwei Nucleoli, primäre Lysosomen, zahlreiche und vielgestaltige Mitochondrien und die spezifischen gewellten Areale der Zellmembran (sog. „ruffled borders“), die den Knochenoberflächen anliegen. Hier befinden sich zahlreiche Auffaltungen und Invaginationen, die zu einer Oberflächenvergrößerung im Kontaktbereich zur Knochenmatrix führen. Die Resorptionvorgänge in diesem Bereich führen morphologisch zu den sog. Howshipschen Lakunen als Korrelat der resorbierten Knochenmatrix. Im Zellinneren lassen sich an diesen gewellten Membrananteilen zahlreiche Aktinfilamente nachweisen, die den Kontakt zur Knochenmatrix zu stabilisieren scheinen (MUNDY, 1999).

Zur Zeit ist es noch nicht möglich, charakteristische Einzelkriterien für Osteoklasten zu benennen. Als Identifikationskriterien dienen bislang die Mehrkernigkeit, die pleomorphen Mitochondrien und das Vorhandensein der „ruffled borders“. Typisch ist das Vorkommen von Tartrat-resistenter saurer Phosphatase, diese erscheint jedoch auch in der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie (MUNDY, 1999).

Im Gegensatz zu den Osteoblasten stammen die Osteoklasten aus der Blutzirkulation. Das derzeit plausibelste Konzept besagt, daß der Osteoklasten-Vorläufer eine mononukleäre Zelle aus dem hämatopoetischen Gewebe ist. Osteoklasten formen sich dann durch Fusion mehrerer solcher Zellen. Die Ursprungszelle scheint die Stammzelle der MonozytenMakrophagen-Familie zu sein. Promonozyten können entweder den Weg zu Gewebemakrophagen oder zu Osteoklasten nehmen, abhängig von den jeweiligen örtlichen und zeitlichen Faktoren. Frühe Präosteoklasten zirkulieren in der Blutbahn und sind bei Krankheiten mit verstärkter Resorption, wie z.B. dem primären Hyperparathyreoidismus oder beim M. Paget, vermehrt anzutreffen.

Am Ende des Resorptionsprozesses können sich die Klasten entweder zu anderen Resorptionszonen fortbewegen, oder sie gehen durch Apoptose zugrunde. Dieser Vorgang ist durch morphologische Veränderungen bestimmt und scheint durch Resorptionshemmer (Östrogene, Bisphosphonate) veränderbar zu sein. Auf molekularer Ebene sind hauptsächlich proteolytische Enzyme und Wasserstoffionen an der Resorption im Bereich der gewellten Membrananteile beteiligt. Insgesamt ist ein sehr differenziertes System aus Ionenaustauschern, Pumpen und Kanälen nötig, um die Resorptionsfunktion aufrecht zu erhalten (MUNDY, 1999).

Viele Fakten über die einzelnen Funktionschritte der Osteoklasten lassen sich von dem Krankheitsbild der Osteopetrose ableiten, hierbei ist die Resorption (d. h. die Osteoklastenfunktion) auf verschiedenen Ebenen gestört.

### 2.3 Anorganische Knochenbestandteile: Mineral

Anorganische Bestandteile machen rund 2/3 des Knochengewebes aus. Der Hauptbestandteil ist das HA. Des weiteren findet man in geringeren Mengen Magnesium, Kalium, Chlor, Eisen und Karbonat (DERMIETZEL, 1994).

### 2.4 Organische Knochenbestandteile: Proteine

90 Prozent der organischen Knochenmatrix bestehen aus Kollagen. Zehn Prozent setzen sich aus nicht-kollagenen Proteinen und Lipiden zusammen. Hierunter bildet ON mit ca. 1/4 die größte Fraktion, gefolgt von OC, Sialoprotein, Phosphoproteinen, Glykoproteinen, Proteoglykanen und Albumin.

#### 2.4.1 Kollagen

Kollagen ist das am häufigsten vorkommende Protein der Wirbeltiere, es macht rund ein Viertel des Proteingehalts des menschlichen Körpers aus. Es ist der Hauptbestandteil von Knochen, Sehnen, Bändern und Haut. Die Kollagen-Familie umfaßt 15 biochemisch und strukturell unterschiedliche Typen. Charakteristisch ist das gehäufte Vorkommen der Aminosäuren Glycin, Prolin und Hydroxyprolin.

Grundsätzlich lassen sich die Kollagene in drei Hauptgruppen einteilen: fibrilläre, fibrillen-assoziierte und nicht-fibrilläre Kollagene. In der Gruppe der fibrillären Kollagene finden sich die Typen I, II, III, V und XI. Charakteristisch ist die Fähigkeit zur Fibrillenbildung der aus den jeweils drei zur typischen Tripelhelix zusammengelagerten Proteinketten bestehenden Moleküle. Typ I bildet die Fibrillen des straffen und lockeren Bindegewebes und des Knochens, Typ II ist der Hauptbestandteil von Knorpelgewebe und des Glaskörpers des Auges. Typ III zeigt eine ähnliche Verteilung wie Typ I, es kommt jedoch nicht in Knochen und Sehnen vor. Typ V ist im Vorkommen eng mit Typ I assoziiert, Typ XI mit Typ III, wobei möglicherweise die Dicke der Fibrille durch die Typen V und XI determiniert wird (DERMIETZEL, 1994). Die Kollagene IX,

XII und XIV gehören zur Gruppe der Fibrillen-assoziierten Kollagene und scheinen eine Bindefunktion zwischen den fibrillären Kollagenen und Komponenten der extrazellulären Matrix innezuhaben (ROSSERT und DE CROMBRUGGHE, 1996). Das nicht-fibrilläre Kollagen IV bildet als Maschenwerk die Lamina densa der Basalmembranen, Typ VI bildet Filamente im lockeren und straffen Bindegewebe, Typ VII baut die Ankerfibrillen der Haut auf. Kollagen X kommt im hypertrophen Knorpel der Epiphysenfuge vor (DERMIETZEL, 1994).

Die charakteristische Tripelhelix wird zumeist aus zwei alpha-1-Ketten und einer alpha-2-Kette geformt. Den Enden der Tripelhelix schließen sich jeweils das N- und das C-terminale Propeptid an, hier weichen die drei Ketten auseinander und laufen parallel zueinander als sog. Telopeptide.

Typ-I-Kollagen wird als Propeptid sezerniert. Das N-terminale Propeptid wird ebenso wie das C-terminale durch spezifische Proteasen (Prokollagenpeptidasen) nach Übertritt in den Extrazellularraum entfernt (DERMIETZEL, 1994). Das N-terminale Propeptid verbleibt als 24kD-Phosphoprotein in der Knochenmatrix (BÄTGE et al., 1993).

Die „reifen“ Moleküle, Tropokollagenmoleküle genannt, lagern sich zu Fibrillen zusammen, wobei zwischen den einzelnen aneinandergereihten Molekülen Lücken bleiben, die die elektronenmikroskopisch sichtbaren Banden darstellen. Als parallele Bündel können Sehnen gebildet werden, zufällig orientierte Netzwerke treten in der Haut auf. Im Knochengewebe scheinen Hydroxylapatit-Kristalle in diese Lücken eingelagert zu sein (ROSSERT und DE CROMBRUGGHE, 1996).

Die Funktion des N-terminalen Propeptids ist weitgehend unbekannt. Es könnte eine Rolle spielen bei der Regulation des Durchmessers der jeweiligen Fibrille oder der Transkriptionsrate der Typ-I-Ketten. Auf jeden Fall scheint die Entfernung dieses Propeptids die Voraussetzung für die Fibrillenentstehung zu sein (ROSSERT und DE CROMBRUGGHE, 1996).

Nach der Translation scheinen die C-terminalen Propeptid-Anteile der drei Ketten in Zusammenhang zu stehen mit der Ausbildung von Disulfid-Brücken innerhalb und zwischen den Ketten. Die Vereinigung der drei Ketten zur Tripelhelix beginnt am C-terminalen Ende und setzt sich dann in Richtung auf das N-terminale Ende fort. Das Abtrennen der beiden Propeptide in der extrazellulären Matrix vermindert die Löslichkeit der beiden Moleküle. Sie scheinen über einen Feedback-Mechanismus an der Regulation der Kollagensynthese beteiligt zu sein (ROSSERT und DE CROMBRUGGHE, 1996).

Zusammenfassend dargestellt scheinen die beiden Propeptide folgende Funktionen zu haben: sie regulieren in der Zelle die Bildung der dreisträngigen Kollagen-Moleküle und verhindern, daß vor der Sekretion in der Zelle zu lange Fibrillen entstehen, die nicht von den Sekretionsmechanismen angenommen würden. Durch ihre Entfernung außerhalb der Zelle scheinen sie dann durch die Änderung des Lösungsverhaltens des Moleküls Einfluß zu nehmen auf die Fibrillenbildung (ALBERTS et al., 1995).

Als kurzer Überblick werden nachfolgend die Wirkungen von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Hormonen und Vitaminen dargestellt.

TGF-beta wird von Monozyten, Makrophagen, Lympho- und Thrombozyten, Fibro- und Osteoblasten und Osteoklasten synthetisiert und führt zu einem Anstieg der Typ-I-Kollagen-Synthese in Fibro- und Osteoblasten. Generell kommt es zu einer Verstärkung der Faktoren, die für die extrazelluläre Matrix-Bildung verantwortlich sind, und zu einer Hemmung aller die Matrix abbauenden Faktoren (Proteasen vermindert, Proteaseninhibitoren vermehrt).

IL-1 -hauptsächlich sezerniert von Monozyten und Makrophagen- hat einen hemmenden Effekt auf die Typ-I-Kollagen-Produktion von Osteoblasten. Nur bei niedrigen Spiegeln von IL-1 kann dieser Effekt durch die Erhöhung von PGE<sub>2</sub>, welches die Kollagen-I-Synthese fördert, maskiert werden. Sehr hohe Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> hingegen können andererseits die Synthese von Kollagen-1 hemmen.

IGF-I stimuliert die Proliferation von Fibro- und Osteoblasten und führt zu einem Anstieg der Kollagensynthese.

Kortikosteroide vermindern die Synthese von Typ-I-Kollagen. Dies kann zum einen indirekt über die Hemmung von IGF-I geschehen, zum anderen direkt auf prätranslatorischer Ebene.

PTH hemmt die Synthese, Vitamin D bzw. dessen aktiver Metabolit 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> hat unterschiedliche Effekte, je nachdem wie „gereift“ die Osteoblasten sind (früh: Förderung, spät: Hemmung der Synthese) (ROSSERT und DE CROMBRUGGHE, 1996)

#### 2.4.2 Osteocalcin

OC ist ein Calcium-bindendes Protein und macht 10-20 % des nicht-kollagenen organischen Materials der extrazellulären Knochenmatrix aus. Das Molekül besteht aus 47-50 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht zwischen 5200 und 5900. Es wird angenommen, daß OC größtenteils von den Osteo- und Odontoblasten synthetisiert wird (VERMEULEN et al., 1989).

Charakteristisch für das Molekül sind eine Disulfidbrücke und drei Gla-Reste, diese werden nach der Transkription mit Hilfe einer Vitamin K- und CO<sub>2</sub>-abhängigen Carboxylase gebildet. Die Gla-Reste bedingen wahrscheinlich die Fähigkeit von OC, an Calcium und HA zu binden. Aus diesem Grund lagert sich OC in die Knochenmatrix ein. Eine Behandlung mit dem Vitamin K-Antagonisten Warfarin führt zu einem nur schwach carboxylierten OC mit geringerer Affinität zu HA, gleichzeitig kommt es zu starken Mineralisierungen der Wachstumsfugen. Dies läßt auf eine regulierende Funktion des OC bei der Mineralisierung schließen (BÄTGE et al., 1993).

Nanomolekulare Konzentrationen des OC werden in die Blutzirkulation abgegeben. Hierbei handelt es sich um neu synthetisiertes OC und nicht um OC aus Degradationsprozessen, so daß OC als Marker der Knochenformation eingesetzt werden kann. OC korreliert mit der AP, einem weiteren Marker der Osteoblastenfunktion (LIAN und GUNDBERG, 1987).

OC wird von den Osteoblasten erst gebildet, wenn diese vollständig ausdifferenziert sind, und zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Mineralisierung in die Extrazellulärmatrix sezerniert. Genetische Experimente ergaben, daß drei für OC codierende Gene existieren, die Seite-an-Seite auf der DNA liegen. Ihre codierenden Sequenzen sind in hohem Maße identisch, die für Gla codierenden Sequenzen auf allen drei Genen enthalten.

Genannt werden die Gene OC-Gen 1 (OG 1), OC-Gen 2 (OG 2) und OC-related gene (ORG). Die unterschiedlichen Gene werden zu unterschiedlichen Zeiten während der Differenzierung und an unterschiedlichen Orten exprimiert. So ist OG 1 und OG 2 im Knochen aktiv, ORG hingegen in der Niere. Spekuliert wird, daß diese drei Gene eine gemeinsame Regulationseinheit besitzen, von der sie je nach Differenzierung des Gewebes und Lokalisation aktiviert werden (DEBOIS und KARSENTY, 1995).

Die genaue Funktion des OC ist weiterhin spekulativ. OC scheint als negativer Regulator bei der Knochenmineralisation zu wirken. So ließe sich auch das späte Auftreten während der Knochenformation erklären. Experimentell wurden mit Warfarin (Vitamin K- Antagonist) behandelte Knochenpartikel, die somit funktionseingeschränktes OC enthalten, Ratten subkutan eingepflanzt. Hierbei wurde weniger Knochen resorbiert, und es wurden weniger Osteoklasten vorgefunden als erwartet (DEBOIS und KARSENTY, 1995).

OC scheint die Ausdifferenzierung von osteoklastären Zellen zu fördern und diese zum neu formierten Knochen zu rekrutieren. Eine Studie ergab, daß OC-enthaltende Apatitpartikel die Differenzierung von multinukleären resorbierenden Zellen fördern. Mit Partikeln ohne OC stellte sich dieser Effekt nicht ein (GLOWACKI et al., 1991). Neuerdings wurde entdeckt, daß OC mit OPN Komplexe bilden kann. OPN ist ein Zelladhäsionsprotein, das mit Osteoklasten interagieren kann. Dieser Komplex könnte möglicherweise die Osteoklasten rekrutieren (DEBOIS und KARSENTY, 1995).

Die OC-Serum-Konzentration gibt den Anteil an neu synthetisiertem Protein wieder, der nicht in die mineralisierte Phase eingebunden wird. Klinisch findet sich eine niedrige Konzentration, wenn die Knochenbildung auf niedrigem Niveau abläuft („low turnover“), und umgekehrt finden sich hohe Werte bei „high turnover“-Situationen mit verstärkter Osteoblastenaktivität. So zeigt sich eine hohe OC-Konzentration bei Personen mit ektopen Knochenbildungen und Frakturen. Im Tagesprofil findet man morgens niedrigere Werte als am Nachmittag. Da OC renal filtriert wird, steigt der Serumspiegel bei chronischer Niereninsuffizienz an (LIAN und GUNDBERG, 1987).

Die Konzentrationsbestimmung im Serum erfolgt mittels Radioimmunoassay. Die Antiseren richten sich dabei entweder gegen die carboxyterminale Region des Moleküls oder gegen die Calcium-bindenden Bereiche. Der normale Serumspiegel bei Erwachsenen wird mit  $7,0 \pm 2,5$  ng/ml angegeben. Die Bestimmung muß schnell erfolgen, da OC sehr schnell in Fragmente zerfällt (LIAN und GUNDBERG, 1987).

Neuerdings wurde auch ein monoklonaler Antikörper gegen die N-terminalen 20 Aminosäuren entwickelt. Diese Sequenz ist bei Ratten und Menschen identisch; insgesamt treten kaum Kreuzreaktionen auf. Der Vorteil der Methode liegt in einer zuverlässigen Messung auch nach längerer Lagerzeit (bis 8 h) (EGUCHI und HOSODA, 1995).

### 2.4.3 Osteopontin

Osteopontin gehört zu den Proteinen mit RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Asparagin). Diese Sequenz steht mit Adhäsionsvorgängen an der Zelloberfläche über Integrine (Adhäsionsrezeptoren) im Zusammenhang und ermöglicht eine Interaktion des Bindegewebes mit der extrazellulären Umwelt. Osteopontin ist ein Phosphoprotein und kann in Osteoblasten, Osteozyten und deren Vorläufern nachgewiesen werden. Es ist jedoch nicht knochenspezifisch und kommt auch in Uterus, Plazenta, Niere und Nervengewebe vor (BÄTGE et al., 1993). Das Protein weist eine Region auf, die aufgrund ihres hohen Anteils an Säuren eine hohe Affinität zu HA besitzt. Es scheint eine Brückenfunktion zwischen dem Mineral und zellulären Bestandteilen innezuhaben. Über die oben angegebenen Mechanismen können Osteoklasten an der Knochenmatrix verankert werden, jedoch ist auch eine Interaktion mit den Osteoblasten wahrscheinlich. Regulativ wirken einerseits Hormone (PTH und  $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin  $\text{D}_3$ ), andererseits Zytokine. Es konnte nachgewiesen werden, daß TGF-beta die OPN-Produktion stimulieren kann.

OPN wird zeitlich gesehen direkt vor dem Beginn der Mineralisation gefunden. Es wird vermutet, daß es einen ungerichteten Kristallwuchs verhindert und dafür sorgt, daß der richtige Kristalltyp (HA) entsteht. Eine Funktion als Nukleator konnte nicht nachgewiesen werden, möglicherweise spielt das Protein bei der Reparatur von Gewebeschäden eine Rolle (BÄTGE et al., 1993; ROACH, 1994; LIAN et al., 1999).

Die lichtmikroskopisch sichtbaren Zementlinien im Knochengewebe werden als Folge der osteoklastären Resorption durch die saure Phosphatase gedeutet. In Knochengewebe von Hühnern, Schweinen, Affen und auch Menschen ließ sich nachweisen, daß OPN verstärkt an diesen Linien zu finden ist. Folglich läßt sich eine Funktion als Anheftstelle für Osteoklasten und eine Rolle bei der Resorption vermuten (ROACH, 1994).

#### 2.4.4 Osteonektin

ON bildet die größte Fraktion innerhalb der nichtkollagenen Proteine in der Knochenmatrix. Es ist jedoch auch in anderen Geweben weit verbreitet. Interessant ist die Häufung in Geweben mit hoher Proliferationsrate (Epithelien, Thrombozyten). Es handelt sich um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 30-45 kDa, mehreren intramolekularen Disulfid-Gruppen und mehreren Kalzium-bindenden Domänen. Außerdem weist es Regionen mit erhöhter Affinität zu HA und auch Typ-I-Kollagen auf. Aufgrund dieser hohen Bindungsfähigkeit scheint dem Protein eine Rolle bei der Nukleation der Mineralkristalle zuzukommen. Die genaue Funktion ist jedoch noch unklar. Möglicherweise ist ON als negatives Regulationselement an der Mineralisation des Osteoids beteiligt und verhindert einen ungehemmten Kristallwuchs. Auch bei diesem Protein ist eine Regulation durch  $1,25(\text{OH})_2\text{-Vitamin D}_3$  und TGF-beta nachgewiesen (BÄTGE et al., 1993; ROACH, 1994; LIAN et al., 1999).

#### 2.4.5 Decorin

DEC gehört mit Biglycan zu der Familie der Proteoglycane. Es besitzt ein Core-Protein und eine Chondroitinsulfat-Seitenkette. Nachzuweisen ist es im Extrazellulärraum von Binde- und Knochengewebe. Im letzteren ist es im Bereich der Knochenneubildungszonen in der neu synthetisierten Matrix zu finden. Zu Beginn der Knochenformation herrschen Versican und Hyaluronan vor, erst im späteren Verlauf werden DEC und Biglycan nachweisbar. DEC liegt den Kollagenfibrillen an und hat vermutlich eine regulierende Funktion im Rahmen der Fibrillogenese. Insbesondere scheint der Fibrillendurchmesser durch DEC determiniert zu werden.

Außerdem ist eine Bindungsfähigkeit an TGF-beta festgestellt worden. Möglicherweise kann die Aktivität von Faktoren aus der TGF-beta-Familie im Extrazellulärraum modifiziert werden, auf diese Weise ist ein Einfluß auf die Zellproliferation und -differenzierung denkbar. Insgesamt ist die Funktion aber noch nicht in allen Einzelheiten geklärt (BÄTGE et al., 1993; LIAN et al., 1999).

## 2.5 Veränderungen des Knochengewebes bei Tumorinfiltration

### 2.5.1 Epidemiologische Daten

Das Knochengewebe ist das am dritthäufigsten von einer Metastasierung betroffene Organsystem. Meist zeigt eine Knochenmetastasierung an, daß die Tumorerkrankung inkurabel ist. Ernsthafte klinische Symptome wie Spontanfrakturen und Nervenkompressionssyndrome treten in Erscheinung. Die meisten Skelettmetastasen entstehen beim Mamma-, Prostata-, Bronchial-, Nierenzell- und Schilddrüsen-Karzinom. Es lassen sich osteolytische von osteoblastischen Metastasen -meist bei Prostata- und Mammakarzinomen- unterscheiden. Laborchemisch fällt eine Erhöhung der AP und ein erhöhter OC-Spiegel im Serum auf. Außerdem kann sich ein paraneoplastisches Hyperkalzämiesyndrom entwickeln (SCHULZ, 1995).

Tabelle 1 Häufigkeit der Skelettmetastasen bei Autopsien

Tumor	Mamma	Prostata	Schild- drüse	Niere	Lunge	Harn- blase	Cervix
Frequenz (%)	50-85	60-85	28-60	33-60	32-64	42	50

verändert nach Galasko (1986)

Tabelle 2 Zerstörungen durch Knochenmetastasen in der Skelettszintigraphie

Primärtumor	Verteilung der Skelettmetastasen in % (Mehrfach-Metastasierungen inkl.)				
	Schädel	Wirbelsäule	Thorax	Becken	Extremitäten
Mamma	28	60	58	38	32
Bronchien	16	43	65	25	27
Prostata	14	60	50	57	38
Cervix	26	26	22	43	43
Harnblase	13	47	53	47	7
Rektum	21	36	29	43	43

Tofe et al. (1975)

Klinisch erfolgt die Metastasensuche radiologisch (Nativröntgen, Skelettszintigraphie), pathologisch (Histologie der Gewebeprobe) und laborchemisch.

Auch bei hämatologischen Neubildungen ist das Skelett meist beteiligt. Während beim multiplen Myelom meist eine Kombination aus lokalisierten osteolytischen und generalisierten osteopenischen Veränderungen auftritt, kommt es bei malignen Lymphomen sowohl zu osteoblastischen als auch zu osteolytischen Veränderungen (MUNDY, 1999).

Generell werden die Skelettabschnitte infiltriert, die eine stärkere Vaskularisation aufweisen, wie das rote Knochenmark des Achsenskeletts, die proximalen Enden der Röhrenknochen und die Rippen. Ein Grund für die spezifische Verteilung der Metastasen bei den unterschiedlichen Primärtumoren wird im Verlauf des Abströmungsgebietes gesehen, obwohl noch nicht alle Mechanismen vollständig geklärt sind. Beispielhaft ist die bevorzugte Metastasierung des Prostatakarzinoms in die Wirbelkörper über den paravertebralen Venenplexus.

### 2.5.2 Das paraneoplastische Hyperkalzämiesyndrom

Das paraneoplastische Hyperkalzämiesyndrom ist hauptsächlich mit der osteolytischen Tumorausbreitung, kaum mit der osteoblastischen assoziiert. Häufig tritt es erst in einem Spätstadium der Erkrankung in Erscheinung. Meist findet sich eine laborchemische Hyperkalzämie, bevor die klinischen Symptome einsetzen. Klinische Symptome betreffen das gastrointestinale, das renale, das kardiovaskuläre und das Nervensystem. Im Extremfall kann sich eine hyperkalzämische Krise mit Koma und Tetraplegie ausbilden, gefürchtet ist auch der Herzstillstand in der Systole. Bei hospitalisierten Patienten stehen die neoplastischen Erkrankungen als Ursache an erster Stelle. Insgesamt machen Neoplasien und der primäre Hyperparathyreoidismus mehr als 90% aller Fälle aus (KECK, 1996).

Im Falle einer paraneoplastischen Hyperkalzämie steht einerseits eine vermehrte Kalziumfreisetzung aus dem Knochen durch stimulierte Osteoklastentätigkeit im Vordergrund, andererseits scheint jedoch auch die Nierenfunktion eine Rolle zu spielen.

Folgende humorale Faktoren spielen eine Rolle bei der Entstehung der Hyperkalzämie: PTH-rP erscheint bei vielen Karzinomen und auch bei T-Zell-Lymphomen. Es hat die Fähigkeit, an den PTH-Rezeptor zu binden und so die PTH-Effekte zu erzeugen. PTH-rP ist ein wichtiger lokaler Mediator der Knochenresorption. Nach neueren Vorstellungen ist es sowohl für die humorale generalisierte Hyperkalzämie als auch für die lokalen Osteolysen verantwortlich, die auch ohne eine generalisierte Hyperkalzämie auftreten können. Seine Produktion kann durch andere lokal produzierte Faktoren weiter verstärkt werden.

Abkömmlinge der IL-1-Gruppe haben eine hohe resorptionsfördernde Potenz. IL-1alpha wird von vielen Karzinomzellen gebildet und scheint zusammen mit PTH-rP zur Hyperkalzämie zu führen. IL-1beta scheint beim multiplen Myelom für eine Resorptionsverstärkung mitverantwortlich zu sein.

TGFalpha stimuliert die osteoklastäre Knochenresorption. Es hat synergistische Effekte mit PTH-rP und wird von vielen Karzinomzellen, insbesondere bei vorliegendem Mamma-Karzinom, gebildet. Die Wirkung wird über eine Stimulation der Osteoklasten-Reifung erzeugt.

In diesem Zusammenhang sind weiterhin folgende Faktoren von Bedeutung: TNF, Lymphotoxin, IL-6, PGE und 1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D<sub>3</sub> (MUNDY, 1999).

### 2.5.3 Pathophysiologie der Metastasierung

Grundsätzlich läßt sich der Prozeß der Metastasierung in folgende Stadien unterteilen: In der Invasionsphase schaffen sich Tumorzellen durch lytische Enzyme Zugang zum Gefäßsystem. Hierbei ist die Überwindung von Basalmembranstrukturen von entscheidender Bedeutung. In der Embolisationsphase werden Tumorzellen in andere Organe verschleppt, dort bleibt ein geringer Teil der Zellen in der Implantationsphase über spezielle Mechanismen an den Endothelien heften. Durch die nun folgende Gefäß- penetration wird die Möglichkeit zum Metastasenwachstum geschaffen (MÜLLER, 1995). Das Anheften an andere Zellen und extrazelluläre Strukturen wird durch CAMs vermittelt. Das Glykoprotein E-Cadherin, welches in der Embryogenese eine Rolle spielt, scheint an der Tumordinvasion beteiligt zu sein. Proteolytische Enzyme und Typ-IV-Kollagenase führen zu einer Zerstörung der Basalmembran. Am Ort der Metastasierung

müssen von den Tumorzellen CAMs ausgebildet werden (Fibronectin, Laminin), um über eine erneute Zerstörung der Basalmembran in das Gewebe eindringen zu können.

Im Knochengewebe selber finden sich chemotaktische Faktoren für Tumorzellen. Hierzu zählen Fragmente von Typ-I-Kollagen und OC sowie weitere unbekannte Faktoren (MUNDY, 1999).

#### 2.5.4 Pathophysiologie der osteolytischen Metastasen

Der wichtigste Mechanismus im Zusammenhang mit der Entstehung von tumorinduzierten Osteolysen scheint eine Verstärkung der Osteoklastenaktivität zu sein. Auch eine durch die Tumorzellen direkt vermittelte Resorption wäre denkbar. Mit elektronenmikroskopischen Techniken sind jedoch zumeist durch Osteoklasten-Resorption bedingte Lakunen zu sehen und keine Resorptionszonen, die mit der Größe der Tumorzellen korrespondieren (MUNDY, 1999).

Andererseits fällt auch auf, daß osteoklastenhemmende Pharmaka, wie z. B. Bisphosphonate, den tumorvermittelten Knochenmasseverlust einschränken.

Zu den Mediatoren, die die Osteoklasten-stimulierende Wirkung vermitteln, gehört das PTH-rP. Immunhistochemisch läßt sich eine verstärkte Expression sowohl im von Metastasen befallenen Knochen als auch im Primärtumor bei Patientinnen mit Mammakarzinom nachweisen. Diese verstärkte Expression ist anscheinend durch TGF-beta vermittelt, einen Faktor, der bei der Resorption vermehrt abgegeben wird. Das Tumorwachstum wird im Knochengewebe besonders gut aktiviert, da in dieser Umgebung eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren vorliegt. Insbesondere TGF-beta kann die Tumorzellen insofern verändern, als die Produktion von PTH-rP gesteigert wird (MUNDY, 1999).

Tabelle 3

Wachstumsfaktoren in der Knochenmatrix, in aktiver Form während der Resorption freigesetzt

Bezeichnung	Konzentration (ng/g)
Insulin-like Growth factor II	1.500
Transforming Growth factor beta	450
Insulin-like Growth factor I	100
Platelet-derived Growth factor	60
Basic Fibroblast Growth factor	50
Acidic Fibroblast Growth factor	10
Bone Morphogenetic Protein	1-2

nach Hauschka (1986)

Auch für durch die Resorption freigesetztes Kalzium wird eine proliferationssteigernde Wirkung auf Tumorzellen vermutet. Der Mechanismus ist jedoch nicht bekannt.

#### 2.5.5 Pathophysiologie der osteoblastischen Metastasen

Hierbei kommt es zu einer Formation neuen Knochengewebes, ohne daß vorher eine Resorption stattgefunden hat, wie es für Patienten mit Prostatakarzinom typisch ist. Vermutet wird, daß die Tumorzellen Faktoren freisetzen, die die Knochenformation verstärken. In mehreren Studien sind Modelle mit Prostatakarzinom-Zellen entwickelt worden; es ist jedoch schwierig, die Zellen in vitro so zu kultivieren, daß die spezifischen Eigenschaften erhalten bleiben.

Als Mediatoren kommen in Frage: TGF-beta2, FGF, Plasminogenaktivatoren, BMPs, PTH-rP (PTH-rP hat -ebenso wie PTH- in bestimmten Dosen einen anabolen Effekt) und PSA, welches als Aktivator anderer Wachstumsfaktoren in Erscheinung tritt (MUNDY, 1999).

#### 2.5.6 Sonderfall multiples Myelom

Knochenveränderungen sind beim multiplen Myelom im allgemeinen schwerer und häufiger als bei anderen hämatologischen Neoplasien. Folgen sind unerträglicher Knochenschmerz, pathologische Frakturen und Hyperkalzämie. Beim Plasmozytom ist eine Erhöhung des Serum-Kalziums auch schon deshalb häufiger, da mehrere Ursachen für eine Niereninsuffizienz

vorliegen (Amyloidose, Plasmozytom-Niere, chron. Infekte, Harnsäurenephropathie, Nephrolithiasis).

Wichtig ist auch, daß verschiedene Arten von Knochenläsionen auftreten: einerseits lokalisierte osteolytische Herde, andererseits eine diffuse Osteopenie, die mit einer Osteoporose anderer Ursache verwechselt werden kann. In weniger als ein Prozent der Fälle können auch osteosklerotische Knochenveränderungen auftreten. Die Knochenläsionen werden durch eine verstärkte Osteoklastentätigkeit hervorgerufen. So lassen sich in der Nähe der Myelomzellnester vermehrt Osteoklasten an den Knochenoberflächen nachweisen.

Im Unterschied zu anderen hämatogenen Neoplasien mit Skelettbeteiligung kommt es beim Plasmozytom zu einer Verminderung bzw. Störung der Osteoblastenfunktion. In morphometrischen Untersuchungen ließen sich schmalere Osteoidsäume und eine niedrigere Kalzifikationsrate nachweisen (MUNDY, 1999).

Klinisch wichtige Konsequenzen sind eine fehlende AP-Erhöhung und eine mangelhafte Radiopharmakonaufnahme in der Skelettszintigraphie. Die als Radiopharmakon genutzten <sup>99m</sup>Tc-Phosphatkomplexe lagern sich an der organischen und mineralischen Phase des Knochens je nach Stärke der Osteoblastentätigkeit an (PICKUTH, 1998).

Bekannt ist, daß zirkulierende Leukozyten OAFs abgeben. Lympho- und Monozyten werden bei Antigen-Stimulierung oder Stimulierung durch Mitogene zur verstärkten Produktion der OAFs angeregt. Folgende Zytokine haben eine Funktion als OAF: Lymphotoxin, IL-1beta und IL-6.

Insgesamt scheint eine autoregulative Kopplung zu bestehen, indem einerseits die Myelomzellen Osteoklasten-stimulierende Faktoren abgeben, die aktivierten Osteoklasten und auch weitere Stromazellen dann jedoch über Zytokine das Wachstum der Krebszellen fördern (MUNDY, 1999).

Therapeutisch ist eine Resorptionshemmung Methode der Wahl. Eingesetzt werden Corticosteroide, Calcitonin und Bisphosphonate. Bisphosphonate führen zu einer guten Senkung des Serum-Kalziums und zu einer Schmerzreduktion, können jedoch bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz nicht mehr angewandt werden. In diesem Fall kommen Corticosteroide und Calcitonin in Frage (MUNDY, 1999).

### 3 Fragestellung

Die endostale Oberfläche des Knochens bildet eine wichtige Grenzfläche und Barriere, die zellbiologischen und physikochemischen Einflüssen gegenüber reagibel ist. Sie dient dem Austausch von Mineral und Matrixproteinen mit der umgebenden Extrazellulärflüssigkeit. Sie ist außerdem die Kontaktzone für Knochenoberflächenzellen wie Osteoklasten, „lining cells“ und Osteoblasten, die an Bindungsstellen der Oberflächenstrukturen andocken. Ferner werden unter bestimmten Einflüssen auch Wachstumsfaktoren, die in inaktiver Form an Matrixstrukturen gebunden sind, an der Matrix freigesetzt. Sie dienen der Stimulation des Knochenanbaus sowie möglicherweise auch der Resorption.

Es ist bekannt, daß bei einer Mineralisationstörung (Osteomalazie) die endostale Knochenoberfläche in zunehmendem Ausmaß von unmineralisierten Osteoidsäumen überzogen wird. Ferner muß auch vermutet werden, daß verschiedene Markraumzellen und auch Knochenoberflächenzellen die Matrixgrenzzone in frühen Phasen des Knochenanbaus oder der Knochenresorption modifizieren können. Es ist daher zu erwarten, daß die Beschaffenheit dieser Grenzzone einen feinen Indikator für zelluläre Effekte auf den Knochen darstellen könnte.

In der vorliegenden Studie wurde daher mit immunhistochemischen Nachweisen des Kollagens und der nicht-kollagenen Matrixproteine untersucht, ob sich Oberflächenveränderungen der Knochenmatrix unter Ruhebedingungen im Vergleich zu Situationen mit erhöhter Umbauaktivität nachweisen lassen. Ferner sollte auch geklärt werden, ob pathologische Markrauminfiltrate (Lymphome, Tumorzellen) einen Einfluß auf die Beschaffenheit der endostalen Oberflächen ausüben.

Es wurden hierzu Beckenkammbiopsien nach Demineralisation bei normalen Kontrollpersonen im Vergleich zu pathologischen Knochenmarksbefunden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen COL-I-C und die nicht-kollagenen Knochenproteine Osteonektin, Osteopontin, Osteokalzin und Dekorin sowie gegen Vimentin und PGM1, einem Osteoklasten-Antigen, untersucht.

Die Oberflächenimmunreaktivität wurde bezüglich ihrer Ausdehnung histomorphometrisch quantifiziert und statistisch überprüft.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Untersuchungsmaterial

Bei den ausgewerteten Präparaten handelte es sich ausschließlich um Knochenstanzbiopsie-Präparate, die routinemäßig zur histologischen Diagnostik in das Pathologische Institut gesandt worden sind. Die Entnahme erfolgte im Klinikum der JLU Gießen oder in peripheren Krankenhäusern mit der Jamshidi-Nadel aus dem Beckenkamm. Anhand der schriftlichen Befunde wurden eine Gruppe von Fällen mit normalem Knochengewebe und mehrere Gruppen mit pathologisch verändertem Knochengewebe gebildet. Zu letzteren gehören folgende Krankheitsbilder: Plasmozytome, nicht weiter spezifizierte Lymphome und Skelettkarzinosen.

Bei den gelagerten Blöcken handelte es sich um entkalkte Präparate. Das Entkalkungsmedium ist wie folgt zusammengesetzt:

1000 ml	A. dest.
100 g	Titriplex III (R) (EDTA)
33 g	Tris-Base

Es erfolgte eine Einstellung des pH-Wertes auf 7,2.

Zu Beginn wurden mehrere Schnitte erstellt. Falls nicht schon vorhanden, wurde von jedem Fall zunächst ein Schnitt in HE-Färbung angefertigt. Die weiteren ungefärbten Schnitte wurden der Immunhistologie zugeführt.

### 4.2 Antikörper und immunhistologische Methode

Die methodischen Bedingungen orientierten sich an den Gegebenheiten der histologischen Routine, wobei die immunhistologischen Detektionsverfahren zur besseren Reproduzierbarkeit in einem immunhistologischen Färbeautomaten (DAKO TechMate® 500) erfolgten.

Nach dem Entfetten der Schnitte durch Lagerung für jeweils 10 Minuten in Xylol, Aceton und einem Gemisch aus Aceton und Waschpuffer im Verhältnis 1:2 wurde die immunhistologische

Färbung mit dem APAAP-Komplex durchgeführt. Es wurden kommerziell nicht erhältliche Antikörper gegen Kollagen-I-C-Peptid, DEC, ON, OPN und Osteocalcin als Primärantikörper verwendet, die uns auf Basis einer wissenschaftlichen Kooperation dankenswerterweise zur Verfügung gestellt wurden. Mit Ausnahme des monoklonalen Antikörpers gegen Osteocalcin handelte es sich um polyklonale Antikörper. Zusätzlich erfolgten Färbungen mit einem Anti-Vimentin-Antikörper sowie einem für das CD-68-Antigen spezifischen Antikörper .

Tabelle 4  
In der Immunhistochemie eingesetzte Antikörper

Protein	Abkürzung	Quelle
1. DEC	LF 4	L.H. Fisher (NIH/USA)
2. OPN	LF 7	L.H. Fisher (NIH/USA)
3. ON (human)	LF 37	L.H. Fisher (NIH/USA)
4. COL-I-C	LF 41	L.H. Fisher (NIH/USA)
5. OC	OC	D. Baylink (Loma Linda/ USA)
6. Vimentin	V 9	DAKO Corp.
7. CD68 (PG-M1)	CD68	DAKO Corp.

1. Für die Färbung wird zunächst der Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung aufgetragen. Der Antikörper bindet sich an das Epitop des Knochenmatrixproteins. Die Inkubationszeit beträgt bei Zimmertemperatur 12 Stunden.

2. Nach Abspülen der überschüssigen Antikörperlösung in Tris-Pufferlösung, bestehend aus Tris-Base, Tris-HCl und NaCl, aufgelöst in Aqua bidest. und mit einem pH-Wert von 7,4 bis 7,6, erfolgt die Auftragung des Brückenantikörpers (hier „rabbit-anti-mouse“ der Firma DAKO Z 259). Dieser Antikörper bindet sich an das Fc-Fragment des Primärantikörpers, das jetzt als Antigen fungiert. Die Inkubationszeit beträgt hier 30 Minuten.

Nach erneutem Spülen der Schnittpräparate mit Pufferlösung erfolgt die Benetzung mit dem enzymmarkierten sog. „APAAP-Komplex“. Hier bindet sich nun alkalische Phosphatase, die aus dem Darm von Kälbern gewonnen wird, an Phosphatgruppen der organischen Ester des Brückenantikörpers. Ein Anti-alkalische-Phosphatase-Komplex lagert sich nun an diese Substrat-Enzymbindung an. Die Inkubationsdauer beträgt 30 Minuten.

Nun erfolgt eine Wiederholung des Färbeschrittes 2. und 3. mit jeweils 10 Minuten Inkubationszeit. Eine Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase-Aktivität des Knochengewebes wird durch die Zugabe von Laevamisol erreicht.

Zur Färbung der stattgehabten Immunreaktion müssen die Schnittpräparate nun für 30 Minuten in einer Entwicklungslösung inkubiert werden. Die Entwicklungslösung enthält neben der bekannten Tris-Pufferlösung, Propandiol, Natriumnitrit, Naphtol-As-Bi-Phosphat und Neufuchsin in einem definierten Verhältnis. Dabei wird die Naphtolverbindung durch die gebundene alkalische Phosphatase zu Phenolkomponenten und Phosphaten umgewandelt. Die Phenole kuppeln mit farblosen Diazoniumsalzen, hier Neufuchsin und Natriumnitrit, und bilden so unlösliche Azofarbstoffe.

Nach Spülung mit Tris-Pufferlösung werden die Schnittpräparate mit Hämalaun für 45 Sekunden gegengefärbt und anschließend mit Kaisers Glycerin-Gelatine eingedeckt

6. (BOENISCH, 1989)

#### 4.3 Photodokumentation der unterschiedlichen Verteilungsmuster

Nach Durchsicht der Präparate wurden diejenigen Ausschnitte zur Fotodokumentation herausgesucht, die sich zur visuellen Darstellung am besten eignen. Nicht weiter verwandt wurden Areale, in denen es offensichtlich zu unspezifischen Anfärbungen gekommen oder die Struktur durch die Bearbeitungsprozesse verändert oder zerstört worden ist. Diapositive wurden dann mit einem Mikroskop-Kamera-System erstellt und mit einem elektronischen Datensystem weiterverarbeitet. Mehrere Diapositive wurden jeweils zu Tableaus zusammengestellt; hierbei wurden Abbildungsreihen zusammengefügt, die die o.a. Eigenschaften dokumentieren können. Bei der Auswahl der Abbildungen für das jeweilige Tableau wurde der Versuch unternommen, jeweils übereinstimmende Ausschnitte der einzelnen Präparate auszuwählen, um die Anfärbemuster mit den zugehörigen Strukturen bei dem jeweils ausgewählten Fall zu vergleichen. Aufgrund der histologischen Aufbereitung der Präparate war jedoch eine mehrfache Darstellung einer gleichen Schichttiefe nicht möglich, so daß nur annäherungsweise eine Darstellung identischer Ausschnitte erreicht wurde. Über ein Textverarbeitungssystem wurden die Abbildungen dann in den hier vorliegende Arbeit eingefügt und mit Anmerkungen versehen.

#### 4.4 Vorgehen bei der deskriptiven Auswertung

Hierbei wurden zunächst Serien von Normalfällen und Tumorosteopathien auf einheitliche Verteilungsmuster der Knochenproteine durchgesehen. Diese Eigenschaften wurden auf ihre Konstanz hin überprüft und tabellarisch erfaßt. Allen oben angegebenen angefärbten Proteinen wurden die Anfärbereigenschaften gegenübergestellt. Unterschieden wurden zwischen dem Knochengewebe und dem Markraum.

#### 4.5 Gruppenbildung

Im Folgenden handelt es sich um Beckenkammbiopsien, die routinemäßig im Pathologischen Institut der Universität Gießen befundet und eingelagert worden sind. Zu Beginn wurden anhand

der Befundberichte mehrere Gruppen gebildet, denen Fälle unterschiedlicher Krankheitsbilder zugeordnet wurden.

Im einzelnen: a) Normalbefunde, b) Plasmozytome, c) entzündliche Erkrankungen des Knochengewebes, d) chronische myeloproliferative Erkrankungen, e) Skelettkarzinosen, f) Lymphominfiltrationen, g) Sondergruppe, h) Myelodysplastisches Syndrom.

Aufgrund der insgesamt niedrigen Fallzahlen wurden dann zwei Gruppen gebildet, die in die unten aufgeführte Auswertung einbezogen wurden. Hierbei handelt es sich um:

Gruppe 1	Normalfälle	19 Fälle
Gruppe 2	Lymphominfiltrationen und Skelettkarzinosen [aus Gruppe e) und f)]	8 Fälle

Unter der Hypothese, daß in der Gruppe 1 ein höherer Anteil „aktivierter Oberflächen“ zu finden ist als in der Vergleichsgruppe 2, wurden die im nächsten Absatz angeführten Berechnungen angestellt.

#### 4.6 Histomorphometrische Berechnungen

##### 4.6.1 Berechnung des „Bone Volume“

Durchgeführt wurden die Messungen mit dem sogenannten Merz-Gitter. Hierbei handelt es sich um ein Punktezählverfahren, welches sich das Prinzip von Delesse zunutze macht: Von der Fläche einer zweidimensionalen Struktur läßt sich auf das Volumen und von der Länge ihrer Begrenzungslinie auf ihre Oberfläche im dreidimensionalen Raum schließen. Voraussetzung ist die zufällige Verteilung und Ungerichtetheit der Struktur (MERZ, 1967; OLAH, 1974).

Da die Beckenkammspongiosa jedoch eine Vorzugsrichtung aufweist, muß als Hilfsmittel das Merzgitter eingesetzt werden. Dieses besteht aus zehn parallel verlaufenden, aus aneinandergereihten Halbkreisen bestehenden Linien. So wird die richtungsunabhängige Oberflächenbestimmung gerichteter Strukturen möglich. Zur Bestimmung von Flächen sind auf

den Linien insgesamt 100 Meßpunkte verteilt. Durch Zählen von Schnittpunkten mit den Begrenzungslinien läßt sich in der Relation 1 zu 1,2 die dreidimensionale Oberfläche bestimmen, durch Zählen von Flächenpunkten in der Relation 1 zu 1 das entsprechende Volumen (PARFITT et al., 1987; SCHWARTZ und RECKER, 1981).

Entsprechend der internationalen Nomenklatur kommen im Zusammenhang mit der Auswertung die in Tabelle 5 aufgeführten Abkürzungen vor.

Tabelle 5  
Osteomorphometrische Nomenklatur

T.Ar	Tissue Area (mm <sup>2</sup> ), Messfeld, umfaßt Spongiosa und Markraum
TV	Tissue Volume (mm <sup>3</sup> ), Gewebevolumen, dreidimensionales Äquivalent zu T.Ar.
B.Ar	Bone Area (mm <sup>2</sup> ), Knochenfläche inkl. unmineralisierter Anteile
BV	Bone Volume (mm <sup>3</sup> ), Knochenvolumen, dreidimensionales Äquivalent zu B.Ar. ausgedrückt als BV/Tv (%)
B.Pm	Bone Perimeter (mm), Knochenumfang einschließlich unmineralisiertem Anteil am Übergang zum Markraum
BS	Bone Surface (mm <sup>2</sup> ), Knochenoberfläche, dreidimensionales Äquivalent zu B.Pm.

#### 4.6.2 Berechnung der COL-I-C markierten Oberflächen

Entsprechend dem unter 4.2.3 angegebenen Verfahren wurden die Oberflächen rechnerisch ermittelt, die eindeutig eine Anfärbung für COL-I-C aufwiesen. In den meisten Fällen setzte die Anfärbung deutlich abgrenzbar ein bzw. brach wieder deutlich abgrenzbar ab. In einigen Fällen ergaben sich jedoch auch Übergänge von eindeutig ungefärbten hin zu schwach oder verwaschen

gefärbten und weiter zu stark gefärbten Oberflächen. Sobald eine kontinuierliche Färbung über eine längere Strecke zu sehen war, wurde diese Oberfläche rechnerisch verwertet. Wenn eine Oberfläche wahrscheinlich nur artifiziell gefärbt war (Markierung erscheint verwaschen und reicht bis in die Knochenbälkchen), wurde sie nicht in die Berechnung miteinbezogen. Genauere Kriterien müßten bei zukünftigen Auswertungen definiert werden.

Im nächsten Schritt wurde das prozentuale Verhältnis der markierten Oberfläche zur Gesamtoberfläche bestimmt. Unter der Hypothese, daß die COL-I-C markierten Oberflächen aktivierten, d.h. in An- und Abbauprozesse miteinbezogenen Oberflächen im dreidimensionalen Raum entsprechen, ergibt sich somit durch dieses Auswertungsverfahren ein rechnerischer Schätzwert für die „aktivierten Oberflächen“, der der dreidimensionalen Struktur des Gewebes eher gerecht wird als die deskriptive Auswertung im zweidimensionalen Gesichtsfeld des Mikroskops.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Deskription der Verteilungseigenschaften

In Tabelle 6 wird das Verteilungsmuster der jeweiligen immunhistochemischen Färbung kurz skizziert. Ausführlicher wird im Abschnitt 5.2 auf den Zusammenhang zwischen Anfärbung und Funktion eingegangen.

Tabelle 6  
Verteilungsmuster der Knochenproteine in der immunhistochemischen Färbung

Protein	Abkürzung	Färbung Knochengewebe
1. DEC	LF 4	Osteozyten, Knochenmatrixoberfläche - meist unselektive Abfärbung der gesamten Oberfläche, Knochenlamellen
2. OPN	LF 7	Knochenmatrixoberfläche, Knochenkanälchen, Zementlinien
3. ON (human)	LF 37	Vereinzelt „lining cells“, ansonsten keine Färbung
4. COL-I-C	LF 41	Knochenmatrixoberfläche - häufig selektiv in den Abschnitten mit aktiven kubischen Osteoblasten
5. OC	OC	Lamelläre Markierung der Bälkchenzentren, keine Markierung von Zellen
6. Vimentin	V 9	Osteoblasten, flache endostale Mesenchymzellen
7. CD68 (PG-M1)	CD 68	Osteoklasten

5.2 Darstellung der Ergebnisse

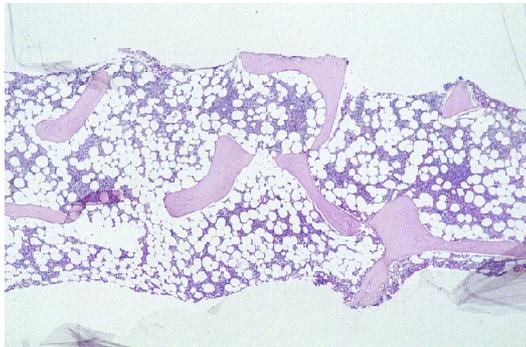


Abb 1.1  
Übersicht HE

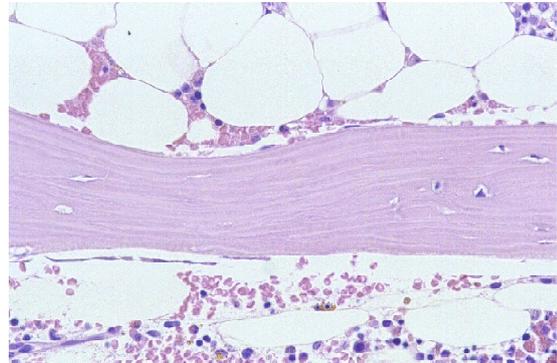


Abb 1.2  
Vergrößerung HE

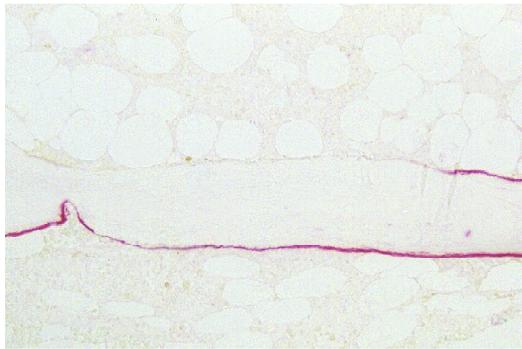


Abb 1.3  
COL-I-C



Abb 1.4  
DEC

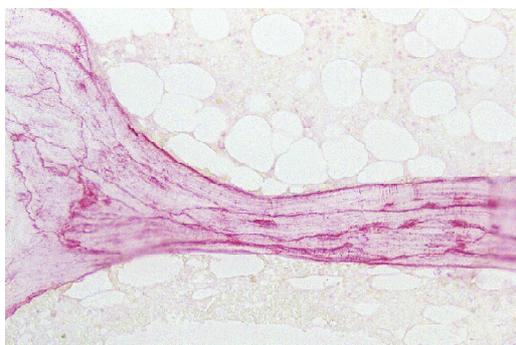


Abb 1.5  
OPN

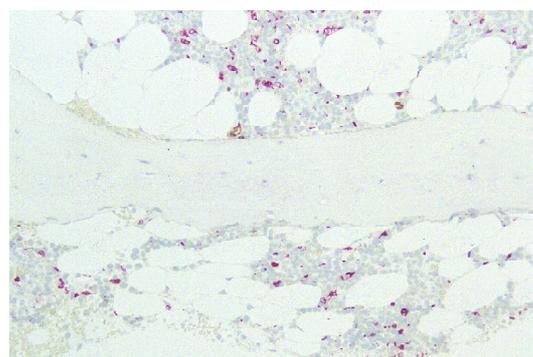


Abb 1.6  
CD 68

Abb.-Tableau 1: Immunreaktivität der Antikörper gegen die Antigene der Knochenmatrix. Es handelt sich um einen Pat. mit unauffälligem Knochenmarksbefund

Die Abbildungen 1.1 bis 1.6 zeigen einen Fall mit unauffälligem Knochenmarksbefund. DEC läßt sich an der Matrixoberfläche und in den Knochenlamellen nachweisen. Die Anfärbung der Matrixoberfläche zieht sich kontinuierlich über den gesamten Bereich des dargestellten Bälkchens. Auch COL-I-C erscheint an den Matrixoberflächen. Im Gegensatz zu DEC sind jedoch nur einige Abschnitte der Oberfläche angefärbt. An bestimmten Punkten bricht die Markierung ab, es folgen unmarkierte Oberflächenabschnitte. Ein Zusammenhang mit dem Funktionszustand der Matrixoberfläche läßt sich in der Abb. 1.2 nur schwer herstellen, da es zu einer artifiziellen Ablösung der Osteoblasten gekommen ist. OPN erscheint ebenfalls im Bereich der Matrixoberfläche. Die Anfärbung ist kontinuierlich. Außerdem sind die Kittlinien angefärbt; es zeigen sich linienartige Anfärbungen mit astartigen Aufzweigungen in der Matrix. Mit dem Antikörper gegen CD 68 lassen sich ein mutmaßlicher Osteoklast sowie die Makrophagenabkömmlinge im Markraum nachweisen.

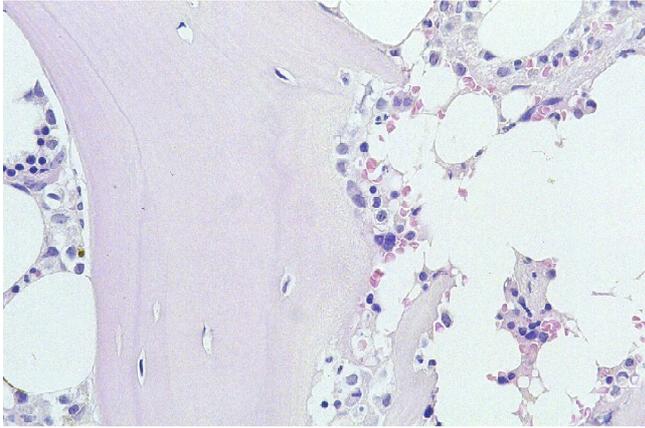


Abb 2.1 HE Resorptionslakunen

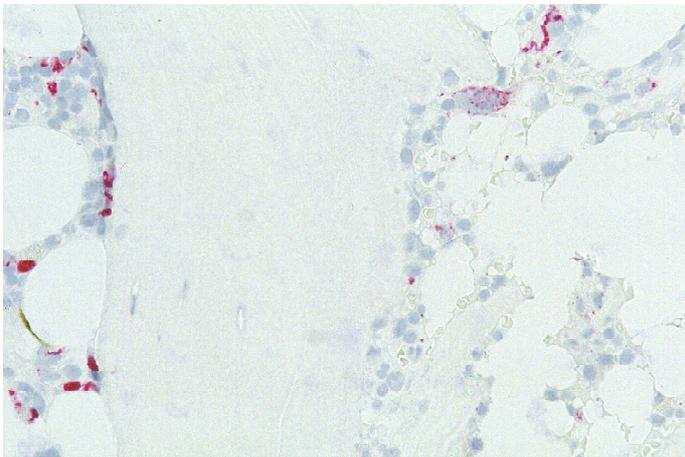


Abb 2.2 CD 68

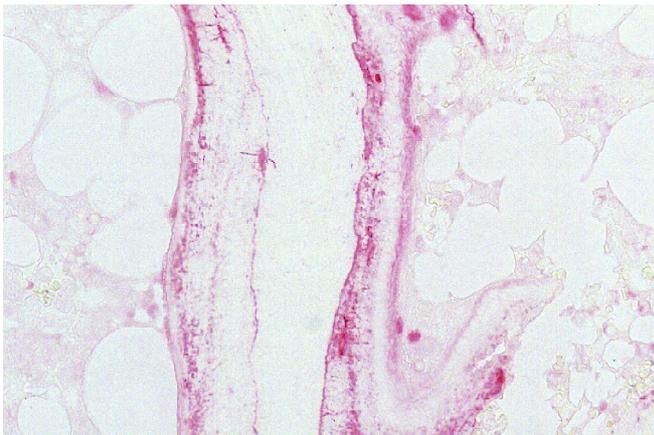


Abb 2.3 OPN

Abb.-Tableau 2: Immunreaktivität der Antikörper gegen OPN und ein Osteoklasten-Antigen (CD68). Es handelt sich um einen Pat. mit unauffälligem Knochenmarksbefund.

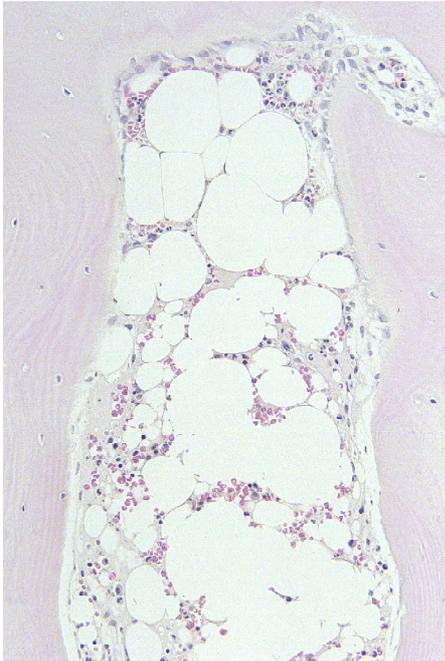


Abb 3.1 HE

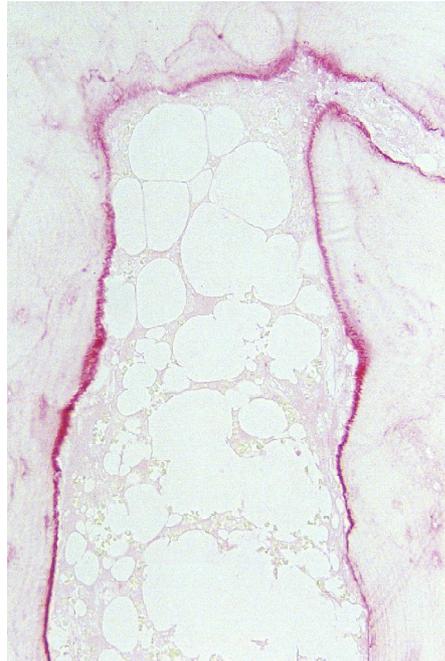


Abb 3.2 DEC



Abb 3.3 COL-I-C

Abb.-Tableau 3: Immunreaktivität der Antikörper gegen DEC und COL-I-C. Es handelt sich um einen Pat. mit unauffälligem Knochenmarksbefund.

Tableau 2 mit den Abbildungen 2.1 bis 2.3 zeigt einen Ausschnitt, in dem sich rechts oben eine Resorptionslakune befindet. Anhand der CD 68-Markierung läßt sich zumindest ein Osteoklast darstellen. In Abb. 2.3 (OPN) zeigt sich die Anfärbung von Osteozyten mit ihren Ausläufern. Außerdem ist die Matrixoberfläche kontinuierlich etwas verwaschen dargestellt, die Anfärbung der Kittlinien zeigt sich in Form von parallel zur Oberfläche verlaufenden Linien.

Im Tableau 3 mit den Abbildungen 3.1 bis 3.3 ist das Verteilungsmuster von DEC dem vom COL-I-C gegenübergestellt. Während DEC an der gesamten Matrixoberfläche nachweisbar ist, zeigt COL-I-C eine selektive Anfärbung der Oberfläche. Unter Berücksichtigung des HE-Präparats 3.1 läßt sich ein Zusammenhang mit dem Funktionszustand der Matrixoberfläche herstellen. So sind auf der rechten Seite des Bälkchens weiter oben kubische Osteoblasten sichtbar. In diesem Bereich findet sich die positive Darstellung von COL-I-C. Im Bereich der Matrixoberfläche rechts unten finden sich flache „lining cells“. Hier findet man eine positive Darstellung von DEC und eine negative von COL-I-C.

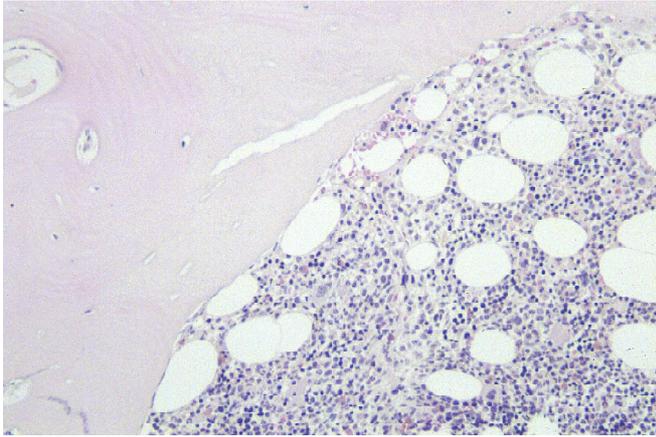


Abb 4.1 HE

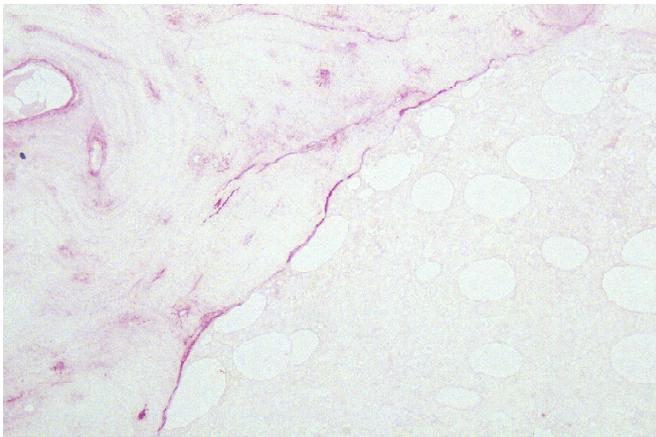


Abb 4.2 DEC

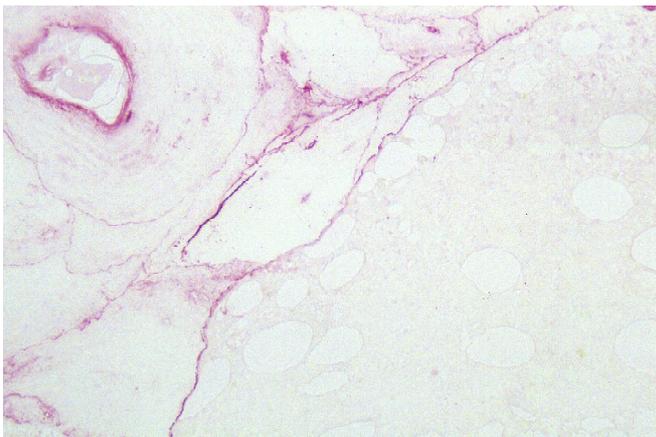


Abb 4.3 OPN

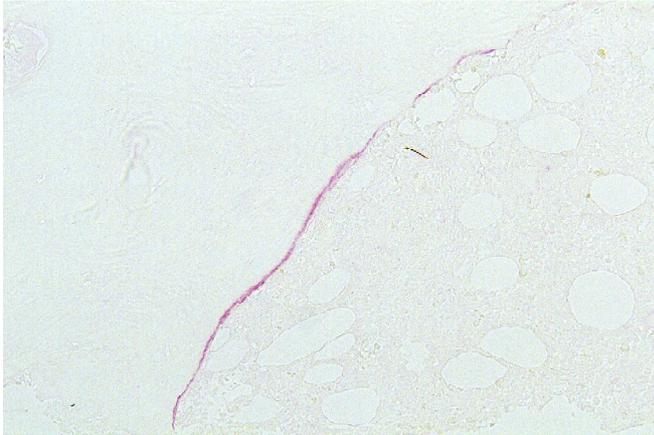


Abb 4.4 COL-I-C

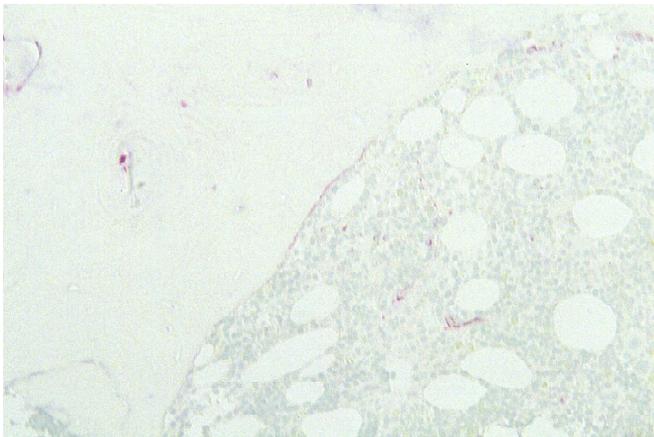


Abb 4.5 Vimentin

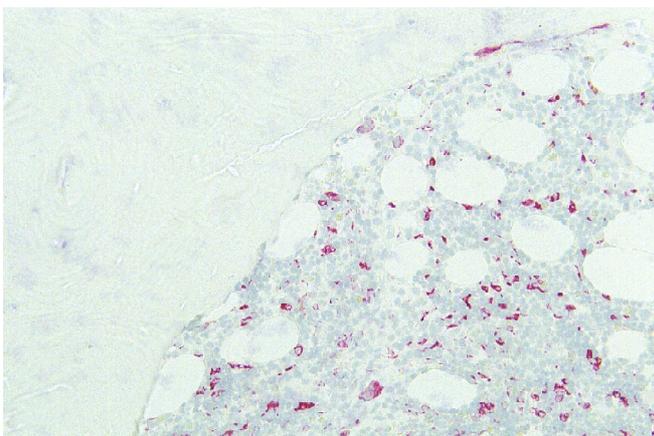


Abb 4.6 CD68

Abb.-Tableau 4: Immunreaktivität der Antikörper gegen DEC, OPN, ein Osteoklasten-Antigen (CD68) und COL-I-C. Es handelt sich um einen Pat. mit unauffälligem Knochenmarksbefund

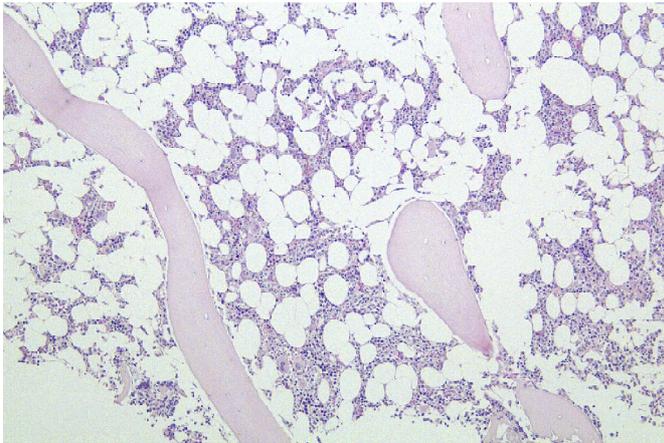


Abb 5.1 HE



Abb 5.2 DEC

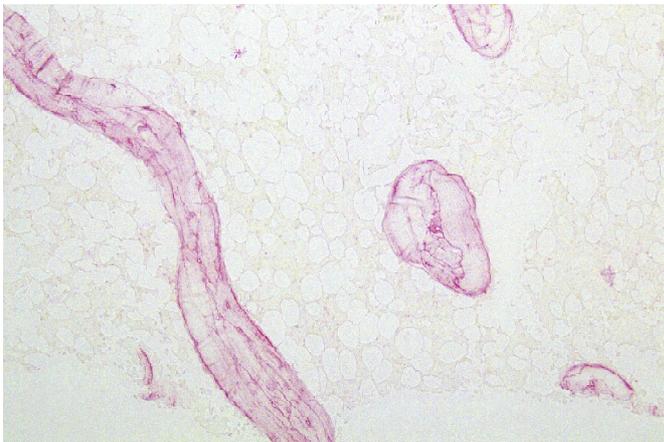


Abb 5.3 OPN



Abb 5.4 COL-I-C

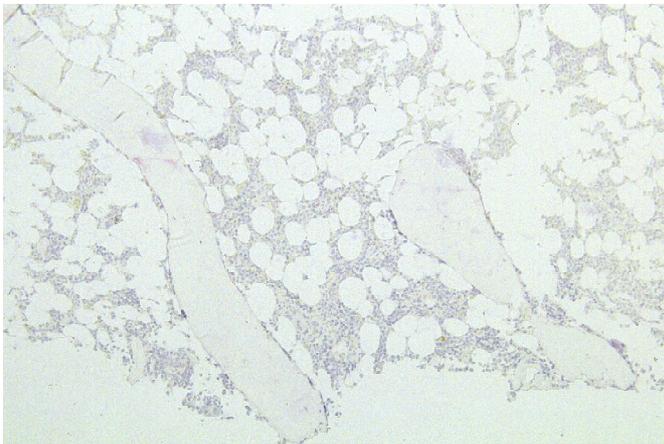


Abb 5.5 Vimentin

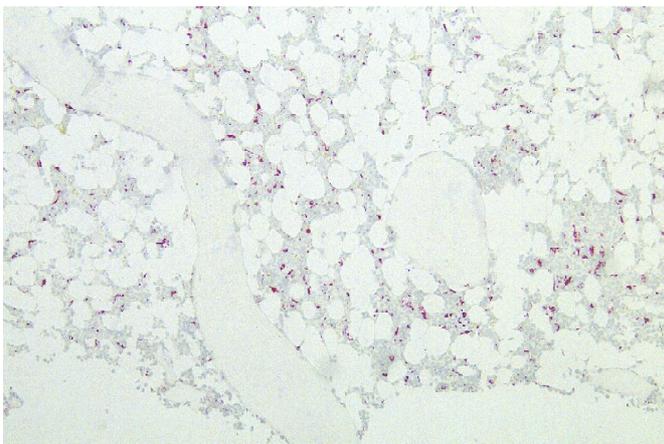


Abb 5.6 CD68

Abb.-Tableau 5: Immunreaktivität der Antikörper gegen Vimentin, DEC, OPN, ein Osteoklasten-Antigen (CD68) und COL-I-C. Es handelt sich um einen Pat. mit unauffälligem Knochenmarksbefund.

Das Tableau 4 mit den Abbildungen 4.1 bis 4.6 zeigt einen Vergleich aller eingesetzten Antikörper. DEC ist an der Matrixoberfläche, in den Osteozyten und im Bereich der Lamellen nachweisbar. Die Oberflächenmarkierung ist unterschiedlich stark, jedoch kontinuierlich ausgeprägt. OPN zeigt sich ebenfalls kontinuierlich im Bereich der Matrixoberfläche. Die Anfärbung der Kittlinien ergibt das charakteristische Aussehen von „Jahresringen“ um die kreisförmige Matrixgrenze oben rechts im Präparat. Kollagen-I-C- Peptid zeigt wieder die selektive Matrixoberflächenanfärbung. Ein Zusammenhang mit dem Funktionszustand läßt sich bei der hier vorliegenden Vergrößerung nur schwer herstellen. Vimentin ist lediglich schwach im Bereich der Matrixoberfläche in der Bildmitte nachzuweisen. CD 68 zeigt sich neben einigen Zellen im Markraum im Bereich mehrerer Osteoklasten an der Matrixoberfläche.

Auch auf den Abbildungen 5.1 bis 5.6 des Tableaus 5 ist die Immunreaktivität gegen die im vorstehenden Abschnitt aufgeführten Antigene dargestellt. In diesem Präparat fällt ein negativer Befund für COL-I-C und ein nur angedeutet positiver für Vimentin auf.

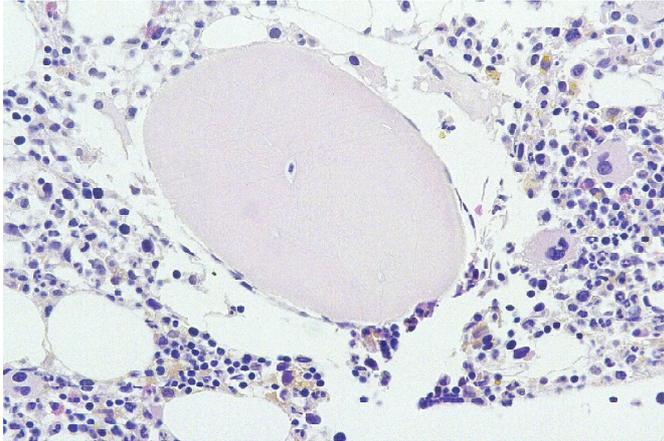


Abb 6.1 HE



Abb 6.2 DEC



Abb 6.3 OPN



Abb 6.4 COL-I-C

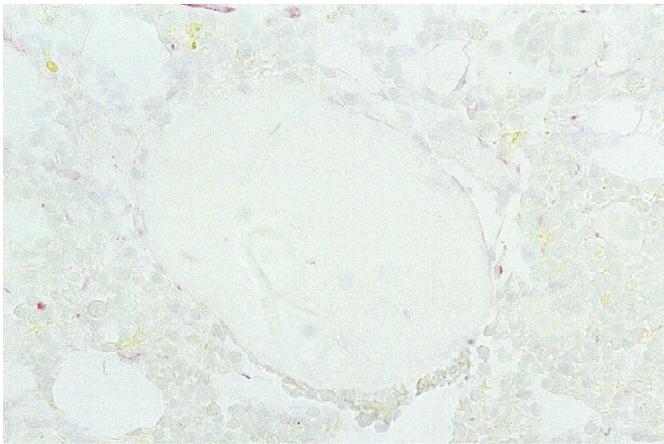


Abb 6.5 Vimentin

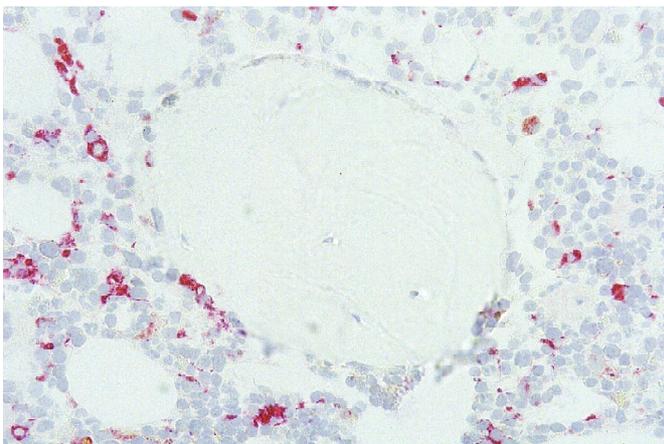


Abb 6.6 CD68

Abb.-Tableau 6: Immunreaktivität der Antikörper gegen Vimentin, DEC, OPN , ein Osteoklasten-Antigen (CD68) und COL-I-C. Es handelt sich um einen Pat. mit unauffälligem Knochenmarksbefund.

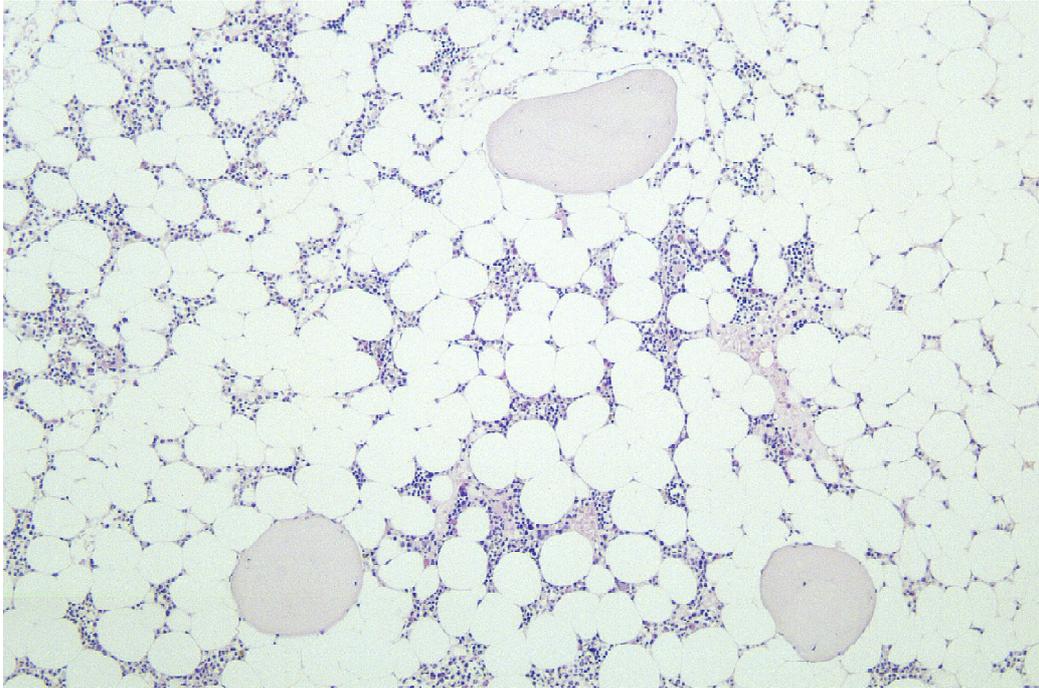


Abb 7.1 HE

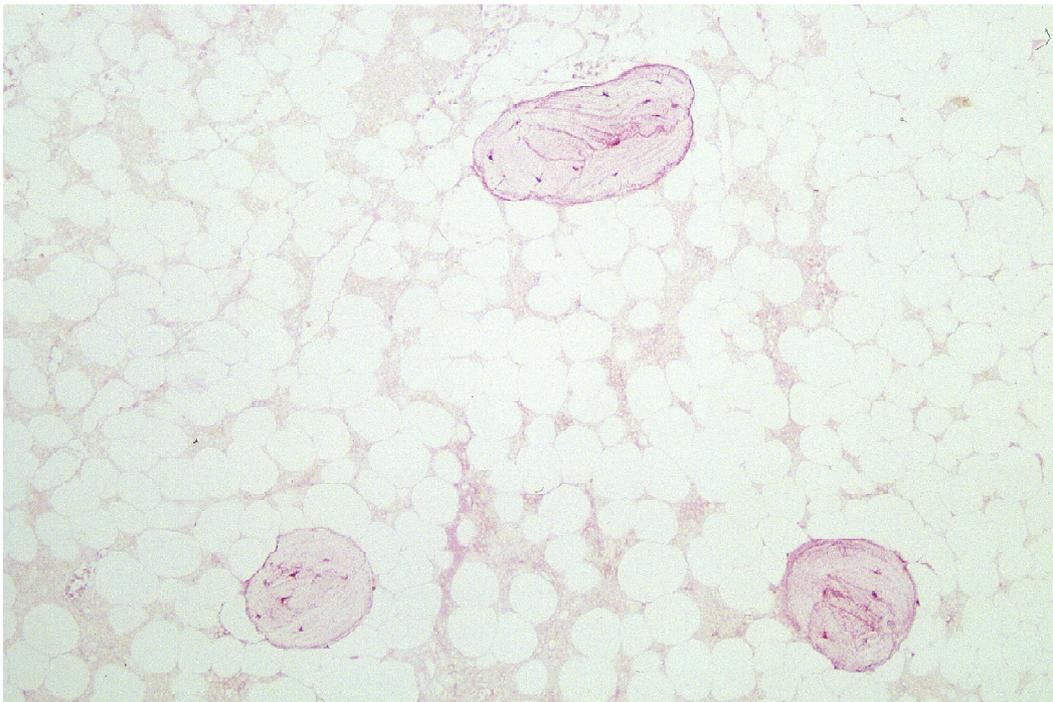


Abb 7.2 DEC

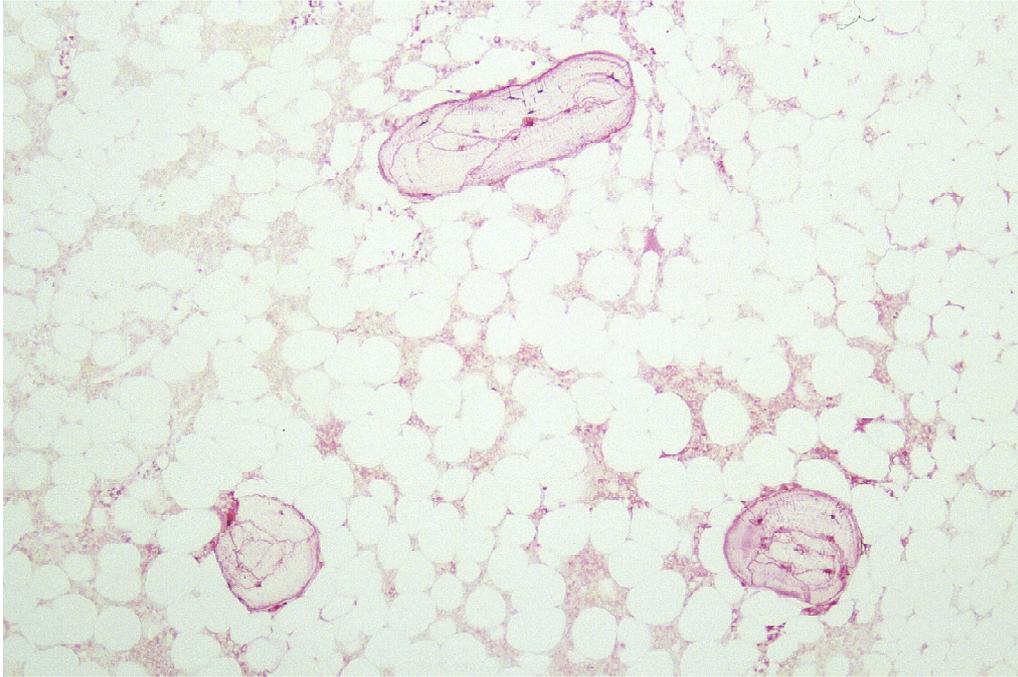


Abb 7.3 OPN

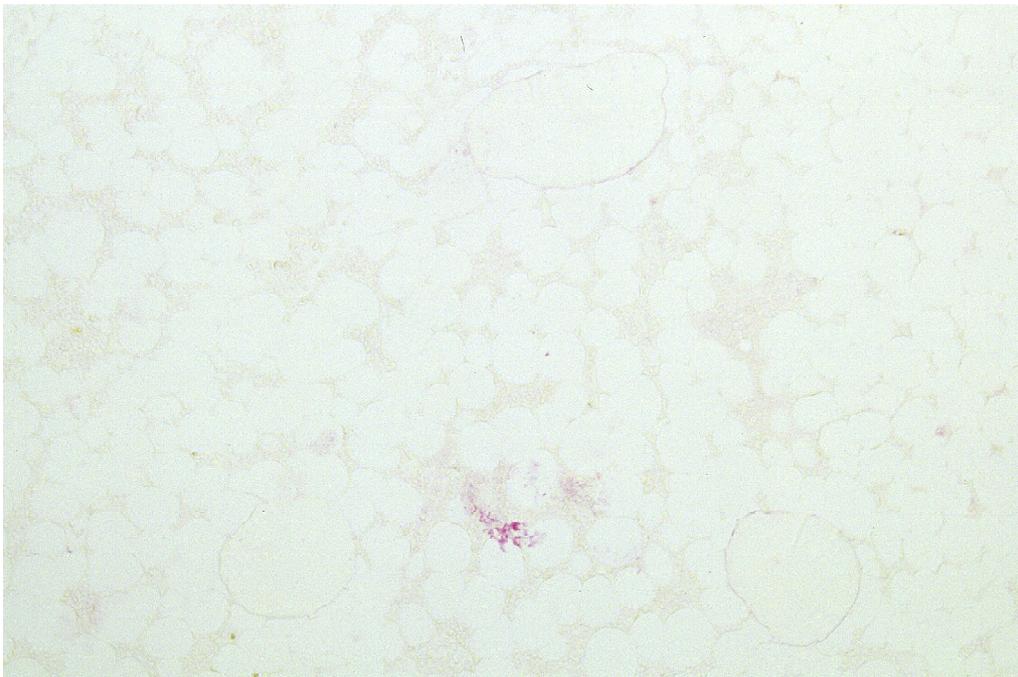


Abb 7.4 COL-I-C

Abb.-Tableau 7: Immunreaktivität der Antikörper gegen DEC, OPN und COL-I-C. Es handelt sich um einen Pat. mit unauffälligem Knochenmarksbefund

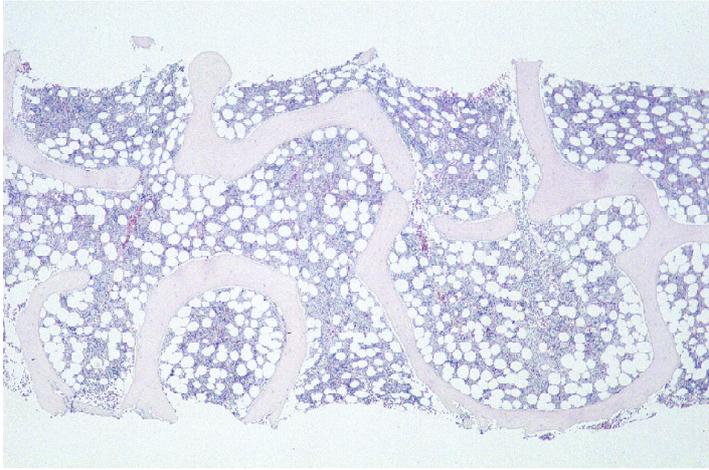


Abb 8.1 HE



Abb 8.2 DEC

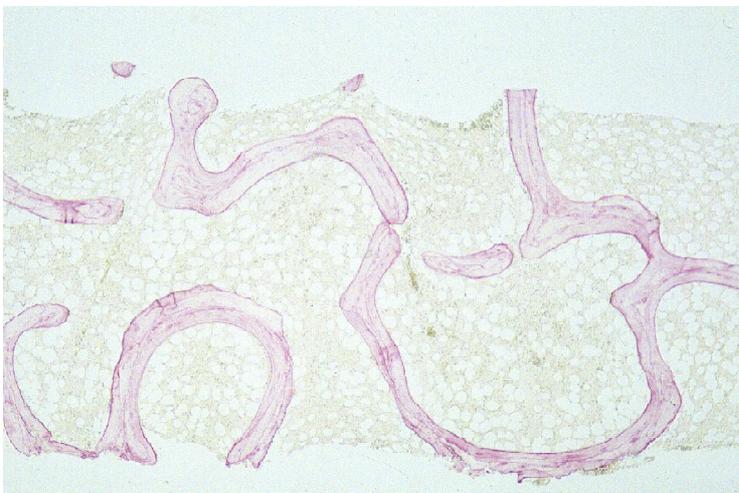


Abb 8.3 OPN

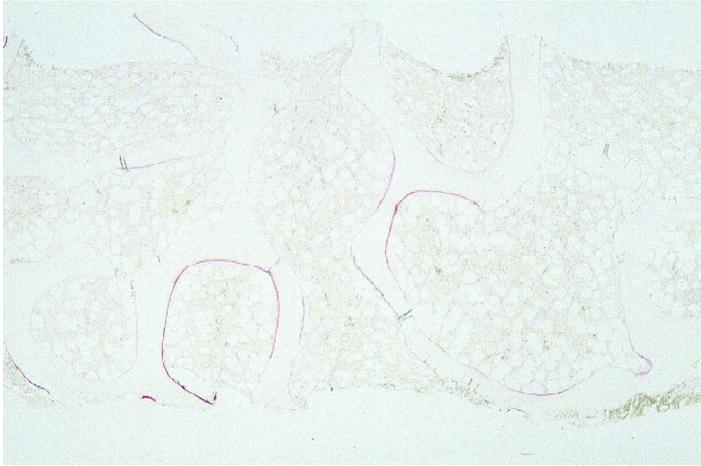


Abb 8.4 COL-I-C



Abb 8.5 Vimentin

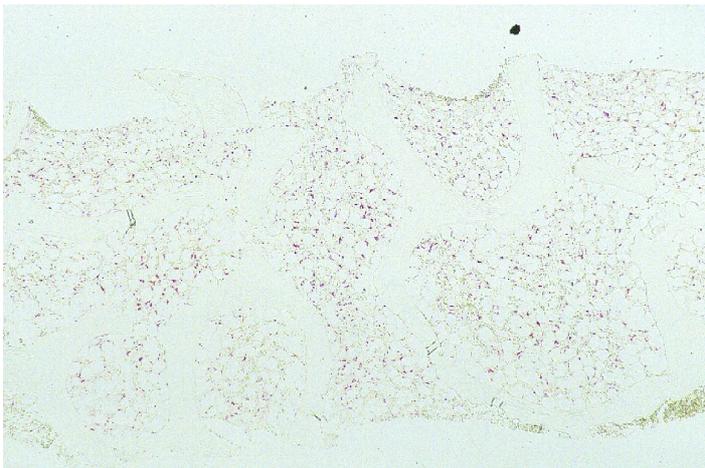


Abb 8.6 CD68

Abb.-Tableau 8: Immunreaktivität der Antikörper gegen DEC, OPN, ein Osteoklasten-Antigen (CD68) und COL-I-C. Es handelt sich um einen Pat. mit unauffälligem Knochenmarksbefund.

Die Abbildungen 6.1 bis 6.6 des Tableaus 6 demonstrieren den Zusammenhang zwischen der Beschaffenheit der Matrixoberfläche (HE) und der Immunreaktivität gegen COL-I-C. Im Bereich des Knochenbälkchens unten rechts befindet sich eine Neubildungszone mit einigen kubischen Osteoblasten, in diesem Bereich zeigt sich die selektive Anfärbbarkeit von COL-I-C. Im Unterschied hierzu zeigt sich DEC beinahe kontinuierlich im Bereich der gesamten Oberfläche. Außerdem gelingt ein Nachweis von DEC in den in der HE-Färbung sichtbaren Osteozyten. Nur schwach positiver Befund für Vimentin. Bekanntes Verteilungsmuster für OPN.

Auf den Abbildungen 7.1 bis 7.4 des Tableaus 7 zeigt sich wiederum das mehrfach beschriebene Muster bezüglich DEC und OPN. Auffallend ist der Negativbefund für COL-I-C.

Auf den Abbildungen 8.4 (COL-I-C) und 8.5 (Vimentin) zeigt sich bei dem im Tableau 8 dargestellten Fall mit unauffälligem Knochenmark eine weitgehende Übereinstimmung des Färbungsmusters. Daraus läßt sich schließen, daß in den COL-I-C-positiven Matrixoberflächenabschnitten Vimentin-positive Osteoblasten vorhanden sind. OPN und DEC lassen sich wiederum an sämtlichen Matrixoberflächen nachweisen,

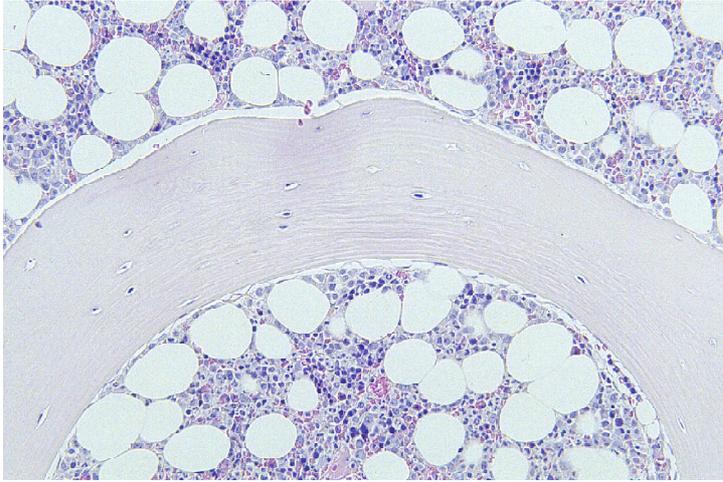


Abb 9.1 HE



Abb 9.2 DEC

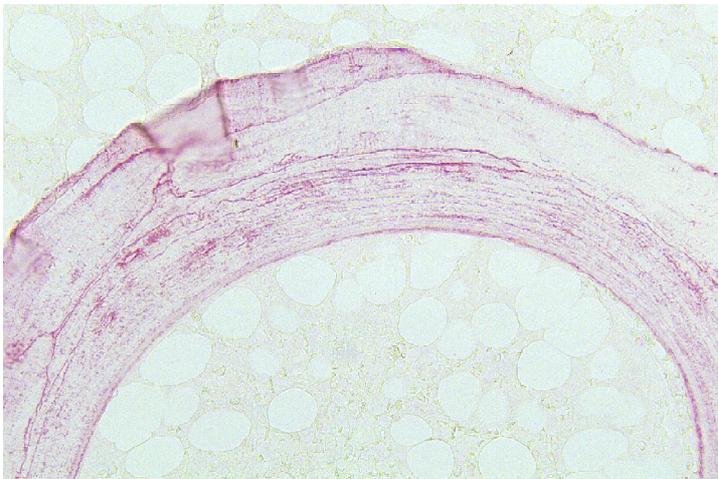


Abb 9.3 OPN



Abb 9.4 COL-I-C



Abb 9.5 Vimentin

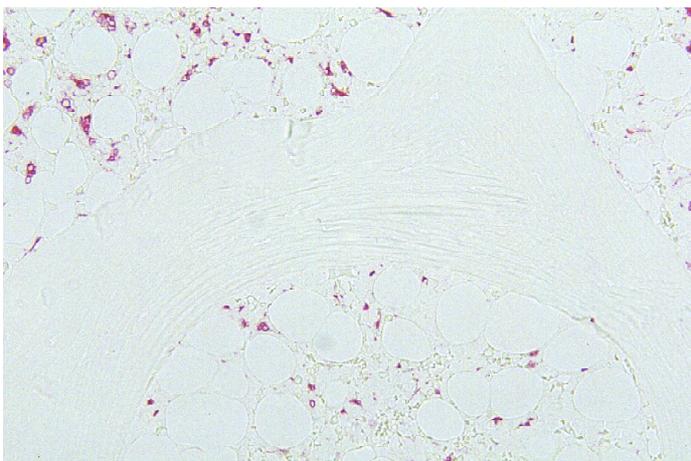


Abb 9.6 CD68

Abb.-Tableau 9: Immunreaktivität der Antikörper gegen Vimentin, DEC, OPN, ein Osteoklasten-Antigen (CD68) und COL-I-C. Es handelt sich um einen Pat. mit unauffälligem Knochenmarksbefund.

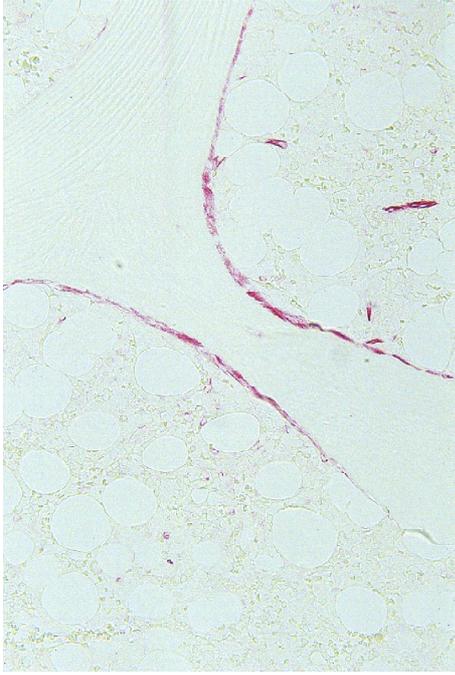


Abb 10.1 Vimentin

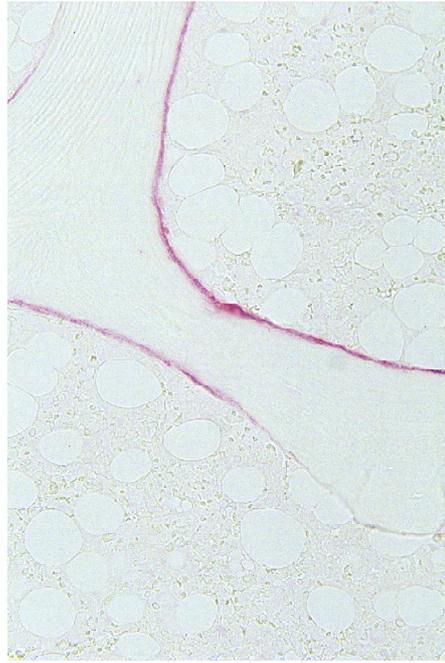


Abb 10.2 COL-I-C

Abb.-Tableau 10: Immunreaktivität der Antikörper gegen Vimentin und COL-I-C. Es handelt sich um einen Pat. mit unauffälligem Knochenmarksbefund.

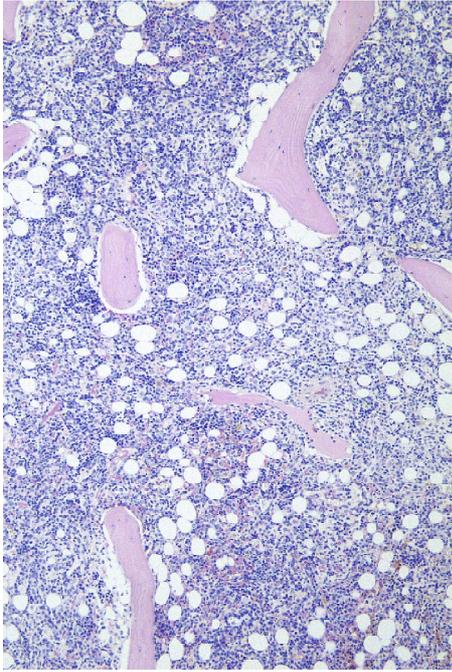


Abb 11.1 HE

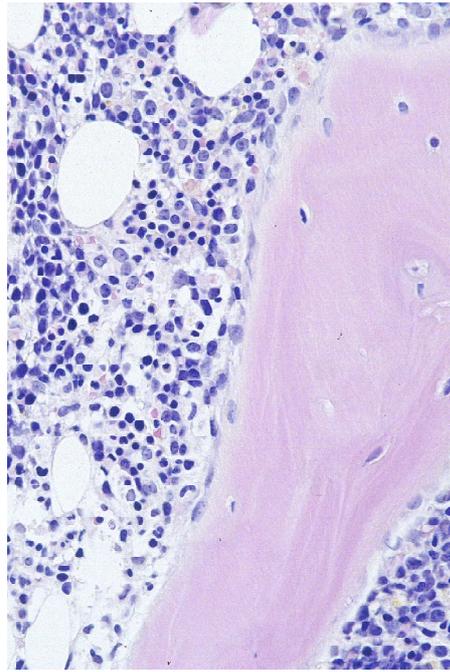


Abb 11.2 HE

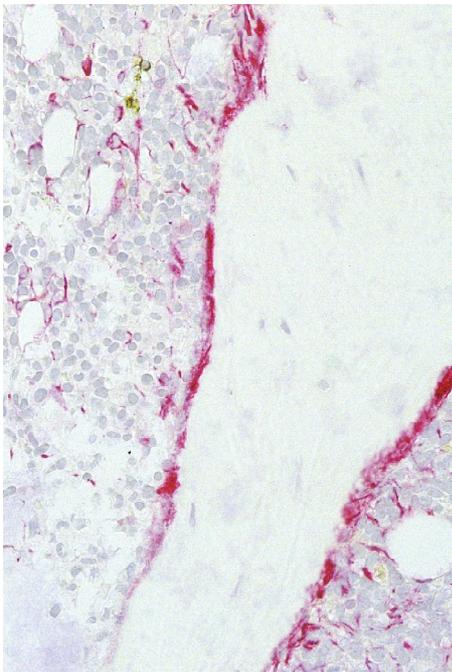


Abb 11.3 Vimentin

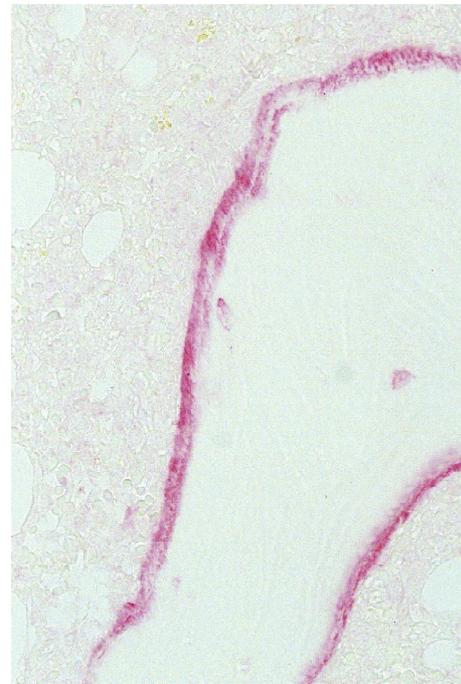


Abb 11.4 COL-I-C

Abb.-Tableau 11: Immunreaktivität der Antikörper gegen Vimentin, COL-I-C. Es handelt sich um einen Pat. mit unauffälligem Knochenmarksbefund.

Das Tableau 9 mit den Abbildungen 9.1 bis 9.6 zeigt wiederum ein übereinstimmendes Anfärbemuster bezüglich Vimentin und COL-I-C. Auffällig ist in diesem Fall, daß COL-I-C nur auf der unteren Seite des gebogen verlaufenden Knochenbälkchens nachzuweisen ist, die obere Grenzfläche ist komplett negativ. Leider liegt im HE-gefärbten Präparat eine artifizielle partielle Trennung des Knochengewebes vom Markraum vor; trotzdem zeigt sich, daß in dem COL-I-C-positiven Areal Osteoblasten, in dem COL-I-C-negativen Abschnitt flache „lining cells“ vorherrschen.

Das Tableau 10 mit den Abbildungen 10.1 und 10.2 verdeutlicht nochmals ein übereinstimmendes Anfärbemuster bezüglich Vimentin und COL-I-C.

Auch bei den Präparaten von Tableau 11 handelt es sich um einen Fall mit unauffälligem Knochenmarksbefund. Die Abbildungen 11.2 bis 11.4 verdeutlichen, daß die COL-I-C-positiven Oberflächenareale Bezirken mit kubischen Osteoblasten entsprechen. Ein entsprechender Bezirk befindet sich insbesondere an der linken Seite des Knochenbälkchens.

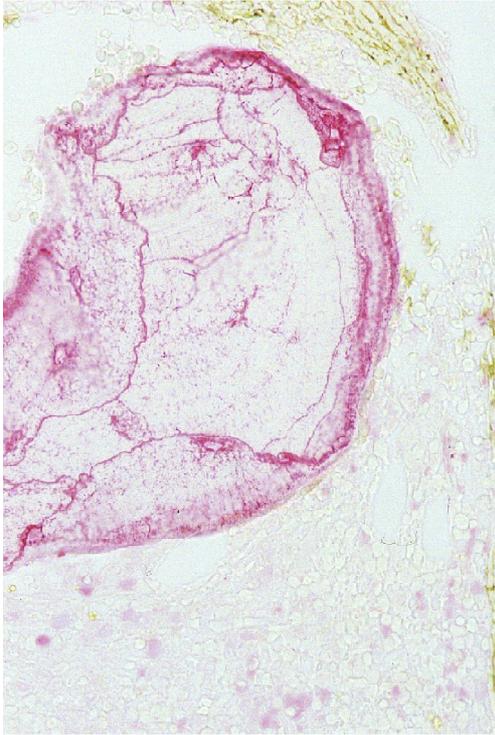


Abb 12.1 DEC

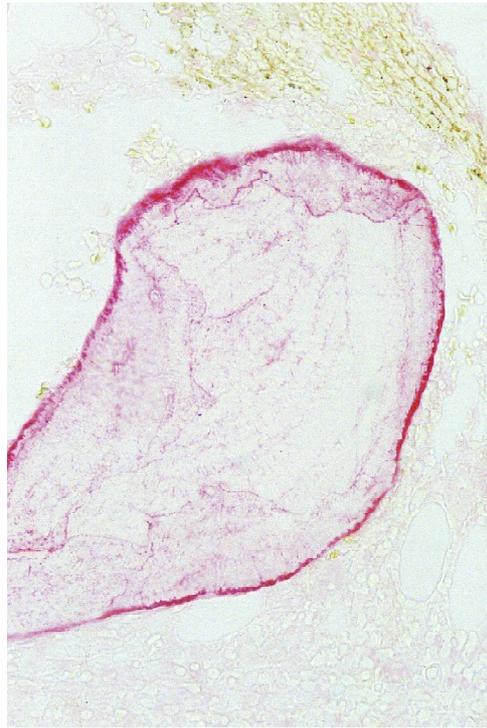


Abb 12.2 OPN

Abb.-Tableau 12: Immunreaktivität der Antikörper gegen DEC und OPN. Es handelt sich um einen Pat. mit einer Lymphominfiltration des Knochenmarks.

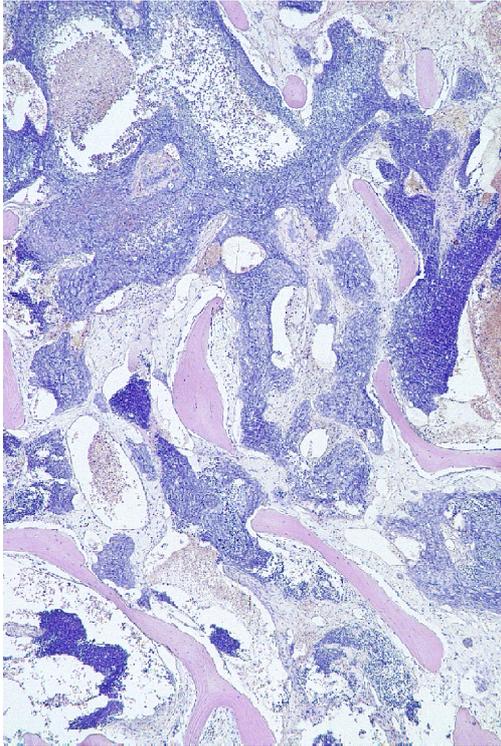


Abb 13.1 HE

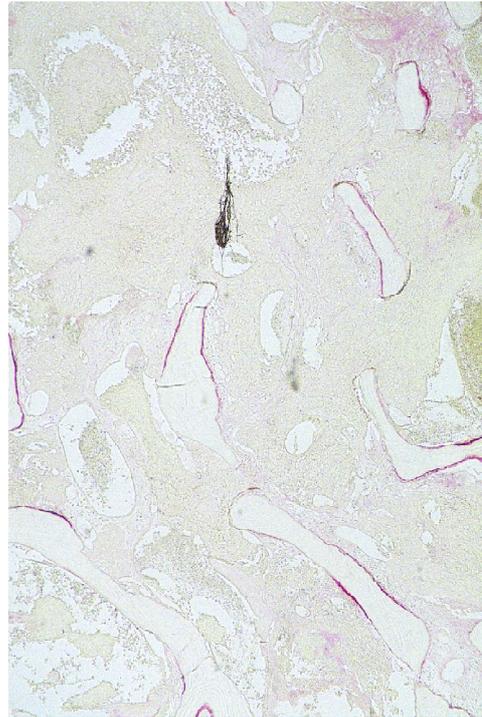


Abb 13.2 COL-I-C

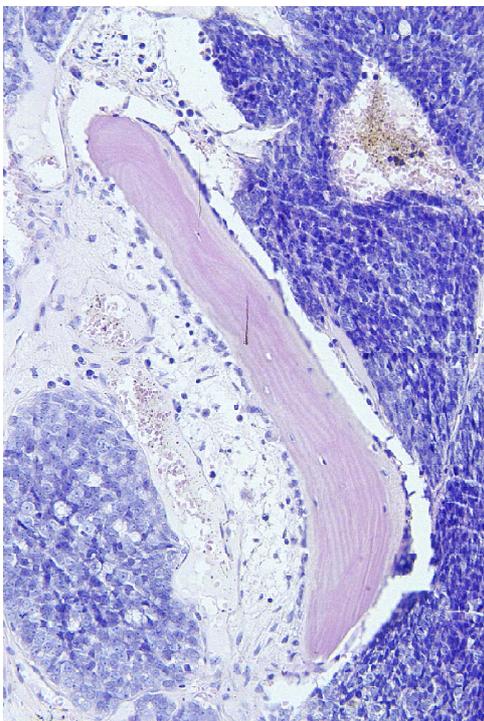


Abb 13.3 HE

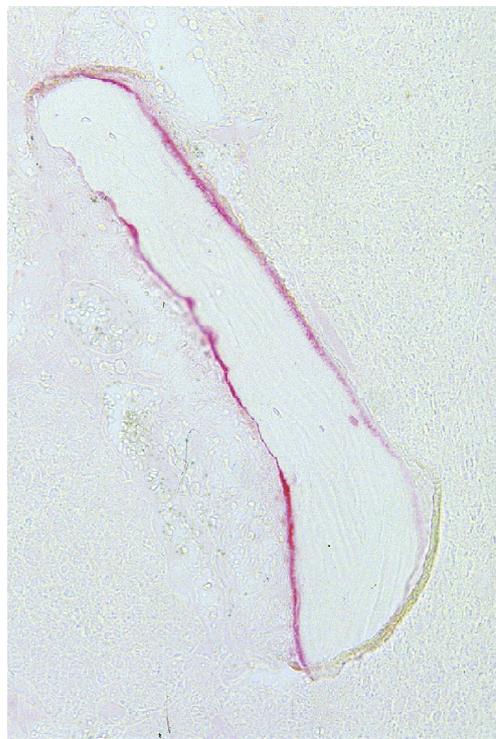


Abb 13.4 COL-I-C

Abb.-Tableau 13: Immunreaktivität des Antikörpers gegen COL-I-C. Es handelt sich um einen Pat. mit Lymphominfiltration des Knochenmarks.

Das Tableau 12 zeigt Knochengewebe bei nachgewiesener Lymphominfiltration. Verdeutlicht wird das schon mehrfach erwähnte Anfärbemuster für DEC und OPN.

Auch bei dem im Tableau 13 dargestellten Fall handelt es sich um eine Lymphominfiltration. In der Übersichtsvergrößerung zeigen sich im Unterschied zu den vorher besprochenen Normalfällen zahlreiche COL-I-C-positive Matrixoberflächen. In der Ausschnittsvergrößerung läßt sich wiederum der Zusammenhang zwischen Oberflächenabschnitten mit kubischen Osteoblasten im HE-Präparat und COL-I-C- positiven Arealen feststellen.

### 5.3 Ergebnis der histomorphometrischen Berechnungen

#### 5.3.1 Zugrundeliegende Anfärbeeigenschaft

Interessant ist das Verhalten von COL-I-C, dieses findet sich an der Knochenmatrixoberfläche speziell in aktivierten Abschnitten mit aktiven kubischen Osteoblasten. Dieses Färbeverhalten lässt sich nutzen, um den Anteil der „aktivierten Oberflächen“ abzuschätzen. Ein dementsprechend gefärbtes Präparat kann in der Diagnostik einen Prozentwert liefern, der in etwa dem Anteil der Knochenmatrix-produzierenden Matrixoberfläche entspricht und somit Aussagen zur Aktivität der Umbauprozesse präzisieren

#### 5.3.2 Ergebnis der rechnerischen Auswertung

Die Auswertung erfolgt getrennt in zwei Gruppen. Gruppe 1 enthält die Normalfälle, Gruppe 2 die Fälle mit verschiedenen Tumordinfiltrationen.

T-Test

Gruppenstatistiken

Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
BoneVol 1	19	21,4395	7,7304	1,7735
BoneVol 2	8	22,0388	6,1889	2,1881
COL-I-C 1	19	11,5016	6,5624	1,5055
COL-I-C 2	8	20,4687	7,7055	2,7243

Test bei unabhängigen Stichproben

Levene-Test der Varianzgleichheit

	F	Signifikanz
BoneVol Varianzen gleich Varianzen nicht gleich	0,057	0,813
COL-I-C Varianzen gleich Varianzen nicht gleich	0,053	0,82

T-Test für Mittelwertgleichheit

	T	df	Signifi- kanz (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standard- fehler Differenz
BoneVol Varianzen gleich	-0,194	25	0,848	-0,5993	3,0900
Varianzen nicht gleich	-0,213	16,456	0,834	-0,5993	2,8166
COL-I-C Varianzen gleich	-3,083	25	0,005	-8,9672	2,9088
Varianzen nicht gleich	-2,881	11,511	<b><u>0,014</u></b>	-8,9672	3,1126

Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0,014$ ) zwischen den beiden Gruppen bezüglich der Mittelwerte der COL-I-C-markierten Oberflächen.

Wie eingangs dargestellt, kann einigen Proteinen im Knochengewebe eine spezifische Funktion zugeordnet werden, anderen noch nicht.

Bekannte Eigenschaften dieser Proteine machen ihren Einsatz in der Diagnostik von Osteopathien interessant. Hier ist Osteokalzin zu erwähnen, welches neben der alkalischen Phosphatase als Marker der Osteoblastenaktivität herangezogen wird (LIAN und GUNDBERG, 1987). Bei anderen Proteinen bleibt die Funktion weiter spekulativ.

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Versuch unternommen, anhand von immunhistochemischen Färbungen von Routinepräparaten aus der osteopathologischen Diagnostik ein Verteilungsmuster der kollagenen und nicht-kollagenen Proteine im Knochengewebe zu beschreiben und einen Zusammenhang mit bislang bekannten Funktionen herzustellen. Von besonderem Interesse ist hierbei die Knochenmatrixoberfläche als Funktionseinheit beim Knochenumbau. Morphologische Veränderungen dieser Grenzfläche treten je nach Funktionszustand auf. Von Interesse ist, ob sich diese unterschiedlichen Funktionszustände auch in der Verteilung der Matrixproteine niederschlagen.

Das in der Einleitung ausführlich dargestellte Osteokalzin zeigte unter den im Rahmen dieser Arbeit vorherrschenden Bedingungen keine verwendbare Anfärbung, so daß es in die weitere Auswertung nicht einbezogen wurde.

Die Kollagensynthese steht zeitlich im Zusammenhang mit der Entstehung neuer Knochenmatrix. Lokalisiert ist sie in den Osteoblasten. Über die Funktion des C-terminalen Peptids ist zumindest bekannt, daß es nach der Translation die Ausbildung von Disulfat-Brücken in und zwischen den Ketten fördert. Durch einen Abtrennungsvorgang in der extrazellulären Matrix wird die Löslichkeit des Kollagen-Moleküls verändert und ein negativer Feedback-Mechanismus in Gang gesetzt (BÄTGE et al., 1993; ALBERTS et al., 1995; ROSSERT und DE CROMBRUGGHE, 1996).

Charakteristisch für die mit dem Antikörper gegen COL-I-C gefärbten Präparate ist der Abbruch der Färbung an in fast allen Präparaten klar abgrenzbaren Punkten der Matrixoberfläche, so daß einige Oberflächen COL-I-C-positiv, andere COL-I-C-negativ erscheinen. Unter Berücksichtigung eines Vergleichs des jeweiligen HE-Präparats mit dem entsprechend gefärbten Präparat zeigt sich eine immunhistologische Anfärbung im Bereich der Knochenmatrixoberfläche speziell in aktivierten Abschnitten mit morphologisch aktiven kubischen Osteoblasten. Somit läßt sich ein Zusammenhang zwischen der morphologisch sichtbaren Aktivierung der Matrixoberfläche und dem Nachweis von COL-I-C herstellen.

Der gegen Vimentin gerichtete Antikörper reagiert mit einem Protein in Zellen mesenchymalen Ursprungs; im einzelnen sind dies Fibrozyten und -blasten, Osteozyten und -blasten, Myozyten und -blasten, Makrophagen, Lymphozyten, Neuroblasten, Melanozyten, Schwann-Zellen, Sertoli-Zellen und Granulosaluteinzellen (HASTKA, 1997). Demzufolge müssen Osteoblasten Vimentin-positiv sein. Ein Vergleich der COL- I-C- mit den Vimentin-gefärbten Präparaten (Tableaus 8, 9, 10 und 11) zeigt, daß beide Marker die Osteoblasten anfärben. In den Tableaus 4 und 6 ist bei sehr schwacher Markierung einzelner Osteoblasten durch den Vimentin-Antikörper die oben beschriebene abschnittsweise COL-I-C-Anfärbbarkeit gegeben. In Tableau 5 zeigt sich bei ebenfalls schwach positiv markierten Osteoblasten ein insgesamt negativer Nachweis von COL-I-C.

DEC liegt den Kollagenfibrillen an und hat anscheinend eine regulierende Wirkung auf die Fibrillen (BÄTGE et al., 1993; LIAN et al., 1999). Im Knochen ist es demnach in den Knochenneubildungszonen zu finden. Abb. 12.1 zeigt das im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Verteilungsmuster (Osteozyten, Knochenmatrixoberfläche, Knochenlamellen). Die Erkenntnisse über die Funktion des Proteins legen nahe, daß es eine Korrelation im Färbeverhalten von DEC und COL-I-C geben muß. Dies läßt sich in den vorliegenden Präparaten bestätigen. Es wird auf die Tableaus 4 und 6 verwiesen. In beiden Tableaus zeigt sich jedoch auch, daß der Marker für DEC die Matrixoberfläche weniger selektiv anfärbt als derjenige für das COL-I-C. Während DEC in beinahe allen Matrixoberflächenarealen nachweisbar ist, zeigt sich das COL-I-C nur abschnittsweise in Arealen, die auch bezüglich DEC positiv sind.

OPN läßt sich -zeitlich gesehen- direkt vor dem Beginn der Mineralisation nachweisen und verhindert vermutlich einen ungerichteten Kristallwuchs. Bekannt ist das Vorkommen in den Zementlinien der Matrix, die als Folge der osteoklastären Resorption durch die saure Phosphatase gedeutet werden (Funktion als Anheftstelle für Osteoklasten) (BÄTGE et al., 1993; ROACH, 1994; LIAN et al., 1999). Diese Verteilung zeigt sich auch im Rahmen dieser Arbeit, es wird auf Abb 9.3 verwiesen (Knochenmatrixoberfläche, Knochenkanälchen, Zementlinien).

ON scheint eine Rolle bei der Nukleation der Mineralkristalle innezuhaben, möglicherweise als negatives Regulationselement bei der Mineralisation des Osteoids (BÄTGE et al., 1993; ROACH, 1994; LIAN et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit zeigt sich eine Anfärbung der „lining cells“; in die weitere Auswertung wurde es nicht miteinbezogen.

Im Rahmen der Auswertung wird die Tatsache weiter verfolgt, daß der Antikörper gegen COL-I-C morphologisch aktive Osteoblastensäume spezifisch markiert. Diese Eigenschaft läßt sich dann nutzen, wenn diagnostisch ein Verdacht auf eine osteologische Erkrankung mit einer Erhöhung der Umbauaktivität vorliegt.

Im Rahmen des Vergleichs der Gruppen mit morphologisch als „Normalbefund“ eingestuft Präparaten und solchen mit bekannter Tumordinfiltration zeigte sich ein signifikanter Unterschied in bezug auf die COL-I-C-markierten Oberflächen. Durch ein spezielles Auswertungsverfahren wurde die Berechnung im dreidimensionalen Raum möglich.

Kritisch angemerkt werden muß jedoch, das es sich im Rahmen dieser Arbeit durch den hohen Zeitbedarf bei der Auswertung nur um geringe Fallzahlen handelt. Eine Präzisierung ist erst mit wesentlich größeren Fallzahlen möglich. Aufgrund der geringen Fallzahlen wurde auf eine weitere Differenzierung bezüglich Alter und Geschlecht sowohl in Gruppe 1 als auch in Gruppe 2 verzichtet. Das Durchmustern eines Präparates dauerte im Durchschnitt eine Stunde, wobei teilweise über 1000 einzelne Meßpunkte im Mikroskop zu erfassen waren.

Weitere Untersuchungen sind nötig um festzustellen, ob auch Unterschiede bezüglich der verschiedenen Entitäten (Lymphominfiltration, Plasmozytom, Skelettkarzinose) bestehen und somit differentialdiagnostische Aussagen denkbar wären. Außerdem wäre es sinnvoll zu testen, inwiefern auch andere Osteopathien einen Einfluß auf die Matrixoberflächenbeschaffenheit haben.

Ein Vorteil des durchgeführten Berechnungsverfahrens ist die Tatsache, daß die Zahlenwerte für den dreidimensionalen Raum berechnet werden. Hierbei ergibt sich eine bessere Charakterisierung des Funktionszustandes der Matrixoberflächen als durch die deskriptive Auswertung des zweidimensionalen mikroskopischen Bildes.

Nachweisen läßt sich, daß in der Gruppe mit bekannten Tumorosteopathien bei vergleichbaren Knochenvolumina signifikant höhere Anteile COL-I-C-positiver Oberflächen vorhanden sind. Insgesamt findet sich eine positive Korrelation zwischen der morphologischen Diagnose „erhöhte Umbauaktivität“ und dem durch die o.a. Methodik berechneten Zahlenwert.

Auch bezüglich OPN, DEC und des Osteoklastenmarkers CD68 lassen sich spezifische Verteilungsmuster nachweisen, deren diagnostische Einsatzmöglichkeiten im Rahmen weiterer Arbeiten abzuklären sind. Folgende Fragestellungen lassen sich in diesem Zusammenhang diskutieren:

OPN mit dem Verteilungsmuster „Knochenmatrixoberfläche, Knochenkanälchen, Kittlinien“ könnte ggf. zur Altersbestimmung der jeweiligen Knochenmatrix herangezogen werden. Diesem Gedanken liegt zugrunde, daß ähnlich wie bei den Jahresringen der Bäume Bezirke unterschiedlichen Synthesalters abzugrenzen sind. Die Auswertung der Anzahl der einzelnen Bezirke über einer Neubildungszone könnte eine Aussage über die Dauer der Matrixsynthese, die Bestimmung der einzelnen Schichtdicken eine Aussage über die Quantität der Synthese zum jeweiligen Zeitpunkt ermöglichen. Die Bestimmung des Parameters „Knochenkanälchen pro Volumen“ informiert evtl. über den Ernährungszustand.

DEC mit dem Verteilungsmuster „Osteozyten, Knochenmatrixoberfläche, Knochenlamellen“ ließe sich heranziehen, um die Anzahl der Osteozyten pro Volumen zu berechnen.

In der Einleitung wurde ein Überblick über Kollagen und die nicht-kollagenen Knochenproteine gegeben und auf das jeweilige Vorkommen bzw. die jeweilige Funktion eingegangen.

Im folgenden wurden die Veränderungen der Knochenmatrix im Rahmen von Tumorosteopathien abgehandelt, wobei ein besonderes Augenmerk auf die lokalen Faktoren gerichtet wurde, die für den veränderten Funktionszustand verantwortlich sind.

Präparate aus der Routinediagnostik wurden nach einem standardisierten Verfahren gefärbt und in einem ersten Schritt deskriptiv ausgewertet. Wiederkehrende Anfärbemuster der Knochenproteine und von Vimentin bzw. von einem Osteoklastenmarker wurden erfaßt.

Eine aufgedeckte Eigenschaft eines Knochenproteinabkömmlings -Kollagen-I-C-Peptid- wurde herangezogen, um eine Berechnung von Knochenmatrixoberflächen mit einer bestimmten Eigenschaft durchzuführen. Hierbei handelt es sich um eine selektive Anfärbbarkeit bestimmter Oberflächenabschnitte, die an genau definierbaren Stellen abbricht. Ein Vergleich mit der Morphologie des entsprechenden Knochengewebes im HE-Präparat zeigte, daß an diesen markierten Oberflächen kubische Osteoblasten vorherrschen, die in der histologischen Diagnostik als „aktive Osteoblasten“ mit hoher Syntheseleistung gedeutet werden.

Durch ein spezielles Auswertungsverfahren lassen sich nach Auswertung der Eigenschaft aus dem zweidimensionalen Präparat Rückschlüsse auf die Oberflächen in der dreidimensionalen Originalstruktur schließen.

Zwei Gruppen, die sich in bezug auf die oben angegebene Eigenschaft unterscheiden, wurden gebildet und verglichen. Hierbei handelte es sich einerseits um als „Normalbefund“ eingestufte Präparate, andererseits um Präparate, die im Befundbericht als „aktiviert“ beschrieben sind. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich der beschriebenen Eigenschaft konnte festgestellt werden.

ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J.D.

Molekularbiologie der Zelle

3. Aufl., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, 1995

BÄTGE B., SEIZER U., MÜLLER P.K.

Die organische Knochenmatrix. Kollagene und nicht kollagene Proteine

Osteologie 2: 193-201, 1993

BOEHNISCH T.

Enzyme, Färbemethoden, Kontrollen, Hintergrundaktivität.

in: Handbuch immunhistochemischer Färbemethoden II.

(S.J. Naish, Hrsg.), DAKO Cooperation, Kalifornien: 9-42, 1989

BUCHER O., WARTENBERG H.

Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 11. Auflage,

Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Toronto, 1989

DESBOIS C., KARSENTY G.

Osteocalcin Cluster: Implications for Functional Studies

J Cell Biochem 57: 379-383, 1995

DERMIETZEL D.

Systematik der Gewebe

in: Bennighoff Anatomie, 15. Auflage,

(D. Drenckhahn, W. Zenker, Hrsg.), Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1994

EGUCHI H., HOSODA K.

Sandwich Immunoassay Specific for the N-terminal Sequence of Osteocalcin

J Immun Meth 184: 231-240, 1995

GLOWACKI J., REY C., GLIMCHER M.J., COX K.A., LIAN J.

A Role for Osteocalcin in Osteoclast Differentiation

J Cell Biochem 45: 292-302, 1991

HASTKA J.

Immunzytologie,

Schattauer Verlag Stuttgart/New York, 1997

KECK E.

Calcitonin und Calcitonin-Therapie, 3. Auflage,

Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1996

LIAN J.B., GUNDBERG C.M.

Osteocalcin- Biochemical Considerations and Clinical Applications

in: Basic Science and Pathology, Section III, 1987

LIAN J.B., STEIN G.S., CANALIS E., GEHRON ROBEY P., BOSKEY A.L.

Bone Formation: Osteoblast Lineage Cells, Growth Factors, Matrix Proteins, and the Mineralization Process

in: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, Fourth Edition (M.J. Favus, Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999

MERZ W.A.

Die Streckenmessung an gerichteten Strukturen im Mikroskop und ihre Anwendung zur Bestimmung von Oberflächen-Volumen-Relationen im Knochengewebe

Mikroskopie, 22(5):132-142, 1967

MÜLLER K.M.

Tumoren

in: Pathologie (S. Blümcke, Hrsg.) 200-229, Verlag Walter de Gruyter, Berlin/New York, 1995

MUNDY G.R.

Bone Remodeling and Its Disorders, Second Edition,

Martin Dunitz Ltd, London, 1999

NIJWEIDE P.J., BURGER E.H., KLEIN NULEND J., VAN DER PLAS A.

The Osteocyte

in: Principles of Bone Biology,

(J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, G.A. Rogan, Eds.) 127-142, Academic Press, San Diego, 1996

OLAH A.J.

Histomorphometrie des Knochens (Referat)

Verh Dtsch Ges Pathol, 58: 104-113, 1974

PARFITT A.M., DREZNER M.K., GLORIEUX F.H., KANIS J.A., MALLUCHE H., MEUNIER P.J., OTT S.M., RECKER R.R.

Bone Histomorphometry: Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee.

J Bone Miner Re, 2(6): 595-610, 1987

PICKUTH D.

Klinische Radiologie systematisch, 1. Auflage,

UNI-MED-Verlag, Bremen, 1998

ROACH H.I.

Why Does Bone Matrix Contain Non-Collagenous Proteins? The Possible Role of Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin and Bone Sialoprotein in Bone Mineralization and Resorption.

Cell Biology International, 18 (6): 617-28, 1994

ROSSERT J., DE CROMBRUGGHE B.

Type I Collagen: Structure, Synthesis, and Regulation.

in: Principles of Bone Biology,

(J.P.Bilezikian, L.G. Raisz, G.A. Rogan, Eds.) 127-142, Academic Press, San Diego, 1996

SCHULZ A.

Knorpel- und Knochengewebe

in: Pathologie

(S. Blümcke, Hrsg.) 884-925, Verlag Walter de Gruyter, Berlin/New York, 1995

SCHWARTZ M.P., RECKER R.R.

Comparison of Surface Density and Volume of Human Iliac Trabecular Bone Measured Directly  
and by Applied Stereology

Calcif Tissue Int, 33(6): 561-565, 1981

VERMEULEN A.H., VERMEER C., BOSMAN F.T.

Histochemical Detection of Osteocalcin in Normal and Pathological Human Bone

J Histochem Cytoch, 37: 1503-1508, 1989

## **Danksagung**

Ich möchte die Gelegenheit nutzen, allen denjenigen Dank zu sagen, die für das Gelingen dieser Arbeit mitverantwortlich sind.

In erster Linie danke ich Herrn Professor A. Schulz, der diese Arbeit ermöglicht hat. Seinem Fachwissen auf dem Gebiet der Osteopathologie ist es zu verdanken, daß die Thematik Schritt für Schritt enger gefaßt wurde. Mit seiner Hilfe konnte letztendlich Kurs auf die Fragestellung genommen werden, welche nun die Grundlage meiner Dissertation ist.

Herrn Dr. B. Knoblauch und Herrn Dr. B. Hinrichs danke ich für die Betreuung und Hilfestellung während der Ermittlung der Ergebnisse.

Hervorzuheben ist Herr F. Dönges (MTLA), der an der Anfertigung der Präparate maßgeblich beteiligt war.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Medizinstudium in dieser Form ermöglicht haben.

Außerdem bin ich Herrn Professor H. Brinkmann und Frau G. Brinkmann für die wertvolle Unterstützung -nicht nur in redaktioneller Hinsicht- zu großem Dank verpflichtet.

Abschließend danke ich Claudia Doreen Malek für ihre Liebe, Energie und Geduld, die mich während des Studiums und der Dissertation begleitet und gestärkt haben.

## **Lebenslauf**

### Persönliche Daten

Name: Christoph Alexander Reh  
geboren am: 23.10.1972  
in: Gießen  
Konfession: römisch-kath.  
Familienstand: ledig  
Eltern: Dr.med. Helmut Reh, Arzt für Radiologie  
Jutta Reh, geb. Gebauer

### Schulbildung

1979-1983 Grundschule Kirchheim/Hessen  
1983-1989 Gesamtschule Obersberg Bad Hersfeld  
1989-1992 Modellschule Obersberg -Gymnasium- Bad Hersfeld

### Wehrdienst

7/92-9/93 Wehrdienst und halbjährige Tätigkeit als Berufssoldat im Sanitätsdienst mit Krankenpflegehelferausbildung in Horb a.N., Hofgeismar, Hörnum/Sylt und Gießen

### Hochschulbildung

10/93-11/99 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen

10/95 Ärztliche Vorprüfung  
9/96 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
10/98 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
11/99 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### Beruflicher Werdegang

1/00- 1/01 Arzt im Praktikum in der Rheumaklinik der LVA Oldenburg-Bremen  
in Bad Wildungen  
ab 1/01 Arzt im Praktikum in der Radiologischen Abteilung des Kreiskrankenhauses  
Bad Hersfeld  
ab 2/01 Arzt im Praktikum im Radiologischen Zentrum des Klinikums Fulda  
ab 7/01 Assistenzarzt im Radiologischen Zentrum des Klinikums Fulda