

**Universitätsklinikum Ulm, Abteilung und Poliklinik für Orthopädie
Sektion Biochemie der Gelenks- und Bindegewebserkrankungen
Leiter: Prof. Dr. R. E. Brenner**

**Histologische und immunhistochemische
Charakterisierung cartilaginärer Exostosen und
Vergleich mit fetalen und postnatalen Wachstumsfugen**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin, Dr. med., der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm**

**Volker Mordstein
geb. in Augsburg**

2004

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf Brenner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Eberhard Heinze

Tag der Promotion: 09.12.2004

Meinen Eltern
Brigitte und Gerd Mordstein
und
dem Andenken meines Großvaters
Albert Mordstein

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Aufgabenstellung	S. 1
1.1 Pathogenesetheorien	S. 4
1.2 Die Morphologie der Wachstumsfuge	S. 7
1.3 Die Kollagene	S. 8
1.3.1 Kollagen Typ I	S. 8
1.3.2 Kollagen Typ II	S. 9
1.3.3 Kollagen Typ X	S. 10
1.4 Ki-67	S. 12
1.5 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit	S. 14
2. Material und Methodik	S. 15
2.1 Das Probenmaterial	S. 18
2.2 Die Aufbereitung der Proben	S. 20
2.2.1 Die Fixierung	S. 20
2.2.2 Die Entkalkung	S. 20
2.2.3 Die Einbettung	S. 21
2.2.4 Die Fertigung der Schnitte	S. 21
2.3 Die histochemische Färbung mit Hämatoxylin-Eosin und Safranin-O	S. 22
2.4 Die immunhistochemische Darstellung der Kollagene Typ I, II und X und des proliferationsassoziierten Kernproteins Ki-67	S. 23
2.4.1 Allgemeine Darstellung der Methodik	S. 23
2.4.2 Der Andau als zentrales Problem der Immunhistochemie an Paraffinschnitten	S. 26
2.4.3 Protokolle der immunhistochemischen Färbungen	S. 27
2.5. Die Auswertung und Beurteilung der Proben	S. 31
3. Ergebnisse	S. 32
3.1 Ergebnisse der histologischen Untersuchung mittels HE- und Safranin-O-Färbung an Knorpel-Knochen-Schnitten	S. 32

3.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung mittels Antikörpern gegen die Kollagen-Typen I, II und X und gegen das proliferationsassoziierte Kernprotein Ki-67	S. 34
3.2.1 Ergebnisse der enzymatischen Vorbehandlung und Etablierung einer reproduzierbaren Methodik	S. 34
3.2.1.1 Ergebnisse der Etablierung der Methodik zur Darstellung von Kollagen Typ I	S. 35
3.2.1.2 Ergebnisse der Etablierung der Methodik zur Darstellung von Kollagen Typ II	S. 35
3.2.1.3 Ergebnisse der Etablierung der Methodik zur Darstellung von Kollagen Typ X	S. 37
3.2.1.4 Ergebnisse der Etablierung der Methodik zur Darstellung des proliferationsassoziierten Kernproteins Ki-67	S. 39
3.2.2 Ergebnisse der Kollagen-I-Färbung	S. 40
3.2.3 Ergebnisse der Kollagen-II-Färbung	S. 43
3.2.4 Ergebnisse der Kollagen-X-Färbung	S. 48
3.2.5 Ergebnisse der Ki-67-Färbung	S. 55
4. Diskussion	S. 61
4.1 Diskussion der Methodik	S. 61
4.2 Diskussion der einzelnen Färbungen	S. 65
4.2.1 Kollagen Typ I	S. 65
4.2.2 Kollagen Typ II	S. 68
4.2.3 Kollagen Typ X	S. 73
4.2.4 Ki-67	S. 79
4.3 Schlussfolgerung	S. 85
5. Zusammenfassung	S. 87
6. Literaturverzeichnis	S. 89

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplexmethode
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AER	Apical ectodermal ridge (Randleiste)
Aqua demin.	Aqua demineralisata (demineralisiertes Wasser)
AS-Reste	Aminosäurereste
BMP	Bone morphogenetic protein
BMPR	Bone morphogenetic protein receptor
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid (Äthylendiamintetraessigsäure)
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
FGF	Fibroblast growth factor
GCPS	Greig-Cephalopolysyndaktylie-Syndrom
HE	Hämatoxilin-Eosin
h	Stunde
Hh	Hedgehog
Hox	Homeobox(-Gen)
hrKolX	Humanes rekombinantes Kollagen Typ X
Ihh	Indian hedgehog
LSAB	Labelled streptavidin-biotin (technique)
m	Männlich
MCE	Multiple cartilaginäre Exostosen
MCDS	Metaphysäre Chondrodysplasie Typ Schmid
PAP-A	Postaxiale Polydaktylie vom Typ A
PBS	Phosphate buffered saline
PHS	Pallister-Hall-Syndrom
Pr	Präparat
PTHrP	Parathyroid hormone-related Protein
R	Resektat
RT	Raumtemperatur
SCE	Solitäre cartilaginäre Exostose
Shh	Sonic hedgehog
MCDS	Metaphysäre Chondrodysplasie Typ Schmid

SSW	Schwangerschaftswoche
TBS	Tris buffered saline
TGF	Transforming growth factor
Ttv	Tout-velu
w	Weiblich
WF	Wachstumsfuge
ZPA	Zone of polarizing activity

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Cartilaginäre Exostosen, auch Osteochondrome genannt, zählen zu den häufigsten benignen Knochentumoren [42, 80, 129]. Es handelt sich um knöcherne Ausziehungen, die, sofern an langen Röhrenknochen lokalisiert, meist schaftwärts gerichtet sind und eine Knorpelkappe unterschiedlicher Dicke tragen [45, 91]. Typisch dabei ist, dass eine kontinuierliche Verbindung des Markraums zum Ursprungsknochen besteht [25, 105, 113]. In der älteren Literatur werden sie oftmals als Hamartome oder hamartöse Läsionen bezeichnet [19, 20, 105]. Vor kurzem gelang jedoch der zytogenetische Nachweis echten klonalen neoplastischen Knorpelgewebes der Kappen. Ob dabei auch die Zellen des knöchernen Stiels Charakteristika neoplastischen Gewebes tragen, oder ob dieser gewissermaßen reaktiv gebildet wird, bleibt weiterhin unklar [14].

Grundsätzlich treten cartilaginäre Exostosen entweder sporadisch als solitäre Exostosen (SCE) oder in ihrer erblichen Form als multiple cartilaginäre Exostosen (MCE) auf [42, 45, 66, 80, 106].

Im Falle multipler cartilaginärer Exostosen scheinen die Patienten in ihrer Körpergröße leicht unter dem Durchschnitt der Normalbevölkerung zu liegen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass der Begriff „Zwergenwuchs“ unangebracht wäre. Vor der Pubertät liegt die Körpergröße der Patienten praktisch vollkommen im Normbereich. Danach tritt eine deutliche Retardierung des Längenwachstums auf im Sinne eines reduzierten Pubertätswachstumsschubes, woraus eine etwas verminderte Endgröße resultiert. Diese ist durch eine mäßige Dysproportionierung bedingt, die auf einer Wachstumseinschränkung mit Deformierung der Extremitäten beruht, während das Achsenskelett der Wirbelsäule nur selten oder leicht betroffen ist [80, 110, 112]. Stärker als die Symphysenhöhe ist dabei die Armspanne betroffen, da sich die gravierendsten Deformierungen hauptsächlich an Ulna und Radius wieder finden.

Die Verteilung der Osteochondrome lässt einige Besonderheiten erkennen, die sowohl für die multiple [91, 119], wie auch die solitäre [42, 46] Form gelten. Es sind ausschließlich knorpelig präformierte Knochen betroffen. In erster Linie ist hier die Region des Kniegelenks mit der distalen Metaphyse des Femur und der proximalen Metaphyse der Tibia zu nennen, gefolgt von proximalem Humerus und proximaler Fibula. Im Übrigen werden Exostosen häufig im distalen Bereich der Tibia, der Fibula, des Radius und der Ulna gefunden. Auffallend selten sind sie im Gegensatz zum Kniegelenk, im Bereich des Ellenbogens lokalisiert. Möglicherweise liegt die Ursache hierfür in den unterschiedlichen

Wachstumsaktivitäten der jeweils benachbarten Epiphysenfugen. Im Durchschnitt betrefflich alters- und geschlechtsabhängiger Unterschiede beläuft sich der relative Beitrag zum Wachstum des Femurs in der kniegelenksnahen Epiphysenfuge auf 70 %. Der Beitrag der proximalen Tibia- und Fibulafuge zur Längenentwicklung des Unterschenkels beträgt immerhin noch 55 % [12, 89, 98]. Das Wachstum der oberen Extremität hingegen findet zu jeweils 80 % für Humerus, Radius und Ulna ellenbogenfern statt [12, 89, 96, 97]. Weiter, wenn auch seltener, finden sich cartilaginäre Exostosen an Becken, Schulterblatt, Rippen, Schlüsselbein, Wirbelkörpern, den langen Hand- und Fußknochen und sogar ausnahmsweise an den knorpelig angelegten Schädelknochen [11] und den Ossa carpalia et tarsalia [20, 42, 46, 91, 107, 113, 119].

Die Prävalenz multipler Osteochondrome wird mit einem Wert von 1,4 bis 5 pro 100.000 angegeben [38, 82, 107]. Die gut begrenzte Bevölkerung der Insel Guam hingegen weist einen wesentlich höheren Wert mit einer Erkrankung pro 1000 Einwohner auf [58]. Zwischen 65 % [113] und 89 % [65] der Erkrankten sollen bis zu ihrem etwa 6. Lebensjahr identifiziert sein [38]. Wesentlich häufiger ist die solitäre Form [45]. Bei etwa 1 bis 2 % aller Patienten, die ausgedehnte Röntgenuntersuchungen durchlaufen hatten, konnte nach Mirra 1989 [80] eine asymptomatische Exostose nachgewiesen werden. Lange (1989) [61] spricht davon, dass 90 % aller Exostosen in solitärer Ausprägung auftreten, wobei sie 50 % aller gutartigen Knochentumoren ausmachten [42]. Die vornehmliche Altersspanne, in der die solitären Exostosen diagnostiziert werden, ist im Gegensatz zu den multiplen cartilaginären Exostosen das zweite Lebensjahrzehnt [42].

Osteochondrome können die Ursache vielfältiger Beschwerdebilder sein. Zu den Komplikationen zählen kosmetische Probleme, Schmerzen durch Exostosenfrakturen, die Entwicklung einer Bursitis [35, 80, 90] im Falle einer Exostosis bursata [24, 36, 44, 80, 90, 101, 111, 138], Kompression von Rückenmark [18, 103, 123], peripheren Nerven oder Blutgefäßen mit Pseudoaneurysmenbildung [40, 80], aber auch Exostosen als Geburtshindernis [38] sind beschrieben. Nicht zuletzt verursachen sie häufig Extremitätendeformierungen [7, 26], worauf bereits hingewiesen wurde.

Die wohl fatalste Komplikation einer Exostose ist jedoch die Möglichkeit der malignen Transformation in ein sekundäres Chondrosarkom [20, 32]. Die Wahrscheinlichkeitsangaben hierfür variieren in der Literatur beträchtlich. Eher hohe Schätzungen liegen bei 10 – 25 % [19, 20, 46, 129]. Über eher niedrige Wahrscheinlichkeiten zwischen 0,5 % und 5 % berichten neuere Untersuchungen [42, 65, 92, 107, 119, 135]. Hingegen erbrachte die Beobachtung einer Familie mit einer Mutation

des EXT2-Gens über sechs Generationen hinweg kürzlich wieder eine Entartungswahrscheinlichkeit von 8,3 % [56]. Für solitäre Exostosen liegen in der Literatur nur wenige Zahlen vor, doch nimmt man an, dass die Wahrscheinlichkeit der malignen Entartung bei etwa 1 bis 2 % liegt [42, 46]. Es ist davon auszugehen, dass die höhere Entartungsfrequenz multipler cartilaginärer Exostosen durch deren Vielzahl in einem einzigen Individuum hervorgerufen wird. Niemals beziehen sich die Angaben der Literatur auf das Verhältnis der Anzahl maligne transformierter Exostosen zu deren Gesamtzahl, sondern stets auf das Verhältnis an Chondrosarkomen Erkrankter zur Anzahl diesbezüglich gesunder Exostosenträger. Eine unklare Anzahl asymptomatischer Exostosenträger – sowohl der solitären, wie auch der multiplen Ausprägungsvariante – mag zur Problematik der Ermittlung der Entartungswahrscheinlichkeit beitragen.

Ein strahlentherapeutisches Therapieregime bei sekundären Chondrosarkomen, hervorgegangen aus einem Osteochondrom bleibt ohne Effekt [113].

Exostosen sollten chirurgisch entfernt werden, wenn Beschwerden wie Schmerzen, Bewegungseinschränkungen, Nerven- oder Blutgefäßkompressionen, kosmetisch intolerable Entstellungen oder rapides Wachstum eines Osteochondroms auftreten. Die Komplikationsrate der Operationen, in deren Rahmen Entfernungen von cartilaginären Exostosen durchgeführt werden, liegt im Schnitt bei 12,5 % und ist vergleichbar mit einer Metallentfernung, wobei das Verbleiben von Metallresten im Körper die häufigste Komplikation darstellt. Die häufigste Komplikation bei der Exostosenresektion ist dagegen die peroneale Neurapraxie, da die meisten Operationen in der Umgebung des Kniegelenks durchgeführt werden [137]. In der Studie von Wirganowicz (1997) [137] bildete sich die Neurapraxie, vermutlich verursacht durch Zug an den jeweiligen Nerven, stets unter konservativer Behandlung zurück. Die relativ hoch anmutende Komplikationsrate von 12,5 % resultiert in der vorliegenden Untersuchung aber auch aus der Tatsache, dass im Rahmen der Exostosenresektion beispielsweise Korrekturosteotomien durchgeführt wurden. Es wurden 10 Komplikationen an insgesamt 80 Patienten festgestellt bei jedoch 285 resezierten Osteochondromen, was einer Komplikationsrate von 3,5 % pro Osteochondrom entspräche, bzw. 6,3 % pro Operation bei insgesamt 159 durchgeführten Eingriffen, wobei wiederum erweiterte Eingriffe, wie z.B. Korrekturosteotomien, miteinbezogen wurden.

Solitäre Exostosen treten sporadisch auf. Die hereditäre Form mit multiplen Osteochondromen unterliegt einem autosomal dominanten Vererbungsmodus mit kontrovers diskutierter Penetranz. Bei Männern liegt diese stets bei 100%, bei weiblichen

Individuen schwanken die Angaben zwischen 50 und 100% [45, 82, 113, 119, 136]. Die Ausbildung multipler cartilaginärer Exostosen ist genetisch heterogen bedingt [63]. Es konnten bislang 3 Gene identifiziert werden, EXT1, EXT2 und EXT3, von denen jedoch die größte Bedeutung den ersten beiden zuzufallen scheint. EXT1 ist auf Chromosom 8q23-q24, EXT2 auf 11p11-p12 und EXT3 auf 19p lokalisiert. Bis zum Jahr 2000 waren 49 verschiedene Mutationen des EXT1-Gens und 25 verschiedene Mutationen des EXT2-Gens bekannt, welche zusammen für etwa 70 % der Fälle multipler cartilaginärer Exostosen verantwortlich sein sollen [139, 140]. Legeai-Mallet et al. [63] errechneten 1997 die maximale Wahrscheinlichkeit für die Verantwortlichkeit der einzelnen Gene für das Auftreten multipler cartilaginärer Exostosen auf 44 % für den Locus EXT1, und jeweils 28 % für die Loci EXT2 und EXT3. Andere Arbeitsgruppen zeigten jedoch in experimentellen Arbeiten, dass möglicherweise bereits allein die Mutationen des EXT1-Gens mit bis zu 77 % [99] bzw. 79 % [31] zu Buche schlagen.

Über die Geschlechtsverteilung unter den Erkrankten findet man unterschiedliche Angaben. Für multiple Exostosen sind Relationen von 7:3 [114] bis 1:1 [113] mit jeweiliger Bevorzugung des männlichen Geschlechts beschrieben. Neuere Untersuchungen finden zwar ebenso eine Bevorzugung des männlichen Geschlechts, doch ist diese eher diskret ausgeprägt. Schmale berichtet beispielsweise 1995 [107] über ein Verhältnis von 59 % : 41 %, Wicklund im selben Jahr [136] über 76 : 61 in absoluten Zahlen, entsprechend 55 % : 45 %. Auch bei solitären Exostosen herrscht nach wie vor keine Klarheit. Die Angaben variieren zwischen 1 : 1 und 2 : 1 für das Verhältnis männlich zu weiblich [20, 42, 46, 66, 80].

1.1 Pathogenesetheorien

Die erste Theorie zur Pathogenese von Exostosen legte Virchow 1892 [134] vor. Er nahm die Verlagerung eines Knorpelfragments aus der Epiphysenfuge an, welches nach Rotation um 90° sein Wachstum in lateraler, anstatt in longitudinaler Richtung fortsetze. Diese Theorie fand 1968 durch D'Ambrosia [25], der Knorpeltransplantationen an Kaninchen durchführte, experimentelle Unterstützung.

Müller entwickelte 1914 [81] eine konkurrierende Theorie, die sich auf Obduktionsbefunde stützte. Er fand Knorpelinseln im Periost eines Verstorbenen und schloss daraus, dass die osteogene Schicht des Periosts eine abnorme Knorpelproduktionsfähigkeit besitze, welche zu den genannten Knorpelinseln führe. Diese würden sich dann durch Metaplasie in knöcherne Exostosen umwandeln.

Für Keith (1920) [52] stellte der von Periost eingefasste knöcherne Ring, der die Epiphysenfuge umgibt (Encoche 'd Ranvier) die Ursache für die Exostosenentstehung dar. Er diene als Leitstruktur für neuen, enchondral gebildeten Knochen. Ist er jedoch defekt, könne daraus die typische Verbreiterung des Schaftes mit Exostosenbildung erfolgen.

Jaffe (1943) [45] glaubte, die von Müller und Keith aufgestellten Theorien würden sich gegenseitig ergänzen.

Langenskiöld entwarf 1947 [62] die Theorie, dass in der Wachstumsfuge eine Verlagerung von Zellen und Gewebe nicht nur in longitudinaler Richtung stattfindet, sondern auch transversal, also in Richtung der Peripherie der Epiphysenfuge hin gerichtet. Dabei solle sich das weniger differenzierte Gewebe aus dem Inneren der Wachstumsfuge mit seinen chondrogenen Eigenschaften unter normalen Bedingungen weiter differenzieren und auf dem Weg des zentrifugalen Wachstums osteogene Eigenschaften erhalten. Daraufhin würde sich schließlich aus den Chondroblasten eine Schicht von Osteoblasten entwickeln, die die Wachstumsfuge ringförmig umgibt. Unterbleibe dieser Vorgang, sei die Möglichkeit der Entstehung eines Osteochondroms gegeben.

1962 diskutierte Bethge [11] alle bereits genannten Theorien und begründete darauf seine eigene. Bei Exostosen handle es sich seiner Meinung nach um Fehlbildungen der gesamten Enden der Knochen, ähnlich der Polydaktylie, bei der ganze Extremitätenanteile zuviel angelegt sind.

Pazzaglia [91] hingegen bezog sich 1990 auf einen moderneren Begriff, das sog. „Remodelling“, als Knochenumbaumodell. Er führte den Begriff der „Full-Thickness-Exostosis“ ein und meinte damit insbesondere die auffällige Schaftverplumpung, die bei multiplen cartilaginären Exostosen im Bereich der Metaphysen auftritt. Er glaubte, ein lokaler, peripherer Defekt des „Remodellings“ beim Wachstum über eine begrenzte Zeit ermögliche das Wachstum eines peripheren Epiphysenknorpelstücks in lateraler Richtung. Auch die Entstehung der gestielten Exostose könne so erklärt werden, da ein Knorpelanteil, der nicht mehr von Ranviers perichondralem Ring geführt werde, in der Lage sei, eine Rotation mittels Zugkräften aus dem umgebenden Bindegewebe durchzuführen. So würde sich die gestielte Exostose in der typischen Kleiderhakenform schaftwärts ausrichten.

Die neueste Theorie basiert auf molekularbiologischen Untersuchungen. Die Grundlage bildet dabei die Tatsache, dass das EXT1- und das EXT2-Gen wohl als Tumorsuppressorgene fungieren, welche Heparansulfatpolymeraseaktivität aufweisen [76, 77, 78]. Hinzu kommt, dass als neues Mitglied der EXT-Genfamilie das sog. tout-velu

(Ttv) identifiziert wurde, das wie das menschliche EXT1-Genprodukt ein glykosyliertes transmembranäres Typ II-Protein zu sein scheint [28] und bei *Drosophila melanogaster* von Bedeutung ist für die Diffusion des Hedgehog-Proteins (Hh), einem homologen Protein des menschlichen Indian hedgehogs (Ihh). Die Befunde legen nahe, dass Ttv, respektive EXT1, verantwortlich für die Synthese von Heparansulfat, die Diffusion von Hh, bzw. Ihh erleichtern könnten [9]. Weiterhin werden EXT1 und EXT2 in den Chondrozyten der Proliferationszone der Wachstumsfuge exprimiert, nicht mehr jedoch von hypertrophen Chondrozyten. Somit fällt deren Expressionsmuster genau mit dem von Ihh zusammen [118]. Ihh wiederum erhöht die Expression von PTHrP (parathyroid hormone-related protein) im Perichondrium, welches über eine Rückkopplungsschleife die Produktion von Bcl-2, einem gut charakterisierten antiapoptotisch wirksamen Protein, in den Chondrozyten der Proliferationszone anhebt. Erst wenn das Fließgleichgewicht dieses Rückkopplungsmechanismus gestört ist, bzw. eine kritische Schwelle unterschritten wird, folgt daraus die Induktion der Apoptose in den betreffenden Knorpelzellen und die Verkalkung des entsprechenden Areals. Lin et al. zeigten außerdem 1998 [67], dass Ihh bei EXT1^{-/-} Mäuseembryonen nicht an die Oberfläche der Zielzellen binden kann, was darauf hinweist, dass die durch EXT1 geregelte Heparansulfatsynthese notwendig ist für die Bindung von Ihh.

Würde also in einem EXT^{+/-}-Individuum eine somatische Mutation zu der ererbten Konstellation hinzutreten und ein EXT^{-/-}-Zellklon entstehen, so würde an genau dieser umschriebenen Stelle die Rückkoppelungsschleife zur Regulation des enchondralen Knochenwachstums unterbrochen werden, um zu vorzeitiger hypertropher Differenzierung zu führen. Dies würde schließlich genau an diesem Ort gestörtes Knochenwachstum zur Folge haben [28].

Ergänzend sind die Befunde zweier kürzlich erschienenen unabhängiger Arbeiten anzufügen. Dabei fanden Bernard (2000) [10] sowie Legeai-Mallet et al. (2000) [64], eine veränderte Zellmorphologie bei Chondrozyten aus Exostosen. Diese enthielten abnorm hohe Mengen an muskelspezifischem α -Aktin. Dadurch bedingte Anomalien in der Formierung des Zytoskeletts könnten wiederum nicht näher spezifizierte regulatorische Funktionen des Zellskeletts beeinflussen. Möglicherweise resultierten die Anreicherungen von muskelspezifischem α -Aktin aus einer enzymatischen Aktivitätseinbuße der EXT1- und/oder EXT2-Genprodukte.

1.2 Die Morphologie der Wachstumsfuge

Da cartilaginäre Exostosen durch enchondrale Ossifikation wachsen, besitzen sie am Übergang der Knorpelkappe auf den darunter liegenden Knochen eine Wachstumsfuge, die morphologisch jeweils hoch organisiert oder relativ unorganisiert imponieren kann. Im Hinblick darauf, dass praktisch alle Pathogenesetheorien sich auf einen Defekt in oder an der Wachstumsfuge beziehen, ist es notwendig, die Morphologie und Physiologie der regulären Wachstumsfuge zu verstehen.

Heutzutage wird die Wachstumsfuge als ein Organsystem betrachtet, das den fibrösen perichondralen Ring (Encoche `d Ranvier) mit umfasst [102]. Sie besteht aus vier histologisch abgrenzbaren Zonen zwischen Epiphyse und Metaphyse.

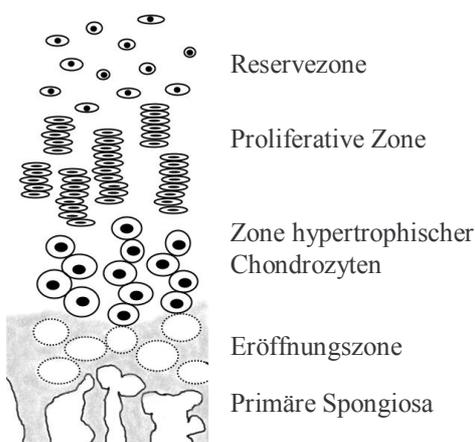


Abb. 1: Schematische Darstellung der Wachstumsfuge

1. Zone der germinativen Knorpelzellen oder Reservezone
2. Zone der proliferativen Knorpelzellen oder Zone des Säulenknorpels
3. Zone der hypertrophischen Knorpelzellen oder Zone des Blasenknorpels
4. Zone der degenerativen Knorpelzellen oder Eröffnungszone

Darauf folgen die primären Spongiosabälkchen, bestehend aus kalzifiziertem Knorpel, an dem noch kein Knochen angebaut wurde (Abb. 1). Durch Anlagerung von osteoidproduzierenden Osteoblasten entstehen die sog. sekundären Spongiosatrabekel [43]. In der Zone des germinativen Knorpels findet das Wachstum vornehmlich in transversaler Richtung statt, wohingegen die Chondrozyten der Proliferationszone für das longitudinale Wachstum verantwortlich sind [23]. Selbstverständlich ist die Wachstumsfuge in ihrer Entstehung auch einer ständigen Entwicklung unterworfen. Zwischen der 11. und 16. SSW zeichnet sie sich noch durch sehr hohe Zelldichte mit einer nur andeutungsweise

organisierten Zone von säulenartig angeordneten Chondrozyten aus [102]. Zwischen der 20. und 41. SSW nimmt die Dicke der Wachstumsfuge ab, die Ausbildung deutlicher Säulenformationen jedoch zu. In der Neonatalperiode hingegen wächst dann die Dicke der Epiphysenfuge wieder an [102] und bleibt konstant bis zur skelettalen Reife [47]. Die Orientierung der Chondrozyten ist im Normalfall streng longitudinal, jedoch weicht davon das Muster in der Peripherie der Epiphysenfuge ab, wo die Zellsäulen eher schräg angeordnet sind. Ebenso wird die einheitliche Anordnung durch vaskuläre Kanäle gestört, die die Wachstumsfuge durchqueren. Gerade diese seien in der Lage zusätzlich Zellhypertrophie zu induzieren [102]. Die auch als transphysäre Kanäle bezeichneten Gefäße erstrecken sich vom epiphysären Blutgefäßsystem durch die Wachstumsfuge bis hin zur Metaphyse, allerdings atrophieren sie nach dem ersten Lebensjahr vollständig, so dass die Wachstumsfuge dann gefäßfrei ist.

Betrachtet man das sekundäre Ossifikationszentrum eines Röhrenknochens, so kann man auch hier wachstumsfugenartige Strukturen erkennen. Im Zentrum der Epiphyse kommt es zur Chondrozytenhypertrophie, Mineralisation der Matrix und schließlich zur Knochenbildung. Das so entstandene sekundäre Ossifikationszentrum wird im Folgenden von einer „sphärischen Wachstumsfuge“ umgeben. Die kugelige Form bildet sich später in eine Halbkugel um, wobei sich die virtuelle Wachstumsfuge diesem Vorgang anpasst und schließlich nur noch stellenweise anzutreffen ist [47].

1.3 Die Kollagene

Der bindegewebige Hauptteil von Knochen und Knorpel besteht aus Kollagen. Es erscheint sinnvoll cartilaginäre Exostosen diesbezüglich näher zu charakterisieren, da hierzu in der Literatur noch keine genaueren Untersuchungen vorliegen. Wichtige Kollagene sind dabei die Typen I, II und X. In den nächsten Abschnitten seien sie daher in ihrer Struktur und Aufgabe näher vorgestellt.

1.3.1 Kollagen Typ I

Kollagen Typ I kommt vornehmlich in Haut, Knochen, Sehnen, Blutgefäßwandungen oder auch im Dentin vor und macht in seiner Masse mehr als 80 % des gesamten Körperkollagens aus. Es gehört zur Gruppe der fibrillären Kollagene und setzt sich als Heterotrimer aus zwei $\alpha 1(I)$ -Ketten und einer $\alpha 2(I)$ -Kette zusammen. Die Untereinheiten werden im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert [132] und tragen, was die

$\alpha 1(I)$ -Kette betrifft, als Prokollagen am N-terminalen und am C-terminalen Ende eine globuläre Domäne von 139 bzw. 246 Aminosäureresten. Die helikale Domäne hingegen besitzt 1056 Aminosäurereste [79]. Das Prokollagen der $\alpha 1(I)$ -Kette hat ein Molekulargewicht von $M_r=140.000$, das der $\alpha 2(I)$ -Kette eines von $M_r=125.000$. Durch extrazelluläre enzymatische Spaltung mittels spezifischer Proteasen werden die endständigen globulären Anteile abgespalten, wodurch das sog. Tropokollagen entsteht (jeweils $M_r=95.000$, Länge etwa 300 nm [79]). Aggregate von Tropokollagenmolekülen bilden die Protofibrillen, aus welchen durch kovalente Vernetzung Mikrofibrillen hervorgehen. Mehrere dieser wiederum lassen eine Kollagenfibrille entstehen, die in ihrer Vielzahl die nächst größere Einheit bildet, nämlich die Kollagenfaser [8]. Bemerkenswert wäre noch, dass die Polymerisierung der Tropokollagenmoleküle (3 α -Helices) nach einem bestimmten Muster vonstatten geht, bei dem sie sich axial jeweils um 67 nm verschoben anordnen. Dies ist die Grundlage der typischen Querstreifung der Mikrofibrillen in der elektronenmikroskopischen Darstellung [79].

1.3.2 Kollagen Typ II

Kollagen Typ II kommt hauptsächlich in hyalinem, elastischem, wie auch fibrösem Knorpel vor, folglich unter anderem in der Bandscheibe sowie im Glaskörper des Auges, in der Chorda dorsalis, im Epithel der embryonalen Cornea und in der neuralen Retina [132]. Das Kollagen-II-Molekül ist ein Homotrimer aus drei $\alpha 1(II)$ -Ketten, die jeweils ein Molekulargewicht von $M_r=95.000$ aufweisen. Die Synthese erfolgt analog der Beschreibung zu Kollagen Typ I. Folglich bildet sich ebenfalls eine fibrilläre Struktur aus. Die fibrillären Kollagene ihrerseits stammen von einem einzigen Ur-Gen ab [79, 121]. So zeigt die $\alpha 1(II)$ -Kette ausgeprägte Homologien zur $\alpha 1(I)$ -Kette. Der hauptsächliche Unterschied zwischen Kollagen I und II besteht im Grad der posttranslationalen Modifikation, wobei Kollagen Typ II beispielsweise an einigen Hydroxylisnresten stärker glycosyliert ist. Im hyalinen Knorpel repräsentiert Kollagen Typ II etwa 80 % der Kollagenfibrillen. Die übrigen 20 % machen die Kollagene IX und XI aus [17]. Der Anteil an Kollagen II des Trockengewichts von Gelenkknorpel beträgt 30 %, 65 % machen Proteoglykane aus. Ersteres ist für die mechanische Zugfestigkeit verantwortlich, letztere für die Kompressionsfestigkeit. Interessanterweise enthält die perizelluläre Matrix der Chondrozyten dabei besonders feine Fibrillen mit einem Durchmesser von etwa 4 bis 10 nm, die territoriale und extraterritoriale Matrix hingegen dickere Fibrillen von 30 bis

200 nm Durchmesser [59]. Um auf den Aufbau einer Kollagen-II-Fibrille zurückzukommen, so ist zu beachten, dass sie einen Kern aus Kollagen XI besitzt, welches sich in ähnlicher Periodizität, wie Kollagen I anordnet. Um diesen Kern lagern sich die Kollagen-II-Moleküle an, an die sich in antiparalleler Richtung (beachte das amino- und carboxyterminale Ende) außen Kollagen-IX-Moleküle anheften. Letztere vermögen es, eine Verbindung zu Chondroitinsulfatketten herzustellen und so eine Interaktion mit der nichtfibrillären Matrix zu schaffen [17].

1.3.3 Kollagen Typ X

Kollagen Typ X ist ein entwicklungsabhängig reguliertes Protein, das von Chondrozyten der hypertrophen und verkalkenden Zone der Wachstumsfuge gebildet wird. Somit ist es abwesend in ruhendem Knorpel und bemerkenswerter Weise auch in schnell proliferierendem Knorpel [121]. Im Gegensatz zu den bereits vorgestellten Kollagenen handelt es sich um ein nicht fibrilläres Kurzkettenkollagen, das als Homotrimer aus drei $\alpha 1(X)$ -Ketten zusammengesetzt ist. Eine dieser Ketten besitzt ein Molekulargewicht von $M_r=59.000$ [70, 79, 121]. Das zugehörige Gen wurde auf Chromosom 6q21-q22 lokalisiert. Das Prokollagen (Abb. 2) wird mit einer globulären N-terminalen, 52 Aminosäurereste umfassenden (NC2), und einer C-terminalen, 162 Aminosäurereste großen globulären Domäne (NC1) sezerniert. Zwischen diesen beiden Domänen befindet sich ein 460 Aminosäuren langes helikales Stück (Col1) [121].

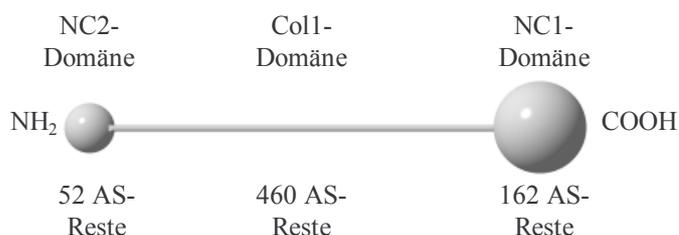


Abb. 2: Schema des Prokollagenmoleküls von Kollagen Typ X (AS-Reste: Aminosäurereste; Zeichnung nicht maßstabsgetreu)

Im Zuge der extrazellulären Prozessierung wird lediglich die N-terminale Domäne abgespalten [70]. Das so entstehende Molekül hat eine Länge von etwa 150 nm [79], wobei die helikale Domäne 138 nm ausmacht [70]. In vitro durchgeführte Experimente ergaben zwei mögliche supramolekulare Formen der Anordnung. Die erste Möglichkeit besteht in

der Ausbildung perizellulärer Matten, die sich auf eine hexagonale Formation der Kollagenmoleküle zurückführen lässt. Dabei bilden je sechs hydrophobe carboxyterminale, globuläre Enden einen Knotenpunkt [17, 70]. Ein derartiges Phänomen wurde bereits für Kollagen Typ VIII in vivo für die Descemet'sche Membran der Cornea nachgewiesen. Der Durchmesser der Fibrillen in einer solchen Struktur beträgt weniger als 5 nm, was darauf schließen lässt, dass sich entweder nur wenige Moleküle lateral aggregieren, oder es sich sogar nur um einzeln liegende Moleküle handelt [70]. Die zweite Möglichkeit ist die Assoziation von Kollagen X mit den 10 bis 20 nm dicken cartilaginären Kollagen-II/IX/XI-Fibrillen, wobei sie an deren Oberfläche kovalent gebunden sind [70]. In vitro konnten zudem Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Interaktionen zwischen der großen globulären NC1-Domäne des Kollagens Typ X und Chondrozyten nachgewiesen werden [71].

Die Aufgabe von Kollagen X bleibt weiterhin unklar. Eine der ersten Vermutungen war, dass Kollagen X bedeutsam für den Mineralisationsprozess sei. Tatsächlich konnte auch von Kirsch und von der Mark (1991) [55] nachgewiesen werden, dass Kollagen X mit hoher Affinität Kalziumionen bindet, besonders an der C-terminalen globulären Domäne. Da jedoch eine große Zahl weiterer extrazellulärer Matrixproteine, inklusive der Proteoglykane, in den Kalzifizierungsprozess mit einbezogen sind, kann keine definitive Funktion des Kollagens Typ X diesbezüglich festgemacht werden [55]. Möglicherweise bewirkt Kollagen X dabei, gewissermaßen als perizelluläres Netzwerk, eine Kompartimentbildung von Matrixkomponenten als Voraussetzung für eine geordnete Mineralisierung und anschließende Knochenformierung [60]. Andere Theorien besagen, dass es sich um einen Triggerfaktor für Endothelzellproliferation und damit der Angiogenese handeln könnte oder auch um ein rein mechanisches Gerüst, das einen Kollaps der Matrix während der enchondralen Ossifikation verhindern soll [121]. Zudem existieren konkurrierende Meinungen darüber, ob nun die Bildung von Kollagen Typ X als Folge der Knorpelzellhypertrophie auftritt [70] oder ob extrazelluläres Kollagen X erst eine vollständige Hypertrophie von Chondrozyten ermögliche [71].

Eine mit einem Defekt des Kollagen-X-Gens verbundene autosomal dominant erbliche Erkrankung ist die Metaphysäre Chondrodysplasie Typ Schmid (MCDS), bei der mit Zwergwuchs verbundene metaphysäre Abnormitäten auftreten. An diesbezüglich transgenen Mäusen konnte eine Reduktion der Dicke der Wachstumsfugen nachgewiesen werden [34, 121]. Zusätzlich zeigten Kwan et al. 1997 [60] an Kollagen-X-Null-Mausmutanten eine quantitative Reduktion von Matrixvesikeln in der oberen Zone

hypertrophen Knorpels sowie eine abnorme Verteilung von Proteoglykanen, was zusammen mit einer veränderten Struktur und Architektur neu gebildeter Knochen trabekel zu phänotypischen Veränderungen führe, welche an MCDS erinnerten, jedoch in wesentlich geringerer Ausprägung als bei einem echten MCDS-Modell. Rosati et al. (1994) [104] fanden bei Knockout-Mäusen bezüglich des Kollagen-X-Gens hingegen keinerlei skelettale Veränderungen, was darauf hinweist, dass womöglich lediglich ein defektes Molekül krankheitsinduzierend wirkt, nicht jedoch das Fehlen.

1.4 Ki-67

Ki-67 ist ein proliferationsassoziiertes Kernprotein, das während der G₁, S, G₂ und M-Phase des Zellzyklus exprimiert wird, jedoch nicht in der G₀-Phase. Genauer gesagt beginnt die Expression in der Mitte der G₁-Phase, woraufhin der Spiegel im Laufe der S- und G₂-Phase ansteigt, um seinen Höhepunkt in der M-Phase zu erreichen [33]. Das Antigen findet sich in aktiven Interphase-Zellen hauptsächlich im Bereich des wiederentstehenden Nucleolus sowie an anderen Orten des Zellkerns, welche Zentromeren- und Teleomeren-Satelliten-DNA enthalten. Während der S-Phase befindet sich praktisch das gesamte vorhandene Ki-67-Protein in der dichten fibrillären Komponente des Nucleolus. In der Mitosephase lagert es sich um und nimmt eine perichromosomale Lokalisation ein [74]. Es wurden zwei Isoformen identifiziert, wobei in vitro die Form der Mitosephase durch Phosphatase in die Interphaseform übergeführt werden kann. Möglicherweise regeln somit zellzyklusspezifische Kinasen und Phosphatasen die Ki-67-Verteilung im Zellkern [72]. Es existieren zwei „Splicing-Varianten“ des relativ großen Proteins mit einem Molekulargewicht von 395 bzw. 345 kDa [74]. Da das Ki-67-Protein offensichtlich keine Homologien zu anderen Proteinen bekannter Funktion aufweist, konnte bislang nicht durch Homologievergleich auf seine Funktion geschlossen werden. Auch fehlen beispielsweise äquivalente experimentelle Drosophila- oder Hefemodelle [16]. Studien zur topographischen Beziehung zu anderen Kernproteinen bekannter Funktion legen nahe, dass das Ki-67-Protein als DNA- und RNA-bindendes Protein, das womöglich zudem an komplexen Proteininteraktionen beteiligt ist, an einer späten rRNA-Prozessierung beteiligt ist. Da die Ribosomensynthese jedoch auch ohne Anwesenheit des Ki-67-Proteins ablaufen kann, trägt es möglicherweise zu einer Effizienzsteigerung der prä-rRNA-Prozessierung bei, um somit den erhöhten Ribosomenbedarf bei der Zellteilung decken zu können [73]. Dies stellt momentan den Stand des Wissens und den Anfangspunkt des Verständnisses der Funktion von Ki-67 dar.

Nichtsdestotrotz ist Ki-67 seit langem ein zuverlässiger Proliferationsmarker. Setzt man die Anzahl Ki-67-positiver Kerne in Relation zur gesamten Kernzahl, so erhält man die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation [5, 115, 130, 131]. Immunhistochemisch gefundene Ergebnisse sollen in Tabelle 1 beispielhaft aufgeführt werden, um einen Eindruck über Wachstumsfraktionen unterschiedlicher Gewebe zu erhalten.

Tab. 1: Mittels Ki-67 ermittelte Wachstumsfraktionen anderer Autoren

Autor	Gewebe	Wachstumsfraktion
Davis (1998) [27]	10 Chondrosarkome	„signifikante Färbung“
	10 Enchondrome, 20 primäre synoviale Chondromatosen, 10 normale Gelenkknorpelproben	„keine signifikante Färbung“
Vollmer (1989) [131]	Hoch malignes Osteosarkom	9 - 28 %
	Maligner Riesenzelltumor	16,6 %
	Chondrosarkom	2,8 - 8,4 %
	Benigner Riesenzelltumor	1,1 - 8,9 %
	Fibröse Dysplasie	<1,0 - 3,6 %
	Enchondrom	<1,0 - 2,5 %
Scotlandi (1995) [109]	Osteosarkom Grad I	0,3 %
	Osteosarkom Grad II	4,0 %
	Osteosarkom Grad III	10,6 %
	Osteosarkom Grad IV	13,7 %
	Benigner Riesenzelltumor	5,8 %
	Chondroblastom	0,4 %
Apte (1990) [5]	Proliferationszone des distalen Femurs eines 5 Tage alten Kaninchens	53 %
Apte (1992) [6]	Proliferationszonen fetalen epiphysären Knorpels	40 – 50 %

1.5 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit

Da die Pathogenese cartilaginärer Exostosen weiterhin nicht vollständig geklärt ist, scheint eine morphologische Bestandsaufnahme mit Charakterisierung im Bezug auf die Verteilung vorherrschender Kollagene sinnvoll.

Immunhistochemisch sollen Hinweise auf mögliche strukturelle und biochemische Unterschiede in Exostosen von Kindern und Jugendlichen zu Resektaten Erwachsener dargestellt werden. Von besonderem Interesse bezüglich Vorkommen und Verteilung ist dabei neben den Strukturproteinen Kollagen Typ I und II, Kollagen Typ X in hyalinem Knorpel nach Abschluss des regulären Körperwachstums.

Da cartilaginäre Exostosen sich insbesondere durch das Vorhandensein einer Wachstumsfuge auszeichnen, sollen als korrespondierende Proben zum Vergleich Präparate fetaler wie postnataler Wachstumsfugen unterschiedlicher Herkunft herangezogen werden.

Neben dem gewebemorphologischen Vergleich scheint es auch interessant, die proliferative Aktivität in den Wachstumszonen der einzelnen Entitäten durch Darstellung des proliferationsassoziierten Kernproteins Ki-67 aufzuklären, wiederum mit der Maßgabe mögliche Unterschiede in präadoleszentem sowie adultem Gewebe cartilaginärer Exostosen herauszuarbeiten.

2. Material und Methodik

Verwendetes Probenmaterial

- Ca. 2,5 µm starke Paraffinschnitte der zu untersuchenden Entitäten auf silanisierten Objektträgern

Verwendete Geräte

- Einbettgerät: Histokinette 2000, Reichert-Jung, Wien, Austria
- Ausgießstation: Leica EG 1140H, Leica Microsystems, 69226 Nussloch, Deutschland
- Mikrotom: Supercut 2050, Reichert-Jung, Wien, Austria
- Wasserbad: Typ 24900, MEDAX Nagel GmbH, Kiel, Deutschland
- Wasserbad: Laktotherm 1, Modell LTH 232312, Dinkelberg-Labortechnik, Neu-Ulm, Deutschland
- Wärmeplatte: Typ 13800, MEDAX Nagel GmbH, Kiel, Deutschland
- Brutschrank: Typ UL 50, Memmert, Schwabach, Deutschland
- Kühlschrank: Bosch Export – 461, Deutschland
- Waage: L 2200 S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Waage: R 160 P, Sartorius, Göttingen, Deutschland
- pH-Meter: Mikroprozessor-pH-Meter 762, Knick, Berlin, Deutschland
- Temperatur-pH-Elektrode: N 1042 A, Schott, Hofheim a. Ts., Deutschland
- Vortex-Mischgerät: Typ VF2, Janke & Kunkel, Staufen i. Br., Deutschland
- Beheizbares Rührgerät: Typ RCT, Janke & Kunkel, Staufen i. Br., Deutschland
- Pipetten: Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipetierhilfe: Pipetus-Akku, Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
- Spülmaschine: Compact-Desinfector G7735, Miele, Gütersloh, Deutschland
- Mikroskop: Polyvar, Reichert-Jung, Wien, Austria
- Auflichtmikroskop: STEMI SV8, Zeiss, Jena, Deutschland
- Kaltlichtleuchte: KL 1500 electronic, Schott, Wiesbaden, Deutschland
- Mikroskopfilter: HTMC KB3 (82B) M49 (IV), Hamaphot KG Hanke & Thomas, Monheim, Deutschland

Verwendete Hilfsmittel

- Objektträger: ca. 76x26x1 mm No. 1000200, Marienfeld, Deutschland
- Deckgläser

- Glasküvetten
- Feuchte Kammer, bestehend aus einer Plastikschaale und einer Glasplatte (24 x 32 cm)
- Pipettenspitzen: Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Präpariernadeln, Skalpelle und Pinzetten
- Zellstoff

Verwendete Pufferlösungen

- PBS-Beutel, **Phosphat buffered saline** pH 7,4 (Cat. No. 1000-3, Sigma, München)
- TBS, **Tris buffered saline** pH 7,2
8,77 g (0,15 mol) NaCl (Best. Nr. 0278, J. T. Baker, Deventer, Holland) und 6,06 g (0,05 mol) Tris (Best. Nr. US75825, USB, Cleveland, Ohio, USA) wurden in 500 ml Aqua demin. gelöst und mit verdünnter Salzsäure (1 N, Best. Nr. 7088, J. T. Baker, Deventer, Holland) auf pH 7,2 eingestellt. Danach wurde mit Aqua demin. auf 1 l aufgefüllt. Es folgte eine pH-Korrektur mit HCl (1 N) oder NaOH (1 N).
- Tris-Puffer pH 7,5
6,1 g Tris (Best. Nr. US75825, USB, Cleveland, Ohio, USA) wurde in 50 ml Aqua demin. gelöst, 37 ml verdünnte Salzsäure (1 N, Best. Nr. 7088, J. T. Baker, Deventer, Holland) hinzugefügt und auf 1 l aufgefüllt. Eine eventuelle Korrektur erfolgte mit HCl (1 N).
- Zitronensäure-Phosphatpuffer pH 5,0
48,6 ml 0,1 M Zitronensäurelösung (21,01 g Zitronensäure-Monohydrat (Best. Nr. 1.00244.1000, Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1000 ml Aqua demin.) und 51,5 ml 0,2 M Di-Natriumhydrogenphosphatlösung (35,6 g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Best. Nr. 6576, Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1000 ml Aqua demin.) wurden gemischt und der pH-Wert auf 5,0 eingestellt.
- Zitronensäure-Zitratpuffer pH 6,0
9 ml 0,1 M Zitronensäurelösung (10,5 g Zitronensäure-Monohydrat (Best. Nr. 1.00244.1000, Merck, Darmstadt, Deutschland) in 500 ml Aqua demin.), 41 ml 0,1 M Natriumzitat (14,71 g Tri-Natrium-Zitrat-Dihydrat (Best. Nr. 71405, Fluka, Buchs, Schweiz) in 500 ml Aqua demin.) und 450 ml Aqua demin. ergaben den gewünschten 0,01 M Puffer.
- Acetatpuffer pH 5,2
210 ml 0,1 N Essigsäure (5,75 ml Eisessigsäure (Best. Nr. 56.2500, Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1000 ml Aqua demin.) und 790 ml 0,1 M Natriumacetatlösung (13,61

g Natriumacetat-Trihydrat (Best. Nr. 6267, Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1000 ml Aqua demin.) wurden zum gewünschten 0,1 M Puffer gemischt.

- Boratpuffer pH 8,2
58,0 ml 0,05 M Natriumteraboratlösung (19,07 g Borax (B-7901, Sigma, Steinheim, Deutschland) auf 1000 ml Aqua demin.) und 42,0 ml 0,1 N Salzsäure (Best. Nr. 7088, J.T. Baker, Deventer, Holland) ergaben den gewünschten Puffer.
- Essigsäure 0,5 M
Zu 971 ml Aqua demin. wurden 29 ml Eisessigsäure (Best. Nr. 56.2500, Merck, Darmstadt, Deutschland) gegeben.

Verwendete Enzyme

- Pronase: Protease aus *Streptomyces griseus*, EC 232-909-5, Cat. No. 6911, Sigma, Steinheim, Deutschland
- Proteinase K, lyophilisiert, >30 mAnson U/mg, Art. 7528-1, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Hyaluronidase Typ IV aus Rinderhoden, lyophilisiert, 880 Units/mg solid, EC 3.2.1.35, Cat. No. H-2376, Sigma, Steinheim, Deutschland
- Pepsin aus Schweinemagen-Mucosa, lyophilisiert, 1:60.000, 2,240 Units/mg solid, EC 3.4.23.1, Cat. No. P-7012, Sigma, Steinheim, Deutschland

Verwendete Zutaten zur Immunperoxidasefärbung

- Polyklonaler Anti-Kollagen-I-Antikörper von der Ziege, Cat. No. 1310-01, Southern Biotechnology Associates, Inc., bezogen über Biozol, Eching, Deutschland
- Polyklonaler Anti-Kollagen-II-Antikörper von der Ziege, Cat. No. 1320-01, Southern Biotechnology Associates, Inc., bezogen über Biozol, Eching, Deutschland
- Polyklonaler Anti-Kollagen-II-Antikörper, biotinyliert, von der Ziege, Cat. No. 1320-08, Southern Biotechnology Associates, Inc., bezogen über Biozol, Eching, Deutschland
- Polyklonaler Anti-Kollagen-II-Antikörper, biotinyliert, vom Kaninchen, 0,1 mg/1mg/ml, Cat. No. R1039, Biermann, Bad Nauheim, Deutschland
- Monoklonaler Anti-Kollagen-X-Antikörper Klon X53 von der Maus, Cat. No. 031501005, Quartett, Berlin, Deutschland
- Monoklonaler Anti-Ki-67-Antikörper von der Maus, M7187, DAKO, Hamburg, Deutschland

- Antibody Diluent zur Verdünnung der monoklonalen Antikörper, S3022, DAKO, Hamburg, Deutschland
- Kaninchenserum, X0902, DAKO, Hamburg, Deutschland
- Biotinylierter Anti-Ziege-Antikörper, E466, DAKO, Hamburg, Deutschland
- LSAB-Kit zur Immunperoxidasefärbung, beinhaltend Wasserstoffperoxid (3 %), „Blocking reagent“, einen kombinierten biotinylierten Anti-Maus-anti-Kaninchen-Antikörper, peroxidasemarkiertes Streptavidin und 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) als Chromogen, K0680, DAKO, Hamburg, Deutschland
- Wasserstoffperoxid 30 %, Best. Nr. 7210, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Detergens: Brij 35, Best. Nr. 16005, Fluka, Buchs, Schweiz
- Eindeckmedium: Kaisers Glyceringelatine, Best. Nr. 9242, Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1 Das Probenmaterial

Die Präparate cartilaginärer Exostosen, der Polydaktylien und des Kniegelenks eines 9 Jahre alten Jungen stammten von symptomatischen Patienten und wurden mit deren, bzw. dem Einverständnis ihrer Eltern an der Orthopädischen Klinik des Rehabilitationskrankenhauses Ulm reseziert. Das übrige Sektionsmaterial wurde freundlicherweise von Prof. Dr. med. H. Arnholdt (Direktor der Abteilung Pathologie am Zentralklinikum Augsburg) und Prof. Dr. med. A. G. Nerlich (Pathologisches Institut der LMU München) zur Verfügung gestellt. Tabelle 2 stellt das Patientengut in einer Übersicht zusammen.

Tab. 2: Charakteristik der Präparate

	Präp.-Nr.	Lebensalter	Geschlecht	Bemerkung
Multiple cartilaginäre Exostosen	1,2	11/12 Jahre	w	Zweimalige Resektion im Abstand von 1 1/2 Jahren
	3	13 Jahre	m	
	4	13 Jahre	w	
	5	28 Jahre	w	Fast kein Knorpel vorhanden
	6	42 Jahre	m	
Solitäre cartilaginäre Exostosen	7	7 Jahre	w	
	8	10 Jahre	w	
	9	10 Jahre	w	
	10	12 Jahre	w	
	11	12 Jahre	m	
	12	13 Jahre	w	
	13	15 Jahre	w	
	14	23 Jahre	m	
	15	26 Jahre	w	
Postnatale Wachstumsfugen	16	8 Tage (Polydaktylie)	m	
	17	5 Monate (Polydaktylie)	w	
	18	6 Monate (Polydaktylie)	m	
	19	10 Monate (Polydaktylie)	w	
	20	10 Monate (Polydaktylie)	w	
	21	10 Monate (Polydaktylie)	w	
	22	1,5 Jahre (Femurkopf)	n.a.	
	23	2,5 Jahre (Femurkopf)	n.a.	Keine Kollagen-X- bzw Ki-67-Färbung (Größe/Zustand)
	24	8 Jahre (Femurkopf)	n.a.	Keine Kollagen-X- bzw Ki-67-Färbung (Größe/Zustand)
	25	9 Jahre (WF Kniegelenk)	m	
Fetale Wachstumsfugen	26	16. SSW	w	
	27	19. SSW	m	
	28	20. SSW	m	
	29	20. SSW	m	
	30	22. SSW (Eineiiger Zwilling I)	m	
	31	22. SSW (Eineiiger Zwilling II)	m	
	32	23. SSW	w	

Zur Untersuchung kamen 6 Präparate multipler cartilaginärer Exostosen von 5 Patienten, wobei von einer Patientin 2 Proben vorlagen, die im Abstand von eineinhalb Jahren gewonnen worden waren. 3 der Probanden konnten bezüglich der Skelettreifung mit einem chronologischen Alter zwischen 11 und 13 Jahren als Kinder und Jugendliche eingestuft werden, 2 als Erwachsene mit einem Alter von 28 bzw. 42 Jahren.

Ähnlich verhält es sich mit den akquirierten solitären Exostosen, deren Träger zum einen zwischen 7 und 15 Jahre alt waren und zum anderen 23 bzw. 26 Jahre. Hierbei wurde je ein Präparat von insgesamt 9 Patienten analysiert.

Die Gruppe postnatalen Wachstumsknorpels setzt sich aus 6 Polydaktylien, 3 Femurköpfen und dem Knorpelanteil aus einem Kniegelenk, gewonnen während einer Epiphyseodese, zusammen. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Resektion lag zwischen dem 8. nachgeburtlichen Tag und 9 Jahren.

Fetaler Knorpel konnte an 7 Präparaten kompletter Kniegelenke mit Femur- und Tibiaanteilen von Feten der 16. bis 22. Schwangerschaftswoche studiert werden. Es wurden ausschließlich Proben zugelassen, die keine erkennbare Erkrankung bezüglich Skelettentwicklung oder Kollagenbiosynthese aufwiesen. Als Referenz hierzu diente der jeweilige Obduktionsbericht.

2.2 Die Aufbereitung der Proben

2.2.1 Die Fixierung

Die Fixierung aller Exostosen sowie aller Polydaktylien erfolgte in Formalin 4 % nach Lillie, pH 7,0 (4,0 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (Best.Nr. 6346, Merck, Darmstadt, Deutschland), 6,5 g Dinatriumhydrogenphosphat (Best.Nr. 6586, Merck, Darmstadt, Deutschland), 900 ml Aqua demin., 100 ml Formaldehydlösung min. 37 % (Best.Nr. 1.04003.2500, Merck, Darmstadt, Deutschland)) über einen Zeitraum von mindestens 72 Stunden. Ebenso wurde mit dem Knorpelanteil aus dem Kniegelenk des 9-jährigen Patienten verfahren, an dem eine Epiphyseodese durchgeführt wurde.

Das Material, das von den bereits genannten Pathologischen Instituten zur Verfügung gestellt wurde, erhielt eine Fixierung in gepuffertem Formalin 10 %. Um eventuelle Unterschiede in der Immunreaktivität auszuschließen, wurde die Probe eines fetalen Kniegelenks (23. SSW, w) zum Vergleich mit Formalin 4 % nach Lillie behandelt.

2.2.2 Die Entkalkung

Da es in vorliegender Studie ausnahmslos galt, Knorpel-Knochen-Schnitte anzufertigen, war es nötig, die stark verknöcherten Präparate einer schonenden Entkalkung zuzuführen, um einerseits die Morphologie möglichst unverändert studieren zu können, andererseits, um eine gute Schnittqualität am Mikrotom zu gewährleisten. Dazu wurde die EDTA-Methode gewählt, die den genannten Anforderungen entspricht [94]. Dies wiederum war mit einem nicht unerheblichen Zeitaufwand verbunden, da stark knöchern durchbaute

Präparate bis zu 6 Wochen zur Dekalzifizierung benötigten. Die Herstellung einer EDTA-Lösung 10 % erfolgte folgendermaßen:

1. 200 g Dinatriumäthyldiamintetraessigsäure-Dihydrat (Titriplex III, Best.Nr. 8421, Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden in 200 ml Aqua demin. aufgeschlämmt,
2. das Ganze in einem 1000 ml Kolben erwärmt, unter dauerndem Rühren 50 ml NaOH 40 % zugesetzt und mit Aqua demin. auf 800 ml aufgefüllt.
3. Durch tropfenweisen Zusatz von NaOH 40 % wurde die Lösung auf den pH-Wert 7,4 eingestellt und mit Aqua demin. auf eine Gesamtmenge von 2000 ml aufgefüllt.

2.2.3 Die Einbettung

Nach Wässerung über mehrere Stunden unter fließendem Leitungswasser erfolgte die Einbettung vollautomatisiert im System Histokinette 2000 von Reichert-Jung über eine Reihe von Isopropanolverdünnungen aufsteigender Konzentration (12h 50 %, 1h 75 %, 1h 75 %, 1h 96 %, 1h 96 %, 1h 100 %, 1h 100 %, 1h 100 %) zu Xylol (zweimal 1h) und schließlich zu Paraffin (1h und 5h). Die Fertigung der zu schneidenden Blöcke erfolgte teils an der Ausgießstation, teils manuell.

2.2.4 Die Fertigung der Schnitte

Dieser Schritt wurde am Reichert-Jung Supercut 2050-Mikrotom durchgeführt. Um dabei eine maximale Qualität morphologischer Details zu erlangen, sei eine Herstellung möglichst dünner Schnitte zu bevorzugen [13]. Dementsprechend wurde eine Schnittstärke von 2,5 µm gewählt, was einer beachtlichen Kunstfertigkeit zur Anfertigung der Präparate bedurfte.

Die Temperatur der Wärmeplatte, die zum Strecken der gewonnenen Proben diente, durfte 60° C nicht überschreiten, um eine Antigendegeneration zu vermeiden. In diesem Schritt wurden die zur immunhistochemischen Färbung verwandten Schnitte auf silanisierte Objektträger aufgebracht. Die Vorbehandlung mit Silan war notwendig, um ein Abschwimmen der Präparate unter den nachfolgenden immunhistochemischen Färbeprozessen zu umgehen.

Silanisierung der Objektträger

Die Objektträger wurden in Extran 10 % (Best.Nr 1.07553, Merck, Darmstadt, Deutschland) über Nacht gereinigt, 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült und

nach kurzem Bad in demineralisiertem Wasser schließlich im Brutschrank bei 50° C getrocknet. Der eigentliche Vorgang des Silanisierens erfolgte in einer Lösung aus 4 ml 3-Aminopropyltriethoxysilan (A-3648, Sigma, Steinheim, Deutschland) und 4 ml Aceton (Best.Nr. 32201, Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland) in 200 ml Aqua demin. für 5 Minuten mit folgendem Waschvorgang in Aceton.

2.3 Die histochemische Färbung mit Hämatoxilin-Eosin und Safranin-O

Die Hämatoxilin-Eosin (HE) Färbung

Die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte waren zu Beginn zu entparaffinieren. Dazu folgte auf ein zweimaliges, 5-minütiges Bad in Xylol die Überführung in die wässrige Phase mittels einer Reihe von Alkoholverdünnungen absteigender Konzentration (Isopropanol 100 % 3 min, 100 % 3 min, 96 % 3 min, 96 % 3 min, 75 % 3 min, Spülung in Aqua demin.). Die Kernfärbung wurde für 10 min. in Hämalaun nach Mayer (Cat. No. HHS-16, Sigma, Steinheim, Deutschland) durchgeführt, mit anschließendem 10-minütigen Bläuen in Leitungswasser. Nach einer weiteren 5-minütigen Behandlung mit Eosin 0,5 % und kurzem Spülen in Aqua demin. wurden die Präparate wiederum entwässert, wozu eine Reihe aufsteigender Alkoholkonzentrationen mit Überführung in Xylol diente. Schließlich wurden die Schnitte mit Eukitt (O. Kindler GmbH & Co, Freiburg, Deutschland) eingedeckt.

Eosin:

Zur Herstellung der Stammlösung waren 1,0 g Eosin gelblich (C. I. 45380, Schmid GmbH & Co Köngen/N, Deutschland) in 50 ml Ethanol 96% und 50 ml Aqua demin. aufzulösen. Die so erhaltene 1-prozentige Lösung musste zur Gebrauchslösung (0,5 %) mit Aqua demin. 1:1 verdünnt werden. Die Ansäuerung von je 50 ml mit einem Tropfen Eisessig sollte das Färbeergebnis verbessern.

Die Safranin-O-Färbung (Saf-O-Färbung)

Die Objektträger wurden nach oben dargestelltem Schema entparaffiniert und die absteigende Alkoholreihe herabgeführt, anschließend 8 Minuten mit saurem Eisenhämatoxilin nach Weigert behandelt, in Aqua demin. gespült und in Leitungswasser für 10 Minuten gebläut. Danach folgte ein 3-minütiges Bad in wässrigem, angesäuertem Fastgreen der Verdünnung 1:5000, eine Spülung in Essigsäure 1 % und eine Färbung mit Safranin-O 0,1 % für 6 Minuten. Ohne weitere Spülung wurden die Proben über eine Reihe

aufsteigender Alkoholkonzentrationen entwässert und nach Überführen in Xylol mit Eukitt eingedeckt.

Saures Eisenhämatoxilin nach Weigert:

2 ml konzentrierte Salzsäure (37 %, rauchend) wurden in 298ml Aqua demin. verdünnt und 2,5 g Eisenchlorid-Hexahydrat (Best. Nr. 3946, Merck, Darmstadt, Deutschland), sowie 4,5 g Eisensulphat-Heptahydrat (Best. Nr. 44970, Fluka, Buchs, Schweiz) gelöst. Schließlich waren 100 ml frischer alkoholischer Hämatoxilinlösung (Weigert A) zuzugeben.

Fastgreen 1:5000:

0,1 g Fastgreen (F-7258, Sigma, Steinheim, Deutschland) wurden als Pulver in 500 ml Aqua demin. aufgelöst.

Safranin-O 0,1 %:

0,5 g Safranin-O (C. I. 50240, Schmid GmbH & Co Köngen/N, Deutschland) wurden als Pulver in 500 ml Aqua demin. gelöst und mit Salzsäure 1N auf einen pH-Wert kleiner 3 eingestellt.

2.4 Die immunhistochemische Darstellung der Kollagene Typ I, II und X und des proliferationsassoziierten Kernantigens Ki-67

2.4.1 Allgemeine Darstellung der Methodik

In erster Linie kam zur immunhistochemischen Färbung die sog. „2-Schritt-indirekte-Methode“ der Immunperoxidasetechnik zum Einsatz [13]. Daneben wurde zusätzlich die direkte Methode als Referenz zur Darstellung von Kollagen Typ II verwendet.

Die 2-Schritt-indirekte Methode der Immunperoxidasefärbung in Avidin-Biotin Technik

Ihren Namen erhielt die Methode aus der Tatsache, dass in einem ersten Schritt ein Antikörper, der sog. Primärantikörper, an das im Präparat darzustellende Antigen gebunden wird und in einem zweiten Schritt ein biotinylierter Sekundärantikörper gegen das F_c-Fragment des Primärantikörpers eingesetzt wird. Da das Hühnereiweißglykoprotein

Avidin bzw. das verwendete Streptavidin 4 Bindungsstellen für Biotin besitzt, kann es an den biotinylierten Antikörper anlagern. Das Avidin selbst ist im Falle der hier angewandten LSAB-Technik mit Peroxidase konjugiert, welche die Farbreaktion katalysiert. Abb. 3 zeigt das Reaktionsprodukt schematisch.

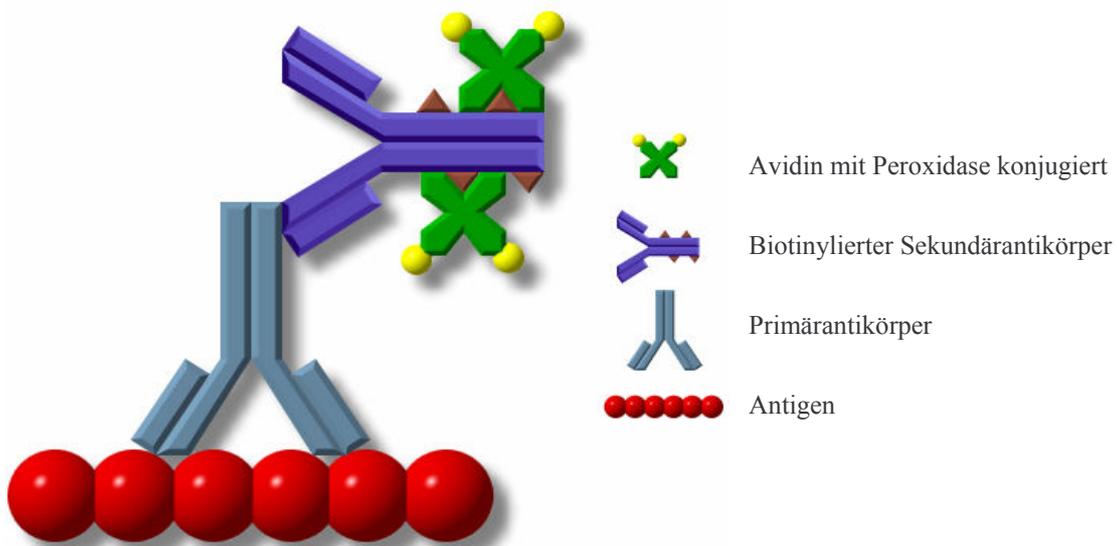


Abb. 3: Schemazeichnung der 2-Schritt-indirekten Methode der Immunperoxidasefärbung in LSAB-Technik

Im Folgenden sei der allgemeine Arbeitsgang für formalinfixiertes Gewebe geschildert. Auf den Vorgang des Andaus soll unter Punkt 2.4.2 genauer eingegangen werden, da dieser eine zentrale Stellung für die Qualität der Färbung einnimmt.

- Zunächst wurden die Präparate entparaffiniert, um wieder in die wässrige Phase überführt zu werden. 15-minütige Inkubation bei 55° C erweichte das Paraffin, das durch Xylol bei Raumtemperatur vollständig ausgelöst wurde. Eine Alkoholreihe absteigender Konzentrationen (Isopropanol 100 %, 100 %, 96 %, 96 %, 75 %, 50 %, Aqua demin.) führte die Präparate schließlich in das wässrige Medium.
- Es folgte der kritische Schritt des Andaus zur Demaskierung der darzustellenden Epitope sowie zur Lösung von Aldehydvernetzungen zwischen Proteinen, die insbesondere durch Überfixation in Formalin verursacht werden.
- Daraufhin wurde die im Gewebe vorhandene endogene Peroxidase, beispielsweise enthalten in Erythrozyten und Leukozyten, durch Zugabe von H₂O₂ 3 % blockiert. Diesem Vorgang liegt das sog. Prinzip der Substrathemmung zugrunde. Die Blockierung ist notwendig, um eine hohe Spezifität der Färbung an der später zur Farbkonversion eingesetzten Meerrettichperoxidase zu erhalten.

- Des Weiteren ist insbesondere bei der indirekten Methode die Blockierung einer unspezifischen Hintergrundfärbung von Bedeutung, die durch ionische Anlagerung von Primär- wie Sekundärantikörpern an stark geladene Proteine (etwa Kollagen) entstehen würde. Dazu wurde sog. Normalserum (d.h. Non-Immunsrum) derjenigen Tierspezies verwendet, von der auch der Sekundärantikörper stammte. Dies verhinderte zudem eine falsch-positive Anfärbung, bedingt durch eine mögliche Bindung des Sekundärantikörpers an Komponenten des Normalserums.
- Danach wurde der Primärantikörper aufgebracht, der im Falle eines monoklonalen Antikörpers mit nur einem Epitop, im Falle eines polyklonalen mit mehreren Epitopen des anzufärbenden Gewebeanteils reagiert. Die Inkubation über Nacht bei 4° C hatte den Vorteil gegenüber einer Inkubation bei 37° C für eine Stunde, dass für dieselbe Farbintensität eine höhere Antikörperverdünnung eingesetzt werden konnte.
- An das F_c-Fragment des Primärantikörpers band nun der Sekundärantikörper, der gegen eben jene Spezies gerichtet sein musste, von der der Primärantikörper stammte. Der Sekundärantikörper war biotinyliert, um im nächsten Schritt die Brücke zum Farbkonversionsenzym schlagen zu können.
- An Streptavidin gebundene Meerrettichperoxidase erfüllte diese Aufgabe. Die Anlagerung von Streptavidin an den Sekundärantikörper kann dabei über die 4 freien Biotinbindungsstellen des Moleküls erfolgen.
- Schließlich war ein sog. „Chromogen“ zur Farbkonversion aufzubringen, bestehend aus H₂O₂ und einem Elektronendonator (hier AEC). Hydrogenperoxid reagiert dabei mit der Peroxidase zu einem Komplex, welcher wiederum mit dem Elektronendonator reagiert, um die Endprodukte, nämlich Wasser und ein rotes Farbmolekül, zu liefern.
- Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayer's Hämalaun und das Eindecken der Präparate mit Glycerin-Gelatine in der wässrigen Phase. Dies war notwendig, um das rote Reaktionsprodukt des AEC, welches in Alkohol und organischen Lösungsmitteln löslich ist, nicht auszuwaschen.

Die direkte Methode der Immunperoxidasefärbung

Diese Methode fand nur zu Kontrollzwecken der Kollagen-II-Darstellung Anwendung. Im Wesentlichen gleicht die Technik der eben beschriebenen mit der Ausnahme, dass kein Sekundärantikörper benötigt wird, da die Meerrettichperoxidase, oder in unserem Falle das Biotin bereits an den Primärantikörper gekoppelt ist. Ist der Antikörper lediglich

biotinyliert, muss verständlicherweise, wie oben aufgeführt, eine Inkubation mit avidingebundener Peroxidase erfolgen (LSAB-Technik).

2.4.2 Der Andau als zentrales Problem der Immunhistochemie an Paraffinschnitten

Die Fixation des Gewebes mit Formalin verursacht Aldehydvernetzungen der Proteine, welche die zu detektierenden Antigene maskieren können. Insbesondere für die Darstellung der einzelnen Kollagene ist daher ein genau ausgearbeiteter Vorverdau unerlässlich, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Sollen nun aber speziell auch Kollagene im hyalinen Knorpel gefärbt werden, müssen zusätzlich maskierende Proteoglykane aus den Proben herausgelöst werden. Problematisch hierbei gestaltet sich der Umstand, dass die Behandlung der Proben mit proteolytischen Enzymen eine nicht zu unterschätzende Aggressivität besitzt. Dies kann zum Verlust des Gewebeschnitts vom Objektträger führen, oder eine in sich, das Gewebe schädigende Wirkung aufweisen. Das erste Problem kann mit Hilfe der Verwendung stark adhäsiv wirkender silanisierter Objektträger relativ gut beherrscht werden. Einer Schädigung des Gewebes und damit auch der vorhandenen Antigene ist durch den Grundsatz „soviel wie nötig, so wenig wie möglich“ beizukommen. Gemeint ist hierbei sowohl die Enzymkonzentration wie auch die Inkubationszeit.

Als „Standardenzyme“ der Immunhistochemie an Knorpel-Knochen-Präparaten haben sich in der Literatur der letzten Zeit Hyaluronidase und Pronase herauskristallisiert [2, 41, 54, 57, 87]. Da diese Methodik jedoch nicht in allen Fällen optimale Ergebnisse hervorbrachte, kam außerdem Pepsin und insbesondere das aus der Molekularbiologie bekannte Enzym Proteinase K zum Einsatz.

2.4.3 Protokolle der immunhistochemischen Färbungen

Die Ausführung dieses Punktes erfolgt der Übersichtlichkeit wegen in Stichpunkten.

Kollagen Typ I

- 1) Erwärmen der Präparate im Brutschrank, 55° C 15 min
- 2) Bad in Xylol 2x10 min
- 3) Alkoholreihe absteigender Konzentrationen
(Isopropanol 100 %, 100 %, 96 %, 96 %, 75 %, 50 %) je 5 min
- 4) 2-malige Spülung in Aqua demin.
- 5) TBS, pH 7,2; 37° C 5 min
- 6) Andau durch Überschichten der Proben mit Pronase
(5 mg/ml in TBS, pH 7,2) bei 37° C 60 min
- 7) Spülung in TBS, pH 7,2; RT
- 8) Spülung in Aqua demin.
- 9) Bad in H₂O₂ 3 %
(aus H₂O₂ 30 %, 1:10 verdünnt mit Aqua demin.) 10 min
- 10) Spülung in Aqua demin.
- 11) 3-malige Spülung in PBS, pH 7,4 mit anschließendem Bad in
PBS-Puffer, pH 7,4, in den pro Küvette ein Tropfen
geschmolzenes Brij 35 als Detergens zur Herabsetzung der
Oberflächenspannung zugesetzt wurde 5 min
- 12) Blockierung unspezifischer Hintergrundfärbung mit
Kaninchenserum (1:10 verdünnt mit PBS, pH 7,4) 30 min
- 13) Abgießen der Objektträger und Abziehen des Serums mit Zellstoff,
um eine Verdünnung des folgenden Antikörpers so gering wie
möglich zu halten
- 14) Aufbringen des Anti-Kollagen-I-Antikörpers (1:30 verdünnt mit
Boratbuffer, pH 8,2), 4° C 16 h
- 15) 3-malige Spülung in PBS, pH 7,4 mit anschließendem Bad in
PBS mit zugesetztem Brij 35 10 min
- 16) Aufbringen des biotinylierten Brückenantikörpers
(anti Ziege, 1:500 verdünnt mit PBS, pH 7,4) 30 min
- 17) 3-malige Spülung in PBS, pH 7,4 mit anschließendem Bad in
PBS mit zugesetztem Brij 35 10 min

- | | |
|--|--------|
| 18) Überschichtung der Proben mit peroxidasekonjugiertem Streptavidin | 30 min |
| 19) 3-malige Spülung in PBS, pH 7,4 mit anschließendem Bad in
PBS mit zugesetztem Brij 35 | 10 min |
| 20) Aufbringen des Chromogens aus AEC und H ₂ O ₂ 0,3 % | 30 min |
| 21) 2-malige Spülung in Aqua demin. | |
| 22) Gegenfärbung mit filtriertem Hämalaun nach Mayer
(Herstellung: siehe Kap. 2.3, Hämatoxylin-Eosin Färbung) | 10 min |
| 23) Spülung in Aqua demin. | |
| 24) Bad in Leitungswasser zum Bläuen | 10 min |
| 25) Spülung in Aqua demin. | |
| 26) Eindecken mit Kaisers Glyceringelatine | |

Kollagen Typ II

Das Protokoll zur Darstellung von Kollagen Typ II ist im Wesentlichen dasselbe wie für Kollagen Typ I. Lediglich die im Folgenden aufgezeigten Schritte sind im oben genannten Schema zu ersetzen. Hierbei handelt es sich zum einen um den Austausch der Andaumethode, zum anderen um den Einsatz des Anti-Kollagen-II-Antikörpers.

- | | |
|--|--------|
| 5) Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 5,0; 37° C | 5 min |
| 6) Der Andau erfolgt in diesem Falle mit Hyaluronidase,
gefolgt von Proteinase K. | |
| - Andau durch Überschichten der Proben mit Hyaluronidase
(2 mg/ml in Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 5,0) bei 37° C | 30 min |
| - Spülung in Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 5,0, RT | |
| - Spülung in Aqua demin. | |
| - Tris-Puffer, pH 7,5; RT | 5 min |
| - Andau mit Proteinase K
(0,5 mg/ml in Tris-Puffer, pH 7,5) bei RT | 30 min |
| 7) Spülung in Tris-Puffer, pH 7,5 | |
| 14) Aufbringen des Anti-Kollagen-II-Antikörpers
(1:20 verdünnt mit Boratpuffer, pH 8,2), 4° C | 16h |

Kollagen Typ X

Da der Anti-Kollagen-X-Antikörper von der Maus stammt, muss das Protokoll angepasst werden. Der besseren Übersichtlichkeit wegen werden noch einmal alle Schritte der Färbemethodik aufgeführt.

- 1) Erwärmen der Präparate im Brutschrank, 55° C 15 min
- 2) Bad in Xylol 2x10 min
- 3) Alkoholreihe absteigender Konzentrationen
(Isopropanol 100 %, 100 %, 96 %, 96 %, 75 %, 50 %) je 5 min
- 4) 2-malige Spülung in Aqua demin.
- 5) Tris-Puffer, pH 7,5; RT 5 min
- 6) Andau durch Überschichten der Proben mit Proteinase K
(0,5 mg/ml in Tris-Puffer, pH 7,5) bei RT 35 min
- 7) Spülung in Tris-Puffer, pH 7,5; RT
- 8) Spülung in Aqua demin.
- 9) Essigsäure 0,5 M; 37° C 5 min
- 10) Andau durch Einbringen der Proben in eine Küvette mit
Pepsin 0,1 % in Essigsäure 0,5 M (80 mg Pepsin kurz vorher
in 80 ml Essigsäure 0,5 M lösen) bei 37° C 60 min
- 11) Spülung in Essigsäure 0,5 M; RT
- 12) 2-malige Spülung in Aqua demin.
- 13) Bad in H₂O₂ 3 %
(aus H₂O₂ 30 %, 1:10 verdünnt mit Aqua demin.) 10 min
- 14) Spülung in Aqua demin.
- 15) 3-malige Spülung in PBS, pH 7,4 mit anschließendem Bad in
PBS-Puffer, pH 7,4, in den pro Küvette ein Tropfen
geschmolzenes Brij 35 als Detergens zur Herabsetzung der
Oberflächenspannung zugesetzt wurde 5 min
- 16) Blockierung unspezifischer Hintergrundfärbung mit
„Blocking-Reagent“ aus dem LSAB-Kit 30 min
- 17) Abgießen der Objektträger und Abziehen des „Blocking-Reagent“
mit Zellstoff, um eine Verdünnung des folgenden Antikörpers
so gering wie möglich zu halten
- 18) Aufbringen des Anti-Kollagen-X-Antikörpers (1:10 verdünnt mit

- | | |
|---|--------|
| Antibody Diluent, S3022, DAKO, Hamburg, Deutschland), 4° C | 16 h |
| 19) 3-malige Spülung in PBS, pH 7,4 mit anschließendem Bad in
PBS mit zugesetztem Brij 35 | 10 min |
| 20) Aufbringen des biotinylierten Brückenantikörpers aus dem LSAB-Kit | 30 min |
| 21) 3-malige Spülung in PBS, pH 7,4 mit anschließendem Bad in
PBS mit zugesetztem Brij 35 | 10 min |
| 22) Überschichten der Proben mit peroxidasekonjugiertem Streptavidin | 30 min |
| 23) 3-malige Spülung in PBS, pH 7,4 mit anschließendem Bad in
PBS mit zugesetztem Brij 35 | 10 min |
| 24) Aufbringen des Chromogens aus AEC und H ₂ O ₂ 0,3 % | 30 min |
| 25) 2-malige Spülung in Aqua demin. | |
| 26) Gegenfärbung mit filtriertem Hämalaun nach Mayer
(Herstellung: siehe 2.3, Hämatoxilin-Eosin Färbung) | 10 min |
| 27) Spülung in Aqua demin. | |
| 28) Bad in Leitungswasser zum Bläuen | 10 min |
| 29) Spülung in Aqua demin. | |
| 30) Eindecken mit Kaisers Glyceringelatine | |

Ki-67

Da der verwendete Anti-Ki-67-Antikörper von der Maus stammt, ist als zugrunde liegendes System, das der Kollagen-X-Färbung zu benutzen, jedoch müssen die Punkte 5) bis 11) und der Punkt 18) modifiziert werden.

Der enzymatische Andau wird durch einen Kochvorgang in Zitronensäure-Zitratpuffer ersetzt, wobei im Präparat durch Entfernung von Kalzium-Ionen bestehende Quervernetzungen aufgebrochen werden, um die Ursprungskonformation des betreffenden Epitops wiederherzustellen.

- | | |
|---|-------|
| 5) Zitronensäure-Zitratpuffer, pH 6,0; RT | 5 min |
| 6) Schonende Erwärmung der Objektträger über Wasserdampf
(Vorbeugung gegen Abschwimmen der Proben bei zu
schnellem Temperaturwechsel) | |
| 7) Einbringen der Objektträger in Küvetten mit gerade nicht
kochendem Zitronensäure-Zitratpuffer, pH 6,0 (Wasserbad auf | |

- 98° C); Küvetten geschlossen, um Molaritätsveränderungen zu verhindern; maximal 6 Objektträger pro Küvette 35 min
- 8) Vorsichtige Entnahme der Küvetten aus dem Wasserbad
- 9) Abkühlen lassen der Küvetten bei geschlossenem Deckel 30 min
- 10) Abkühlen lassen der Küvetten bei geöffnetem Deckel 10 min
- 11) 2-malige Spülung in PBS, pH 7,2
- 18) Aufbringen des Anti-Ki-67-Antikörpers (1:25 verdünnt mit Antibody Diluent, S3022, DAKO, Hamburg, Deutschland), 4° C 16h

2.5 Die Auswertung und Beurteilung der Proben

Nach biometrisch-statistischer Beratung in der Abteilung Biometrie und Medizinische Dokumentation der Universität Ulm schien es sinnvoll, angesichts der Art des Untersuchungsmaterials in Form histologischer Schnitte sowie der geringen Fallzahlen der einzelnen Gruppen, eine morphologisch-beschreibende Auswertung ohne Anwendung weiterer statistischer Methoden vorzunehmen.

Dementsprechend wurden für die konventionellen Färbungen und die immunhistochemischen Kollagendarstellungen morphologische Gemeinsamkeiten und Unterschiede sowohl innerhalb der einzelnen Gruppen als auch zwischen diesen dokumentiert und als charakterisierende Kriterien formuliert.

Für die Auswertung der Ki-67-Färbung wurde hingegen der prozentuale Anteil positiver Kerne an der Gesamtzahl der Kerne eines bestimmten Gewebes bzw. Gewebsabschnitts ermittelt. Der erhaltene Wert wird entsprechend der üblichen Vorgehensweise für diesen Marker als Wachstumsfraktion bezeichnet und stellt ein semiquantitatives Maß für die Proliferationsrate dieses Gewebes bzw. eines definierten Gewebsabschnitts dar. Dieses Vorgehen ermöglicht einen vergleichenden Bezug zu Angaben vorliegender Ergebnisse aus der Literatur herzustellen.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der histologischen Untersuchung mittels HE- und Safranin-O-Färbung an Knorpel-Knochen-Schnitten

Die konventionelle Färbung der Schnitte mit HE und Safranin-O diente zur Unterstützung der morphologischen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen. Insbesondere Knorpel, Knochen und das fibröse Bindegewebe des Periosts und des Perichondriums konnten dadurch gut gegeneinander abgegrenzt werden.

Bei der Untersuchung der *fetalen Kniegelenke* war die Morphologie der Präparate der 19. bis 23. SSW sehr einheitlich (Pr27-32). Es waren jeweils Femur, Patella und Tibia dargestellt, wobei zwischen den artikulierenden Flächen der Gelenkspalt deutlich abzugrenzen war. Femur und Tibia wiesen eine gut abzugrenzende Wachstumsfuge auf. Knorpelreste in den neu gebildeten Spongiosatrabekeln reichten bis weit in die Diaphyse hinein und waren stets bis zum Rand eines jeden Präparats erkennbar, was auf ein rapides Wachstum hinweist. Das Präparat des weiblichen Feten der 16. SSW (Pr26) wich dagegen von der Morphologie der übrigen Kniegelenke ab. Nicht nur, dass der Durchmesser der Epiphysen augenscheinlich geringer war, sondern auch die Zelldichte des Epiphysenknorpels war wesentlich höher. Es waren zwar die Strukturen des Säulen- und Blasenknorpels im Ansatz nachzuweisen, doch die Wachstumsfuge konnte noch nicht scharf abgegrenzt werden. Die Safranin-O-Färbung brachte die Proteoglykane des Epiphysenknorpels und der Knorpelinseln in den Spongiosatrabekeln zu tief roter Darstellung. Auffallend war aber, dass die artikulierenden Flächen von Femur, Patella und Tibia über eine Schichtdicke von etwa 5 bis 10 Zelllagen weniger stark Proteoglykane zu enthalten schienen. Hier war die Intensität der Rotfärbung schwächer ausgeprägt und erhielt sogar stellenweise eine grünliche Tingierung.

Auch bei den *Polydaktylien* war in allen Fällen der Epiphysenknorpel mittels Safranin-O stark rot anzufärben. Die intensivste Farbgebung erhielt dabei jeweils der tiefste, am nächsten zur Wachstumsfuge gelegene Bereich. Oberflächliche Areale exprimierten schwächer Proteoglykane. Im Falle der Resektate etwas älterer Patienten (Pr18: 6 Monate, m; Pr19-21: je 10 Monate, w) waren die obersten Zelllagen des hyalinen Knorpels nur sehr schwach rot angefärbt bzw. kamen grün zur Darstellung. Eine Wachstumsfuge war - wenn auch in unterschiedlicher Stärke - in allen Präparaten ausgebildet. Dabei waren bei dem Präparat des zweiten 10 Monate alten Mädchens (Pr20) sogar zwei artikulierende Epiphysen und folglich 2 Wachstumsfugen vorhanden. Genau in demselben Präparat

konnte in der HE-Färbung in einer der beiden Epiphysen bereits eine deutliche Tidemark erkannt werden. Die Epiphysenfuge war hier sehr schmal. An der Grenze der Epiphyse zur Metaphyse war schon eine nahezu durchgängige Knochenlamelle zu sehen und dementsprechend nur noch sehr vereinzelt knorpeliges Restgewebe in den Spongiosabälkchen. Weiter war die Umgebung einiger subperiostär gelegener Zellen am distalen Ende zweier Endphalangen auffällig, die positiv für Proteoglykane anfärbte, obwohl dort morphologisch kein Knorpelgewebe abzugrenzen war, ebenso befand sich genau dort keine abzugrenzende Epiphysenfuge. Es handelte sich dabei um die Proben des 5 Monate alten Mädchens (Pr17) und des 6 Monate alten Jungen (Pr18). Bemerkenswert war auch, dass Spongiosabälkchen, die direkt an dieses Areal angrenzten, schlierenartig inhomogen wirkende Knorpelinseln enthielten, die ebenfalls schwach rötlich mit Safranin-O gefärbt waren. Im Gegensatz dazu waren Knorpelreste in Knochentrabekeln, hervorgegangen aus einer Wachstumsfuge, stets homogen und spiegelten das Bild des hyalinen Knorpels wider, aus dem sie hervorgegangen waren. Eine gegenüberstellende Darstellung zu diesen Befunden zeigt Tabelle 4 in Kapitel 3.2.4.

Von den Schnitten der *Femurköpfe*, die uns von Herrn Prof. Dr. A. G. Nerlich überlassen worden waren, stand nur eine begrenzte Anzahl zur Verfügung (Pr22-24). Daher wurden diese Präparate ausschließlich der immunhistochemischen Untersuchung zugeführt. Hingegen wurde das Resektat des Kniegelenks des 9 Jahre alten Jungen (Pr25) sowohl mit HE als auch mit Safranin-O gefärbt. Letztere hinterließ eine homogene rote Färbung im Knorpel, die im Bereich der Wachstumsfuge am kräftigsten ausfiel und sich zur Knorpeloberfläche hin diskret aufhellte.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Knorpel-Knochenpräparaten boten die untersuchten *Exostosen* einen wesentlich uneinheitlicheren Aspekt. Die präadoleszent gewonnenen Präparate multipler Osteochondrome wiesen stets in der Tiefe des Knorpels in der Safranin-O-Darstellung eine starke rote Farbgebung auf, die sich zur Oberfläche hin abschwächte. Bedeutend hierbei ist aber, dass die Färbung des gesamten Knorpels keineswegs als homogen zu bezeichnen war. Vielmehr durchzogen vom Perichondrium ausgehende und sich in die Tiefe erstreckende Septen den Knorpel in allen vier Fällen. Diese imponierten in der Safranin-O-Färbung als deutliche Aufhellungen im sonst tiefroten Knorpelgewebe. Die beiden postpubertären Resektate multipler Exostosen hingegen ließen dieses Merkmal vermissen. Die Exostose der 28-jährigen Patientin (Pr5) besaß nur ein sehr kleines Knorpelareal, das selbst sehr wenig Proteoglykane beinhaltete. Auch im Präparat des 42 Jahre alten Mannes (Pr6) herrschte in der Safranin-O-Darstellung die grüne

Farbgebung vor. Es waren also nur noch wenig Proteoglykane in der Knorpelkappe verblieben. Letztere war in der HE-Färbung deutlich basophil und besaß zusätzlich eine unscharf abgegrenzte aber prominente Tidemark, was auf eine starke Verkalkung hinweist. Ähnliches konnte an den solitären Exostosen verzeichnet werden. Alle sieben Präparate präadoleszenter Patienten ließen eine deutliche, oben beschriebene Septierung im Knorpel erkennen. Weniger ausgeprägt, aber dennoch vorhanden war sie bei den Schnitten des 23 Jahre alten Mannes (Pr13) und der 26-jährigen Frau (Pr15), bei denen ein solitäres Osteochondrom entfernt worden war. Die Besonderheit bei der zuletzt genannten war, dass die Septen an der Oberfläche des Knorpels fehlten, einige wenige dagegen in der Tiefe vorzufinden waren. Diese Verhältnisse sind im Vergleich zu den Ergebnissen der Kollagen I- und II-Färbung in Tabelle 3 in Kapitel 3.2.3 wiedergegeben.

Eine Tidemark war unter den Patienten mit multiplen cartilaginären Exostosen nachzuweisen bei beiden postpubertär gewonnenen Präparaten (Pr5, 6) sowie in Teilbereichen bei dem 13-jährigen Mädchen (Pr4). Unter den solitären Osteochondromen fand sich eine ausgeprägte Tidemark bei dem 15 Jahre alten Mädchen (Pr13) und in Teilbereichen bei den beiden postpubertären Resektaten (Pr14, 15). Die Ausbildung einer Tidemark bzw. eine höhergradige Verkalkung der Knorpelkappe schien somit ein Kennzeichen fortgeschritteneren Lebensalters zu sein.

3.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung mittels Antikörpern gegen die Kollagen-Typen I, II und X und gegen das proliferationsassoziierte Kernprotein Ki-67

Kapitel 3.2.1 behandelt die technischen Aspekte der Immunhistochemie, die Kapitel 3.2.2 bis 3.2.5 befassen sich mit den Ergebnissen der einzelnen Färbungen.

3.2.1 Ergebnisse der enzymatischen Vorbehandlung und der Etablierung einer reproduzierbaren Methodik

Zunächst galt es zur Darstellung der gewünschten Antigene eine möglichst sensitive wie auch spezifische Färbemethode zu entwickeln. Zentrales Augenmerk galt dabei insbesondere der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Kritische Punkte stellten einerseits die Wahl der Antikörperkonzentrationen und andererseits die Etablierung einer validen Andamethodik dar.

Als Präparat zur Entwicklung der Methodik diente jeweils das Resektat der Polydaktylie eines 8 Tage alten männlichen Säuglings (Pr16). Zusätzlich kam das Kniegelenk eines männlichen Feten der 19. SSW zu Kontrollzwecken zum Einsatz (Pr27).

3.2.1.1 Ergebnisse der Etablierung der Methodik zur Darstellung von Kollagen Typ I

Kollagen Typ I, als ubiquitär vorhandenes Bindegewebsprotein, sollte an Knorpel-Knochenschnitten im Perichondrium wie im Knochen zu finden sein. Hyaliner Gelenkknorpel dagegen durfte keine Färbung aufweisen.

Die Verwendung von Pronase zur Andauung stellte die Methode der Wahl dar, besonders auch um maskierende Proteoglykane im hyalinen Knorpel zu entfernen, was mit der Safranin-O-Färbung zur Kontrolle bereits früher in unserem Labor gezeigt wurde. Hyaluronidase besaß diesbezüglich einen schwächeren Effekt. Interessant erscheint, dass Pronase nicht in reinem Tris-Puffer zubereitet werden durfte, da eine einstündige Behandlung der Proben – vermutlich durch osmotische Effekte – Verquellungen der Kollagenfasern und eine erhebliche Zerstörung der Morphologie der Zellkerne zur Folge hatte. Wurde Tris-Puffer jedoch in physiologischer Kochsalzlösung anstatt in reinem demineralisiertem Wasser angesetzt, um so einen TBS-Puffer zu erhalten, war der zerstörerische Effekt des enzymatischen Andaus nicht mehr nachweisbar. Die Konzentration von 5 mg/ml Pronase in TBS, pH 7,2 erbrachte die gewünschten Ergebnisse. Die optimale Verdünnung des Primärantikörpers lag zwischen 1:20 und 1:40. Folglich wurde der Verdünnungsfaktor 1:30 gewählt.

3.2.1.2 Ergebnisse der Etablierung der Methodik zur Darstellung von Kollagen Typ II

Im Gegensatz zu Kollagen Typ I sollte Kollagen Typ II nicht im fibrösen Bindegewebe gefunden werden. Für das charakteristische Protein hyalinen Knorpels war insbesondere in Gelenkknorpelpräparaten eine homogene Anfärbung zu erwarten.

Die optimale Primärantikörperkonzentration wurde bei einer Verdünnung von 1:20 gefunden. Für die Darstellung von Kollagen Typ II wurde zunächst ebenfalls mit Pronase gearbeitet. In einigen Präparaten zeigte sich jedoch eine deutliche intrazytoplasmatische Färbung der Chondrozyten. Da für dieses Phänomen in der Literatur keine Erklärung zu finden war, bestand das Bedürfnis, diese Eigenart reproduzierbar zu machen. Mit Pronase gelang dies nicht optimal, da abhängig von unspezifischen Faktoren bei

Versuchswiederholungen unterschiedlich viele Zellen intrazytoplasmatisch gefärbt waren. Abhilfe verschaffte Proteinase K, welche zunächst in einer Konzentration von 0,25 mg/ml Tris-Puffer eingesetzt wurde. Da sich die nun reproduzierbare Zellfärbung jedoch später als Chargenartefakt des Primärantikörpers herausstellte, was durch freundlicherweise von der Fa. Biozol zur Verfügung gestellte Chargenproben verifiziert werden konnte (s. Abb. 4), war es unmöglich, eine weiterreichende Auswertung dieses Ergebnisses vorzunehmen.

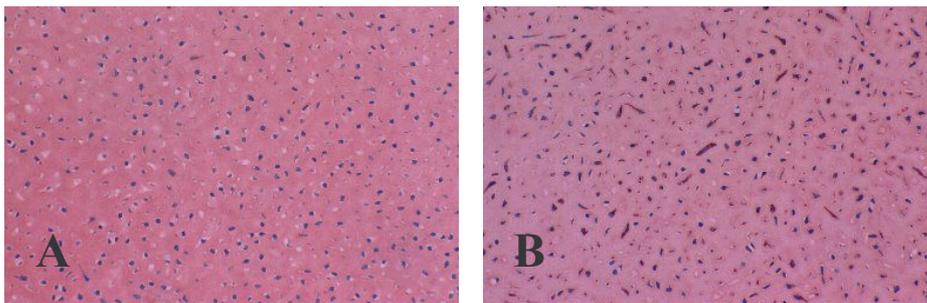


Abb. 4: **A:** Kollagen-II-Färbung, hyaliner Knorpel; Charge A des Primärantikörpers zeigt keine intrazytoplasmatische Färbung.

B: Kollagen-II-Färbung, hyaliner Knorpel; Charge B des Primärantikörpers zeigt deutliche intrazytoplasmatische Färbung.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen ergab sich die Frage, ob die an Exostosen gefundene, inhomogene Knorpelfärbung bezüglich Kollagen II ein Problem des Andaus sei oder ob tatsächlich Areale im Knorpel diesbezüglich negativ sind. Durch einen Vorverdau mit Hyaluronidase (2 mg/ml in Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 5,0 bei 37° C für 30 min) und Erhöhung der Enzymkonzentration von Proteinase K (0,5 mg/ml in Tris-Puffer, pH 7,5 bei RT) sowie der Verlängerung ihrer Einwirkzeit von 15 auf 30 Minuten konnte eine optimale Darstellung erzielt werden, die in allen Knorpelarealen ein regelmäßiges Vorkommen von Kollagen Typ II zeigte. Dies gilt auch für die Osteochondrome (Abb. 5). Das zuletzt genannte, intensivierte Vorgehen stellte zur Behandlung der Proben folglich die Methode der Wahl dar.

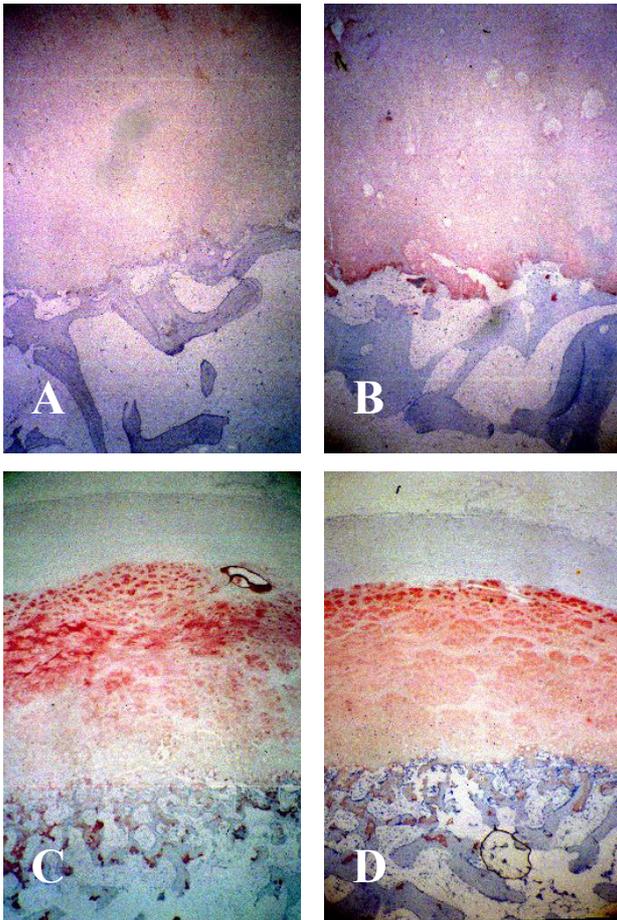


Abb. 5:

Kollagen-II-Färbung von Osteochondromen (**A, B**: Pr15, SCE, 26 Jahre, w; **C, D**: Pr10, SCE 12 Jahre, w) nach unterschiedlichen Andauverfahren

A, C: *Proteinase K* (0,25 mg/ml Tris-Puffer; pH 7,5; Raumtemperatur; 15 min) → Der tiefe Knorpelbereich bleibt ungefärbt.

B, D: *Hyaluronidase* (2 mg/ml Zitronensäure-Phosphat-Puffer; pH 5,0; 37°C; 30 min) und *Proteinase K* (0,5 mg/ml Tris-Puffer; pH 7,5; Raumtemperatur; 30 min) → Der tiefe Knorpelbereich zeigt sich deutlich positiv gefärbt.

3.2.1.3 Ergebnisse der Etablierung der Methodik zur Darstellung von Kollagen Typ X

Kollagen X tritt relativ spezifisch in der Matrix um hypertrophe Chondrozyten auf und sollte daher im Bereich des Blasenknorpels an Wachstumsfugen darstellbar sein.

Der verwendete monoklonale Antikörper entspricht dem gut charakterisierten Klon X53, welcher nach Girkontaite (1996) [34] mit nativem wie mit pepsinverdaulichem Kollagen X reagieren soll. Andauversuche mit Hyaluronidase und Pronase, jeweils allein, wie auch in Kombination, brachten ausschließlich negative Ergebnisse hervor. Erweiterte man jedoch die Hyaluronidaseanwendung (2 mg/ml in Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 5,0 bei 37°C für 30 min) um eine zusätzliche Behandlung mit Pepsin (0,1 % in Essigsäure 0,5 M bei

37° C für 60 min), so erhielt man insbesondere im Präparat der Polydaktylie (Pr16) das erwartete Färbemuster, wohingegen am Präparat des fetalen Kniegelenks (Pr27) nur eine sehr dezente Anfärbung zu erkennen war. Auch Versuche mit Exostosen erbrachten teilweise nur schwache Darstellungen. Modifikationen am Pepsinverdau konnten die Ergebnisse nicht wesentlich verstärken. Ebenso blieb der Einsatz von Trypsin erfolglos. Unter Verwendung von Proteinase K (0,5 mg/ml in Tris-Puffer, pH 7,5 bei RT für 35 min) hingegen zeigte sich schon bei alleiniger Anwendung ein leicht positives Bild. Die Kombination von Proteinase K (0,5 mg/ml in Tris-Puffer, pH 7,5 bei RT für 35 min) und Pepsin (0,1 % in Essigsäure 0,5 M bei 37° C für 60 min) zeichnete sich als die zuverlässigste Darstellungsmethode aus, welche die intensivste Farbgebung erbrachte (s. Abb. 6).

Die Antikörperverdünnung wurde mit dem Faktor 1:10 sehr gering gehalten zur Erzielung einer hohen Sensitivität, wobei bei hochspezifischer Bindung des vorliegenden Antikörperklons X53 keinerlei unerwünschte Hintergrundfärbung auftrat.

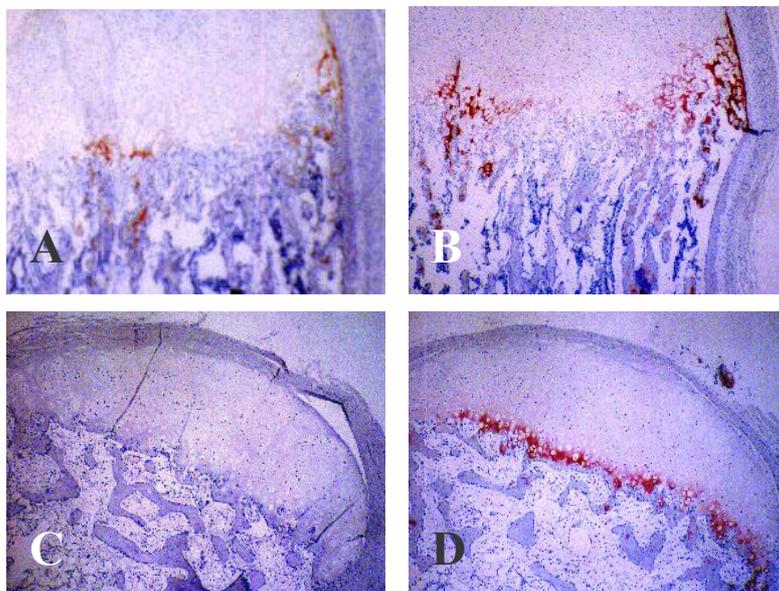


Abb. 6:

Kollagen-X-Färbung eines fetalen Kniegelenks (**A, B**: Pr32, 23. SSW, w) und eines Osteochondroms (**C, D**: Pr11, SCE, 12 Jahre, m) nach unterschiedlichen Andauverfahren

A, C: Hyaluronidase (2 mg/ml Zitronensäure-Phosphat-Puffer; pH 5,0; 37° C; 30 min) und Pepsin (0,1 % in Essigsäure 0,5 M; 37° C; 60 min)

B, D: Proteinase K (0,5 mg/ml Tris-Puffer; pH 7,5; Raumtemperatur; 35 min) und Pepsin (0,1 % in Essigsäure 0,5 M; 37° C; 60 min)

3.2.1.4 Ergebnisse der Etablierung der Methodik zur Darstellung des proliferationsassoziierten Kernproteins Ki-67

Ki-67 ist in den Kernen proliferierender Zellen nachweisbar. Somit sollten speziell in den zur Verfügung stehenden fetalen Kniegelenksschnitten in praktisch allen Geweben positiv gefärbte Kerne nachweisbar sein, insbesondere aber in der Proliferationszone fetaler wie postnataler Wachstumsfugen.

Die zur Kollagendarstellung üblichen Enzyme Hyaluronidase und Pronase erbrachten an allen Proben kein positives Ergebnis. Die Methode der Wahl stellte dagegen die Wärmebehandlung dar. Diese war zum einen mittels eines Mikrowellengerätes durchführbar, zum anderen auch in einem Wasserbad mit konstanter Temperatur. Beide Methoden lieferten vergleichbare Ergebnisse, wobei besonderes Augenmerk auf die Behandlungszeit zu richten war. Eine 20-minütige Erhitzung lieferte nur wenige positive Zellkerne, eine 50-minütige hingegen erbrachte eine stark positive Färbung mehrerer Zellen, wobei praktisch alle Kerne eine leichte unspezifische Tönung erhielten. Wurden aber nur die stark positiven Zellen gezählt, näherte man sich stets einem für ein Gewebe spezifischen Wert, der ab einer Behandlungszeit von 35 min für Knorpelgewebe weitgehend konstant blieb. Bei einer Antikörperverdünnung im Verhältnis 1:25 wurden maximal 6 Präparate in einer geschlossenen Küvette mit Zitronensäure-Zitratpuffer (0,01 M, pH 6,0) mittels Wasserbad bei gerade nicht kochendem Wasser (98° C) für 35 Minuten erhitzt, um dann langsam über insgesamt 40 Minuten wieder zu erkalten.

3.2.2 Ergebnisse der Kollagen-I-Färbung

In sämtlichen untersuchten Präparaten *fetaler Kniegelenke* zeigte sich eine deutliche und starke Färbung des Knochens, des Periosts und des Perichondriums. Auch die Synovialmembran enthielt reichlich Kollagen I. Der hyaline Knorpel selbst war diesbezüglich negativ mit Ausnahme der Blutgefäße, welche in die Epiphyse hineinziehen, um den Knorpel zu versorgen und um später den sekundären Knochenkern auszubilden. Außerdem fand sich bemerkenswerter Weise auch auf der teils freien Artikulationsfläche eine dünne Schicht positiver Färbung. Diese umfasste im Falle des weiblichen Feten der 16. SSW (Pr26) etwa 4 bis 5 Zelllagen, bei den übrigen 6 Objekten (Pr27-32) erreichte sie eine Dicke von 8 bis 10 Zelllagen (s. Abb. 7 A).

Ein ähnlicher Befund war bei den untersuchten *Polydaktylien* zu erheben. Knochen, Periost und Perichondrium zeigten starke Positivität (s. Abb. 7 B). Der hyaline Knorpel war negativ. Es fanden sich darin jedoch sehr viel weniger Blutgefäße als in den Epiphysen fetaler Kniegelenke. Deutlich konnte wiederum in vier (Pr16: 8 Tage, m; Pr19-21: je 10 Monate, w) der sechs Polydaktylien Kollagen I als dünne Schicht, ausgehend von der Synovialis-Knorpel-Übergangszone, auf der artikulären Knorpeloberfläche erkannt werden. Die übrigen 2 Präparate (Pr17: 5 Monate, w; Pr18: 6 Monate, m) waren in eben dieser Zone nur äußerst schwach gefärbt, so dass kein eindeutig positives Ergebnis testiert werden konnte.

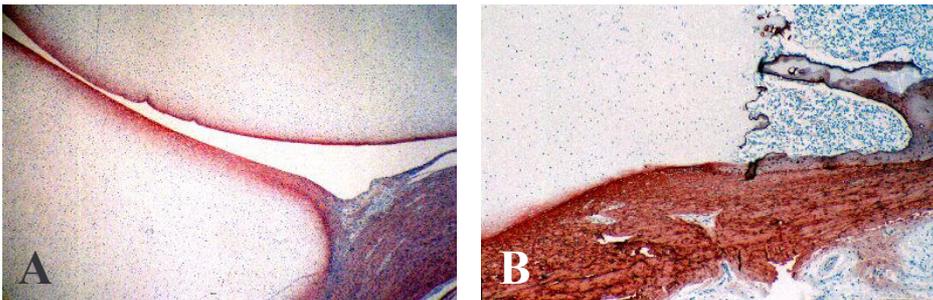


Abb. 7:

A: Fetales Kniegelenk (Pr32, 23. SSW, w): Die Artikulationsflächen von Femur und Patella sind für Kollagen I positiv gefärbt, ebenso das Perichondrium (rechte untere Ecke); der Knorpel ist negativ.

B: Polydaktylie (Pr16, 8 Tage, m): Positiv für Kollagen I sind Knochen, Periost und Perichondrium gefärbt; der Knorpel bleibt bis auf eine dünne oberflächliche Schicht negativ.

Auch die beiden *Femurköpfe*, die im Alter von 2 ½ und 8 Jahren reseziert wurden (Pr23, 24), zeigten auf ihrer Gelenkfläche einen dünnen Kollagen-I-Überzug (s. Abb. 8). Das Resektat des Femurkopfes des 1 ½ Jahre alten Kleinkindes (Pr22) hingegen war negativ. Das akquirierte Stück Kniegelenkknorpel des 9-jährigen Jungen (Pr25) wies leider keine freie Gelenkfläche auf und war dementsprechend diesbezüglich nicht beurteilbar. Im Übrigen war der hyaline Knorpel jeder bislang genannten Entität negativ. Blutgefäße und deren bindegewebige Einscheidung bildeten auch hier die Ausnahme. Knochen, Periost und Perichondrium kamen freilich wiederum deutlich positiv zur Darstellung.

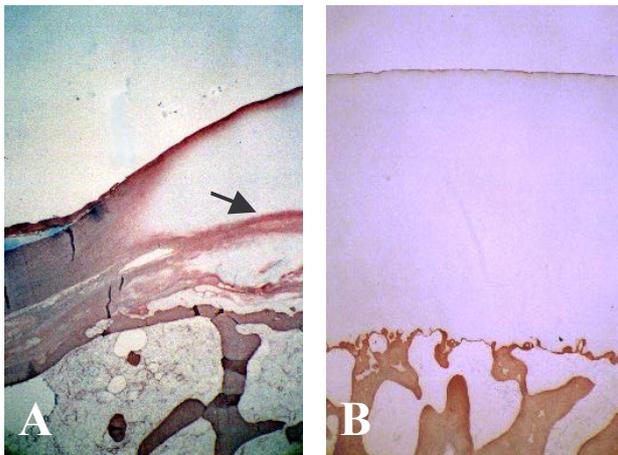


Abb. 8:

A: Femurkopf (Pr24, 8 Jahre): Kollagen I deutlich in oberflächlichen Knorpelzonen; Pfeil: Im Bereich des Blutgefäßes im Knorpel Positivität für Kollagen I.

B: Femurkopf (Pr23, 2 ½ Jahre): Kollagen I als dünne Schicht in der Knorpeloberfläche; Der Knochen ist positiv für Kollagen I.

Diese Einförmigkeit unter den bislang besprochenen Gewebeproben wurde im Falle der *Exostosen* von einem mehr oder weniger bunten Bild abgelöst. Zwar waren Knochen, Periost und Perichondrium ebenso regelmäßig positiv für Kollagen I, doch überraschenderweise zeigten sich auch im Knorpel größere Areale, welche fibrös durchbaut waren.

In 13 Präparaten der insgesamt 15 vorliegenden Exostosen (14 Patienten, eine Patientin zweimal operiert) fand sich deutlich angefärbtes Kollagen vom Typ I in der Knorpelkappe. Im Falle der solitären Exostose des 15-jährigen Mädchens (Pr13) war nur eine schwache, diffuse Tingierung des Knorpels nachzuweisen. Allein das Präparat der 28-jährigen Patientin mit multiplen Exostosen (Pr5) enthielt keinen Knorpel.

- Von den 14 knorpeltragenden Exostosen exprimierten 13 Kollagen Typ I in oberflächlichen Bezirken ihrer Knorpelkappe (s. Abb. 9 A).
- In 12 von 13 Präparaten zogen Kollagen-I-positive Septen von der Oberfläche in die Tiefe, wobei dieses Phänomen in 7 der 12 Fälle stark ausgeprägt war, in 5 Fällen angedeutet. Altersbezogen bedeutet dies, dass sich in 10 (7 davon ausgeprägt, 3 andeutungsweise) von 11 präadoleszenten und in zwei der drei postpubertären, insgesamt 14 Knorpel enthaltenden Exostosen, fibröse Septen fanden (s. Abb. 9 B, C und Tab. 3 in Kap. 3.2.3).
- In 3 Präparaten fanden sich begrenzte Knorpelareale oder Knorpelinseln, welche sehr stark bis vollständig mit Kollagen I durchbaut waren. Hierbei handelte es sich um die Resektate des 13-jährigen Mädchens und des 42-jährigen Mannes mit multiplen cartilaginären Exostosen (Pr4, 6) und das eines 10-jährigen Mädchens, welches ein solitäres Osteochondrom zur Ausbildung brachte (Pr9).

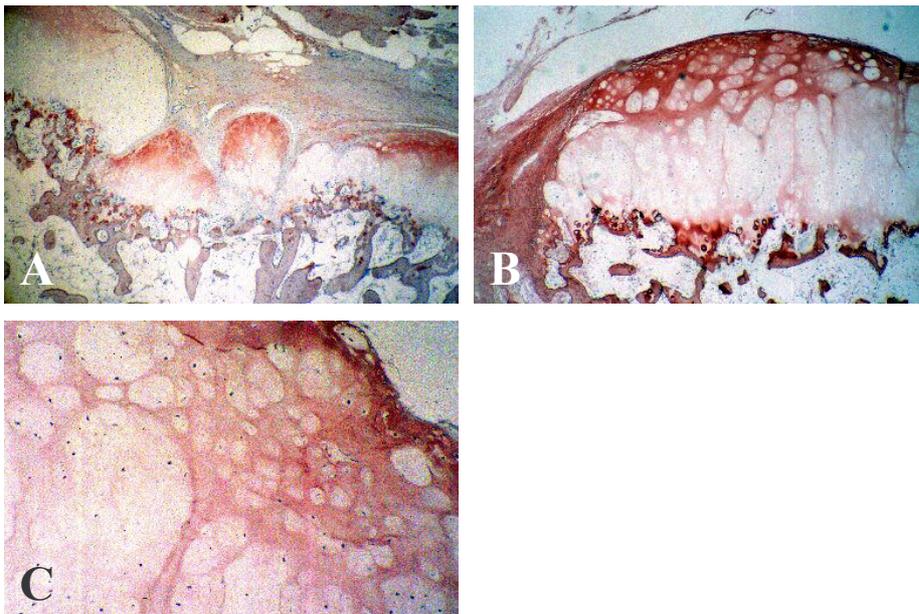


Abb. 9:

- A:** MCE (Pr2, 12 Jahre, w): Kollagen Typ I befindet sich vornehmlich in oberflächlichen Knorpelarealen, außerdem im darüber liegenden Bindegewebe und im Knochen.
- B:** SCE (Pr11, 12 Jahre, m): Deutliche fibröse, Kollagen I enthaltende Septen, ausgehend von einer oberflächlich gelegenen positiven Schicht in die Tiefe des Knorpels ziehend. Darunter: Positiv für Kollagen I gefärbter, spongioser Knochen. Links: Positiv für Kollagen Typ I gefärbtes Perichondrium.
- C:** MCE (Pr3, 13 Jahre, m): Kollagen I enthaltende Septen begrenzen oberflächlich einzelne Chondrone und in tieferen Schichten größere Knorpellobuli.

Kollagen Typ I fand sich also regelmäßig in kompaktem wie auch in spongiösem Knochen, ebenso im Periost und im Perichondrium aller untersuchten Entitäten. Desweiteren kam Kollagen I regelmäßig im Knorpel multipler wie auch solitärer Osteochondrome zur Darstellung und bildete somit ein Unterscheidungsmerkmal zu den untersuchten Gelenkknorpelarten, die für Kollagen I allenfalls in einer dünnen oberflächlichen Schicht positiv waren.

3.2.3 Ergebnisse der Kollagen-II-Färbung

Als Merkmal hyalinen Knorpels war Kollagen Typ II in allen untersuchten Entitäten als mehr oder weniger homogene Färbung zu finden.

An den Präparaten *fetaler Kniegelenke* demonstrierte sich durchweg eine homogene positive Anfärbung des epiphysären Knorpels. Weiter war Kollagen II in den Knorpelinseln des durch enchondrale Ossifikation neu gebildeten Knochens als Ausdruck aktiven Wachstums zu finden. Alle übrigen Gewebe wiesen keine Färbung diesbezüglich auf. Bemerkenswert ist, dass Kollagen Typ II genau dort, wo Kollagen I in starker Färbung auftrat, gewissermaßen spiegelbildlich entweder nur schwach zur Darstellung kam oder gänzlich fehlte. Insbesondere auf der Artikulationsfläche von Femur, Tibia und Patella war dieser Befund von besonderer Bedeutung (s. Abb. 10). Die schwache bis fehlende Färbung in den oberflächlichsten Schichten bestärkt die Ergebnisse der Kollagen-I-Darstellung, die, wie bereits geschildert, ein dünnes Band positiver Farbgebung in selbem Bereich zeigte.

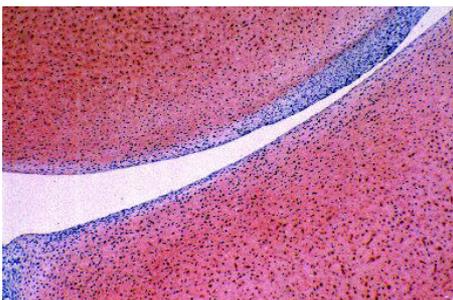


Abb. 10: Fetales Kniegelenk (Pr28, 20. SSW, m): Ungefärbte Artikulationsflächen von Femur und Patella in der Kollagen-II-Darstellung bei homogener roter Farbgebung des restlichen hyalinen Knorpels.

Bei Anwendung einer der vorliegenden Chargen des Anti-Kollagen-II-Antikörpers konnte eine deutliche intrazytoplasmatische, tiefrote Färbung von Chondrozyten reproduziert werden. Dieses Phänomen war dabei spezifisch für Knorpelzellen und beeinflusste die

üblichen Ergebnisse in keinsten Weise. Für die übrigen verwendeten Chargen konnte dieser Effekt jedoch nicht verzeichnet werden (s. Abb. 4, Kap. 3.2.1.2).

Ähnlich verhielten sich die Ergebnisse der Präparate der *Polydaktylien*. Bei diesen war wiederum der gesamte epiphysäre Knorpel homogen angefärbt (s. Abb. 11 A) bis auf den genannten oberflächlichsten Bereich, der vornehmlich von Kollagen Typ I eingenommen wurde. Ebenso kam Kollagen II in den noch nicht vollständig ossifizierten, neu gebildeten Spongiosabälkchen in inselförmigen Formationen vor. Diese Inseln waren jedoch unter den Polydaktylien in wesentlich geringerem Umfang ausgeprägt als bei den fetalen Proben, was in Einklang mit einer langsameren Wachstumsgeschwindigkeit der Polydaktylien zu bringen ist. Ein interessanter Punkt ist, dass in vier Präparaten der sechs untersuchten Polydaktylien ein relativ median gelegener Anschnitt der distalen Endphalanx vorzufinden war. In drei der Fälle fand sich am äußersten Knochenende sowohl in subperiostärer Lage, als auch in direkt angrenzenden Knorpelinseln deutlich zu erkennen Kollagen Typ II (Pr17, 18, 19, s. Abb. 11 C und Tab. 4, Kap. 3.2.4).

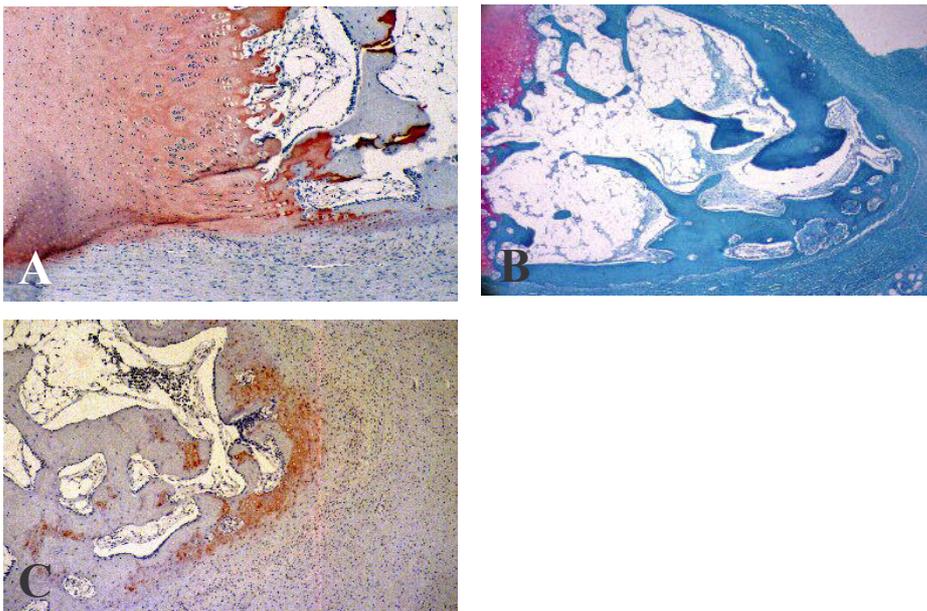


Abb. 11:

- A:** Polydaktylie (Pr21, 10 Monate, w): Homogene Kollagen-II-Färbung im Knorpel (links) und in den Knorpelresten neu formierter Spongiosaträbkel (rechts). Knochen, Periost und Perichondrium bleiben negativ bezüglich Kollagen Typ II.
- B:** Polydaktylie (Pr18, 6 Monate, m): Übersicht einer Endphalanx in Safranin-O-Darstellung. Links (proximal) schließt der hyaline Knorpel mit der Wachstumsfuge an den neu gebildeten Knochen an. Rechts befindet sich das knöcherne Ende der distalen Endphalanx. Dieses ist in Abbildung C in der Kollagen-II-Färbung vergrößert herausgegriffen.
- C:** Polydaktylie (Pr18, 6 Monate, m): Kollagen Typ II in subperiostärer Lage am distalen Abschluss der Endphalanx. Zusätzlich finden sich weiter proximal (links) Knorpelinseln im spongiösen Knochen, die eine positive Färbung aufweisen.

Die *Femurköpfe* der 1 ½, 2 ½, und 8 Jahre alten Kinder (Pr22-24) wiesen in allen Knorpelbereichen eine hochhomogene Farbgebung auf. Miteinbezogen war jeweils auch die gesamte Artikulationsfläche. Eine leidlich komplementäre Darstellung zur Kollagen-I-Färbung wies lediglich das Präparat des 8-jährigen Kindes auf (Pr24), wobei sich die Kollagen-II-Färbung in den oberflächlichsten Schichten nur lokal abschwächte. Knorpelinseln der Spongiosa waren in allen drei Proben vorhanden und exprimierten in starkem Maße Kollagen II. Auch das Kniegelenksresektat des 9 Jahre alten Jungen (Pr25) zeigte sich im gesamten Knorpel homogen gefärbt. Vereinzelt waren noch Knorpelinseln in den Spongiosabälkchen zu finden.

Kollagen II war im Knorpel aller 15 untersuchten *Osteochondrome* zu finden. Auch das Präparat der 28-jährigen Patientin mit multiplen Exostosen (Pr5) besaß im Gegensatz zur Darstellung in der Kollagen-I-Färbung einen kleinen Anschnitt einer Knorpelinsel. Im Überblick war Kollagen Typ II in allen Knorpelschichten anzutreffen, wobei lediglich im Präparat des 7-jährigen Mädchens, bei dem ein solitäres Osteochondrom entfernt wurde (Pr7), die Farbgebung in den tiefen Knorpelschichten schwach ausfiel. Insgesamt war jedoch auffällig, dass der Knorpel der cartilaginären Exostosen im Vergleich zu den übrigen Proben nicht eine derart gleichmäßig homogene Farbgebung aufwies. Vielmehr zeigten sich die bereits in der Kollagen-I-Darstellung beschriebenen Septen dafür verantwortlich, dass sich ein eher unruhiges Bild ergab. Das Phänomen der Septierung war in 14 der 15 Resektate unter der Kollagen-II-Färbung nachweisbar. In 8 Fällen trat dies deutlich zu Tage, weniger eindrücklich, aber dennoch erkennbar, in den 6 übrigen. Eine Probe postpubertärer multipler cartilaginärer Exostosen war dagegen homogen gefärbt (Pr5, 28 Jahre, w). In 10 der 13 septierten Präparate entsprach sich die Stärke der Septenausprägung in der Kollagen-I- und Kollagen-II-Färbung. D.h., dass in den 6 Proben, die in der Kollagen-I-Färbung deutliche Septen aufwiesen, dies auch in der Kollagen-II-Färbung der Fall war (s. Abb. 12). Ebenso entsprachen sich die Befunde schwacher Septenausprägung in 4 Proben.

Sieht man davon ab, dass für das Resektat der 28 Jahre alten Patientin (Pr5) kein Pendant bezüglich des Knorpels in der Kollagen-I-Darstellung vorlag, so entsprach sich die Septenausprägung in allen Fällen multipler cartilaginärer Exostosen in beiden Färbungen. Dabei ist zu beachten, dass im Knorpel des 42-jährigen Patienten Kollagen I und II auch parallel auftraten, ähnlich wie in faserigem Knorpel.

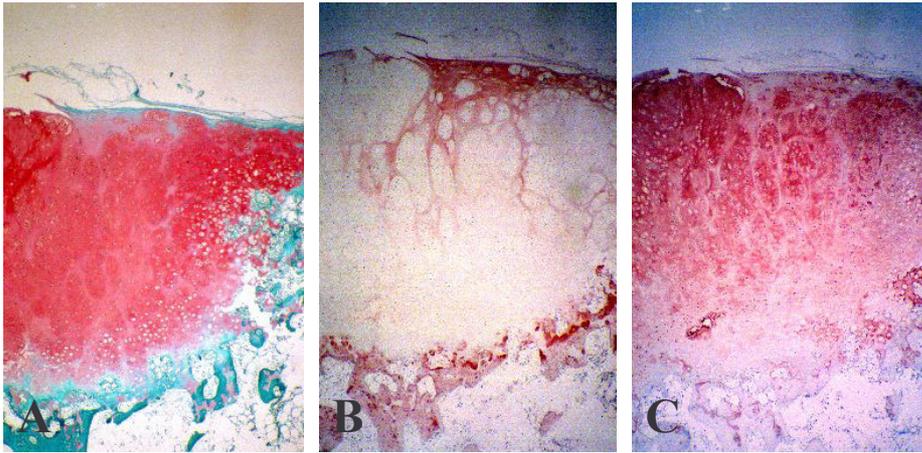


Abb. 12: MCE (Pr1, 11 Jahre, w): Exakte komplementäre Darstellung von fibrösen Septen in der Safranin-O-Darstellung (A) sowie in der Färbung gegen Kollagen I (B) und Kollagen II (C).

Gesonderter Besprechung bedürfen somit nur noch die 4 Präparate, die nicht in das beschriebene System fallen und alle unter den solitären Osteochondromen zu finden waren.

- Das Präparat des 7-jährigen Mädchens (Pr7) besaß eine deutliche Septierung in der Kollagen-II-Färbung, jedoch nur sehr leicht angedeutet in der Kollagen-I-Färbung.
- Das Präparat des 12-jährigen Mädchens (Pr10) zeigte wiederum starke Septierung in der Kollagen-II-Färbung, jedoch keine in der Kollagen-I-Darstellung.
- Bei dem 12-jährigen Jungen (Pr11) verhielt es sich umgekehrt. Hier war der Befund stark in der Kollagen-I-Färbung ausgeprägt, nur schwach dagegen in der Kollagen-II-Färbung.
- Keine Septen zeigte das Präparat der 26 Jahre alten Patientin (Pr15) bezüglich Kollagen I, jedoch andeutungsweise in der Kollagen-II-Darstellung. Im Gegensatz zu allen übrigen Proben stellten sich die fibrösen Septen jedoch nicht als Strukturen dar, welche von der Oberfläche in die Tiefe zogen, sondern sie befanden sich ausschließlich im tiefsten Knorpelbereich, welcher gerade auf der obersten Knochenlamelle zu liegen kam.

Diese Zusammenhänge seien in Tabelle 3 noch einmal veranschaulicht.

Tab. 3: Zusammenschau der Kollagen-I- und Kollagen-II-Färbung cartilaginärer Exostosen; +: Befund deutlich ausgeprägt; (+): Befund angedeutet; -: kein diesbezüglicher Befund; n.a.: Kein Knorpel vorhanden

	Präparat: Alter / Geschlecht	Septen in der Saf-O- Darstellung	Kollagen I septenartig	Kollagen II septenartig	Bemerkung
MCE	Pr1: 11 Jahre/w	+	+	+	2-malige Operation
	Pr2: 12 Jahre/w	+	+	+	
	Pr3: 13 Jahre/w	+	+	+	
	Pr4: 13 Jahre/m	+	+	+	
	Pr5: 28 Jahre/w	-	n.a.	-	
	Pr6: 42 Jahre/m	-	(+)	(+)	
SCE	Pr7: 7 Jahre/w	+	(+)	+	
	Pr8: 10 Jahre/w	+	(+)	(+)	
	Pr9: 10 Jahre/w	+	+	+	
	Pr10: 12 Jahre/w	+	-	+	
	Pr11: 12 Jahre/m	+	+	(+)	
	Pr12: 13 Jahre/w	+	+	+	
	Pr13: 15 Jahre/w	+	(+)	(+)	
	Pr14: 23 Jahre/m	(+)	(+)	(+)	
	Pr15: 26 Jahre/w	(+)	-	(+)	Septen in der Knorpeltiefe

Weiter fand sich Kollagen Typ II in durchweg starker, homogener Farbintensität in den kalzifizierten Knorpelresten der Spongiosa. Besonders in den präpubertären Präparaten konnte dies beobachtet werden. Allerdings enthielten auch zwei der adulten Resektate Knorpelinseln im Knochen, die positiv für Kollagen II waren.

Kollagen I und Kollagen II entsprachen sich in komplementärer Weise, etwa wie ein Dia-Positiv und ein Dia-Negativ. In 3 Präparaten von Polydaktylien war Kollagen II im Bereich des Periosts um das äußere Ende der distalen Phalanx zu finden. Eine intrazytoplasmatische Färbung von Chondrozyten scheint erwähnenswert, ist jedoch nicht auswertbar, da es sich um ein chargenspezifisches Phänomen handelte.

3.2.4 Ergebnisse der Kollagen-X-Färbung

In allen Präparaten *fetaler Wachstumsfugen* von der 16. bis zur 22. SSW (Pr26-31) war Kollagen Typ X im Bereich des Blasenknorpels vorzufinden. Es ergab sich ein charakteristisches Verteilungsmuster, welches stets eine starke Färbung in der äußersten Peripherie der Wachstumsfuge, also direkt unter dem Perichondrium, zeigte. Die Intensität nahm zum Zentrum der Wachstumsfuge hin wiederum ab. An den Stellen, an denen aber Blutgefäße die Epiphysenfuge penetrierten, war reichlich Kollagen X vertreten (s. Abb. 13 B). Manchmal lagen diese Blutgefäße nicht genau in der Schnittebene; da aber ihre Umgebung für Kollagen X deutlich positiv war, fand sich folglich in den einzelnen Präparaten teilweise auch eine Anhebung der Farbtintensität ohne sichtbares Vorhandensein eines Blutgefäßes. Es ist zu beachten, dass mit zunehmendem Alter des Feten eine zunehmend stärkere Färbung auftrat, welche bei den vorliegenden Proben ab der 20. SSW (Pr29-32) die gesamte Breite der Wachstumsfuge einnahm, wiederum mit Betonung im Randbereich und in der Umgebung von Blutgefäßen. Das Präparat des jüngsten Feten (Pr26, 16. SSW) zeigte noch keine vollständige Färbung der Wachstumsfuge. Hier fehlte sichtbar dargestelltes Kollagen X mit Ausnahme der charakteristischen Bereiche in der Peripherie (s. Abb. 13 A). Das Präparat des nächst älteren Feten (Pr27, 19. SSW) ließ andeutungsweise eine kontinuierliche Färbung über die gesamte Ausdehnung der Wachstumsfuge erkennen. Ähnlich verhielt es sich mit einem Präparat eines Feten der 20. SSW (Pr28). Die Probe des zweiten Feten desselben Alters (Pr29) hingegen wies schon eine weitgehend bandförmige Färbung der gesamten Breite der Epiphysenfuge auf, wiederum mit den Stellen charakteristischer Betonung. Dieser Befund war auch bei den Proben des ältesten Feten (Pr32, 23. SSW) ähnlich. Zusammenfassend wurde deutlich, dass der Gehalt an Kollagen Typ X in der fetalen Entwicklung im Bereich des Kniegelenks mit zunehmendem Alter anstieg (s. Abb. 13).

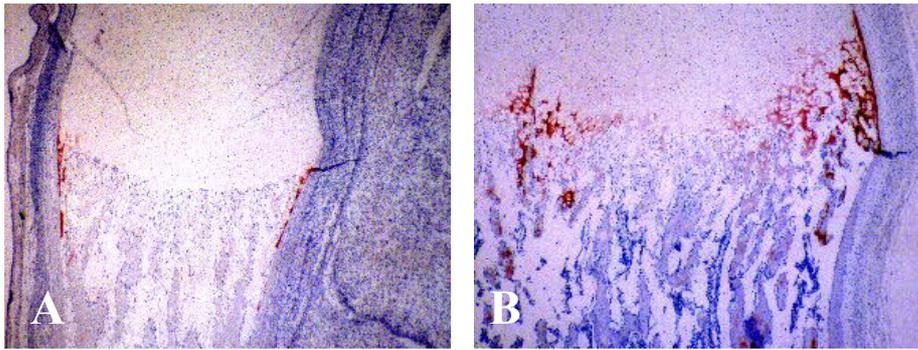


Abb. 13:

- A:** Fetale Tibia (Pr26, 16. SSW, w): Lediglich in der Peripherie der Wachstumsfuge ist Kollagen X zu erkennen, welches sich in Knorpelresten des neu gebildeten Knochens nach distal (unten im Bild) erstreckt.
- B:** Fetale Tibia (Pr32, 23. SSW, w): Kollagen X ist betont am Rande der Wachstumsfuge zu erkennen (rechts), ebenso im Bereich um ein penetrierendes Blutgefäß (links), jedoch auch dazwischen, so dass praktisch die gesamte Breite der Epiphysenfuge gefärbt ist. Auch die Knorpelreste der Spongiosa sind deutlich positiv.

Bei den *Polydaktylien* war ein vergleichbares Muster nicht nachweisbar. 3 der 6 vorliegenden Präparate besaßen aber ein Band positiver Farbgebung über die vollständige Ausdehnung ihrer Wachstumsfuge (Pr16, Pr20, Pr21; s. Abb. 14 A). Dass dieses Phänomen aber nicht an das gesamte Präparat gebunden sein musste, beweist das Resektat eines 10 Monate alten Mädchens (Pr20), das eine vollständige, artikulierende Gelenkformation und somit 2 Wachstumsfugen enthielt. Eine davon war durchgehend bandförmig angefärbt, in der anderen fand sich lokal begrenzt nur wenig Kollagen X, hauptsächlich perizellulär um einige hypertrophe Chondrozyten oder Chondrozytengruppen angeordnet. Bei dem Präparat des 5 Monate alten Mädchens (Pr17) war Kollagen Typ X ebenfalls weitgehend perizellulär lokalisiert ohne eine kontinuierliche Färbung über die gesamte Spanne der Wachstumsfuge aufzuweisen, jedoch in wesentlich ausgedehnterem Maße, so dass weite Areale der hypertrophen Knorpelzone gefärbt waren. Die zwei übrigen Proben (Pr18, 6 Monate, m; Pr19, 10 Monate, w) ließen Kollagen Typ X nur punktuell im Bereich der Wachstumsfuge erkennen. Dabei ist bemerkenswert, dass sich bei den *Polydaktylien* besonders gut die Ausdehnung der Färbung in Abhängigkeit von der Morphologie demonstrieren ließ. Beispielsweise war die Wachstumsfuge des Präparats eines der 10 Monate alten Mädchen (Pr19) bereits stark verkalkt (basophil in der Hämalaun-Färbung), wies wenig hypertrophe Knorpelzellen auf und enthielt gleichzeitig nur geringfügig Kollagen X (s. Abb. 14 B). Dasselbe gilt für die Probe des 6 Monate alten

Jungen (Pr18) sowie eine der beiden Wachstumsfugen im Präparat des zweiten 10 Monate alten Mädchens (Pr20). Kollagen Typ X konnte bei Polydaktylien also in der Knorpelmatrix gefunden werden, besonders kräftig aber auch in perizellulärer Lokalisation, entweder im Verbund mit einer deutlichen Matrixfärbung oder für sich allein. In Analogie zu Kollagen II war ein hervorstechender Befund in der Kollagen-X-Darstellung die positive Färbung im Bereich der distalen Endphalanx bei 2 Proben (Pr17, 5 Monate, w; Pr18, 6 Monate, m). Sie fand sich in der Tiefe des Periosts, wie auch in nahegelegenen Knorpelinseln, die von Knochen umschlossen wurden. Eine Zusammenschau dieser Verhältnisse für alle Polydaktylien, von denen ein medianer Anschnitt der distalen Endphalanx verfügbar war zeigt Tabelle 4. Die Färbungen von Kollagen X, II und der Proteoglykane der Polydaktylie des 6 Monate alten Jungen (Pr18) sind in Abb. 15 dargestellt.

Tab. 4: Kollagenverteilung im Bereich der distalen Endphalanx der Polydaktylien, die einen medianen Anschnitt aufwiesen; +: Färbung vorhanden; -: Keine Färbung vorhanden; n.a.: entsprechender Anschnitt nicht verfügbar

Präparat	Proteoglykane im Bereich der distalen Endphalanx	Kollagen II im Bereich der distalen Endphalanx	Kollagen X im Bereich der distalen Endphalanx
Polydaktylie, Pr16, 8 Tage, m	-	-	-
Polydaktylie, Pr17, 5 Monate, w	+	+	+
Polydaktylie, Pr18, 6 Monate, m	+	+	+
Polydaktylie, Pr19, 10 Monate, w	-	+	n.a.

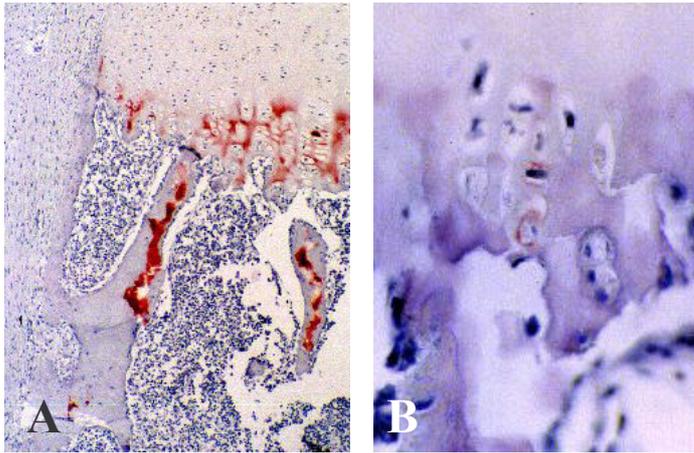


Abb. 14: Extreme Unterschiede der Kollagen-X-Darstellung einzelner Polydaktylien

A: Polydaktylie (Pr16, 8 Tage, m): Bandförmige Färbung für Kollagen X in der Matrix der hypertrophen Knorpelzone über die gesamte Breite der Wachstumsfuge und in Knorpelresten der Spongiosa.

B: Polydaktylie (Pr19, 10 Monate, w): Minimale Kollagen-X-Färbung in stark verkalktem, basophilem Knorpel.

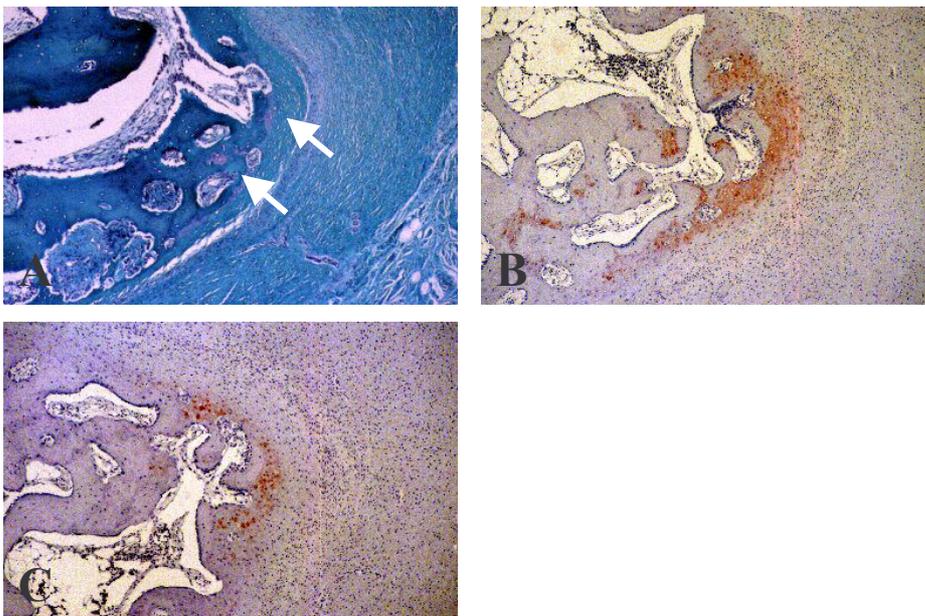


Abb. 15: Polydaktylie (Pr18, 6 Monate, m): Darstellung jeweils desselben Anschnitts des Präparats in unterschiedlichen Färbungen. Es finden sich Proteoglykane (**A**), Kollagen Typ II (**B**) und Kollagen Typ X (**C**) subperiostär und in Knorpelinseln der Spongiosatrabeikel im Bereich der distalen Endphalanx.

A: Vorliegen der Proteoglykane in der Safranin-O-Darstellung als schwache rote Färbung (Pfeile) subperiostär und als Inseln im Knochen.

B: Kollagen Typ II in genau demselben Bereich wie die Proteoglykane, jedoch in deutlicherer Darstellung.

C: Paralleles Auftreten von Kollagen Typ X zu Kollagen II und Proteoglykanen, jedoch vorwiegend in noch knochennäheren Arealen; somit Lokalisation subperiostär sowie in den Knorpelinseln der Spongiosa.

Von den drei vorhandenen *Femurköpfen* wurde aufgrund der Präparatgröße nur der Schnitt des 1 ½ Jahre alten Kindes (Pr22) auf Kollagen X hin untersucht. Es wies eine sehr starke bandförmige Färbung in der Matrix über die gesamte Breite der Wachstumsfuge auf (s. Abb. 16 A). Im Bereich um den sekundären Knochenkern waren einige lakunäre Knorpelformationen zu erkennen, welche von deutlich hypertrophen Chondrozyten umrahmt wurden (s. Abb. 16 B). Auch hier fand sich in unterschiedlichen Intensitätsstufen Kollagen Typ X. Anbaustellen in lateraler Fortsetzung der Epiphysenfuge, die bereits annähernd parallel zum Schaft lagen, stellten sich ähnlich den genannten lakunären Formationen um den sekundären Knochenkern dar. Die Farbgebung in der Knorpelmatrix war durchweg sehr intensiv, am stärksten kam sie jedoch in perizellulären Bereichen zur Darstellung. Auch Knorpelinseln in den sekundären, neu gebildeten Knochenbälkchen waren positiv für Kollagen X (s. Abb. 16). Da dieses Präparat eines Femurkopfes Kollagen Typ X beispielhaft an allen charakteristischen Stellen und in regelmäßiger Ausprägung aufwies, schien es gerechtfertigt, die Färbung der übrigen zwei großen Präparate (Pr23, 24) auszusetzen. Der Anschnitt aus dem Kniegelenk des 9-jährigen Jungen (Pr25) zeigte keine positive Färbung für Kollagen X. Allerdings handelte es sich nur um ein kleines, sehr lateral gelegenes Probestück, welches nur wenig Chondrozyten in Säulenformation erkennen ließ und praktisch keine hypertrophen Knorpelzellen.

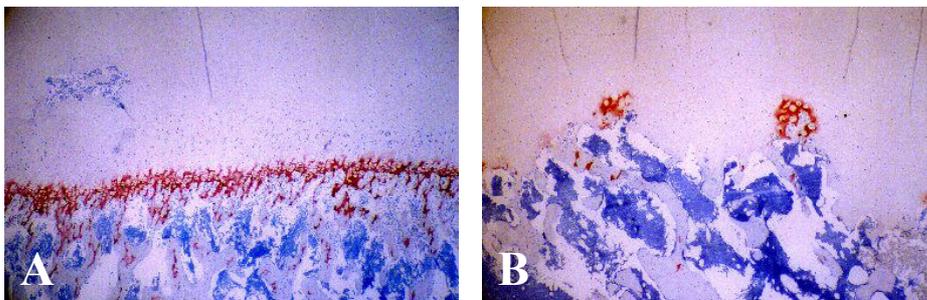


Abb. 16: Femurkopf (Pr22, 1 ½ Jahre), Kollagen-X-Färbung

- A:** Darstellung der proximalen Epiphysenfuge des Femurs. Kollagen X als durchgehendes rotes Band im tiefen Bereich der Zone hypertrophen Knorpels sowie in Knorpelresten der darunter liegenden Spongiosa.
- B:** Das sekundäre Ossifikationszentrum umgebende lakunäre Formationen, die von hypertrophen Knorpelzellen gesäumt werden. Dabei ebenfalls deutliche Expression von Kollagen X.

Da das Präparat der 28-jährigen Patientin mit multiplen Exostosen (Pr5) wiederum keinen Knorpelanteil enthielt, standen insgesamt 14 Proben von *Exostosen* der Beurteilung zur Verfügung. In all diesen Schnitten war Kollagen X nur in tiefen Knorpelschichten zu finden, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung. 9 der Präparate wiesen ein weitgehend durchgängiges Band positiver Färbung auf, welches sich über die gesamte Breite der jeweiligen Wachstumsfuge erstreckte (s. Abb. 17 A, B). In 4 weiteren Proben (Pr2, MCE, 12 Jahre, w; Pr9, SCE, 10 Jahre, w; Pr13, SCE, 15 Jahre, w; Pr14 SCE, 23 Jahre, m) war Kollagen X in deutlicher Ausprägung vorhanden, jedoch waren auch größere Anteile der Matrix negativ. Die Farbgebung beschränkte sich hier vorwiegend auf den perizellulären Bereich, seien es nun einzelne hypertrophe Chondrozyten oder kleinere Chondrozytengruppen. Besonders bemerkenswert darunter war das streuselkuchenartige Färbemuster im Präparat des 23 Jahre alten Mannes (Pr14, Abb. 17 C), wobei sich gewissermaßen ein Ring positiver Färbung um den jeweils betreffenden Chondrozyten legte. Im letzten der 14 Präparate (Pr15, SCE, 26 Jahre, w) war nur sehr wenig Kollagen X zu finden, doch zeigten sich einige Chondrozyten, die von einem schmalen Saum umgeben waren. Desweiteren soll das Präparat des 42-jährigen Mannes mit multiplen cartilaginären Exostosen (Pr6) gesondert Erwähnung finden, da hier in einer weit postpubertären Probe bemerkenswert viel Kollagen Typ X auftrat, wobei morphologisch keine Wachstumsfuge auszumachen war. Vielmehr sah man eine gut ausgeprägte Tidemark. Proximal dieser war der Hauptanteil des Kollagens Typ X gelegen (s. Abb. 17 D).

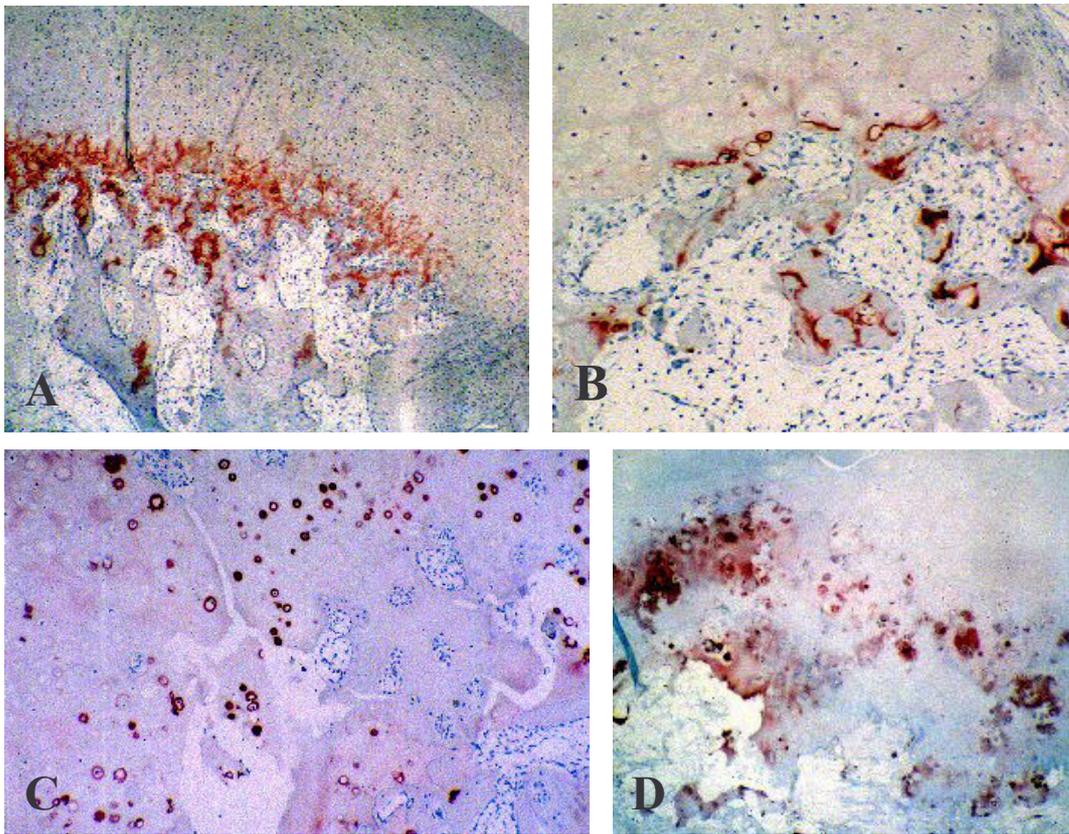


Abb. 17

- A:** SCE (Pr7, 7 Jahre, w): Bandförmiges Färbemuster von Kollagen X über die gesamte Ausdehnung der Wachstumsfuge im tiefen Bereich der Zone hypertrophen Knorpels sowie Positivität von Knorpelresten der Spongiosa.
- B:** MCE (Pr1, 11 Jahre, w): Schwächere Expression von Kollagen X als in Abbildung A. Beschränkung der Färbung auf die Knorpel-Knochen-Übergangszone mit sehr diskreter Ausprägung am linken Bildrand.
- C:** SCE (Pr14, 23 Jahre, m): Kollagen X in Form perizellulärer ringförmiger Farbgebung um Chondrozyten der tiefen Knorpelzone mit streuselkuchenartigem Bild.
- D:** MCE (Pr6, 42 Jahre, m): Diffuse Verteilung von Kollagen X in der Matrix proximal der Tidemark (auf dem Bild schlecht zu erkennen). Positive Färbung im Knorpelüberrest eines Knochen trabekels links unten im Bild.

Kollagen X fand sich jeweils im Bereich hypertropher Chondrozyten. Dieser Befund korrelierte mit der Morphologie des Präparats. Zusätzlich konnte es außerhalb von regulären Wachstumsfugen am distalen Ausläufer von Endphalangen der Polydaktylien zusammen mit Kollagen Typ II nachgewiesen werden. Außerdem war Kollagen Typ X auch ohne Bindung an hypertrophe Chondrozyten im Knorpel adulter cartilaginärer Exostosen vorhanden.

3.2.5 Ergebnisse der Ki-67-Färbung

Die Ki-67-Auswertung erfolgte semiquantitativ durch Auszählen positiver und negativer Zellkerne. Ein Färbebeispiel fetalen epiphysären Knorpels gibt Abb. 18.

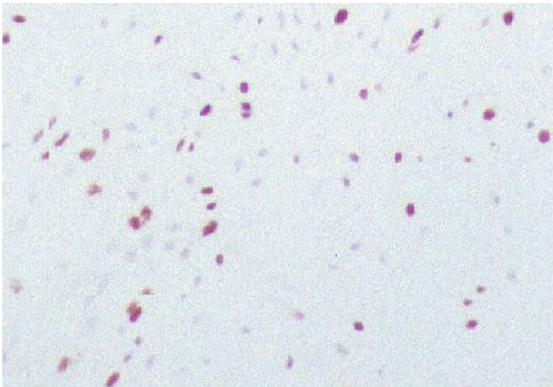


Abb. 18:

Fetaler Knorpel (Pr28, 20. SSW, m): Ki-67-positive Zellkerne erscheinen rot gefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte mit stark verdünntem Hämalaun, um die immunhistochemische Färbung nicht zu überdecken. Daher zeigen sich negative Zellkerne in schwachem Blau.

Der Quotient aus der Anzahl positiv gefärbter Zellkerne und der Gesamtzellzahl im betrachteten Bereich ergibt die sog. Wachstumsfraktion. Sie ist ein Maß für die Proliferationsrate. Im jeweiligen zu beurteilenden Abschnitt war folglich eine möglichst große Zahl von Zellen auszuzählen.

Bei den *fetalen Wachstumsfugen* lag die ausgezählte Zellzahl zwischen minimal 819 und maximal 1310 Zellen. Die Wachstumsfraktion im Bereich des Säulenknorpels der Wachstumsfuge lag für die Präparate ab der 19. SSW (Pr27-32) gerundet zwischen 44 und 53 % (weniger als 10 Prozentpunkte Unterschied). Das Präparat des weiblichen Feten der 16. SSW (Pr26) schien eine Ausnahme in zweierlei Hinsicht darzustellen (Abb. 19): Zum einen war die Wachstumsfraktion in der Wachstumsfuge mit 38 % deutlich niedriger als die der übrigen, zum anderen überstieg die Wachstumsfraktion im restlichen Epiphysenknorpel (Restknorpel) sowohl die Wachstumsfraktion der eigenen Epiphysenfuge als auch die der übrigen untersuchten Kniegelenke. Genau in diesem Präparat war aber auch die Morphologie der Wachstumszone noch deutlich weniger differenziert als bei den reiferen Feten. So fanden sich Bereiche mit höherer Proliferation, die für sich eine Wachstumsfraktion von 45 % aufwiesen, dazwischen eingestreut lagen jedoch wieder Areale mit niedrigerer Proliferation, die Werte um etwa 30 % besaßen.

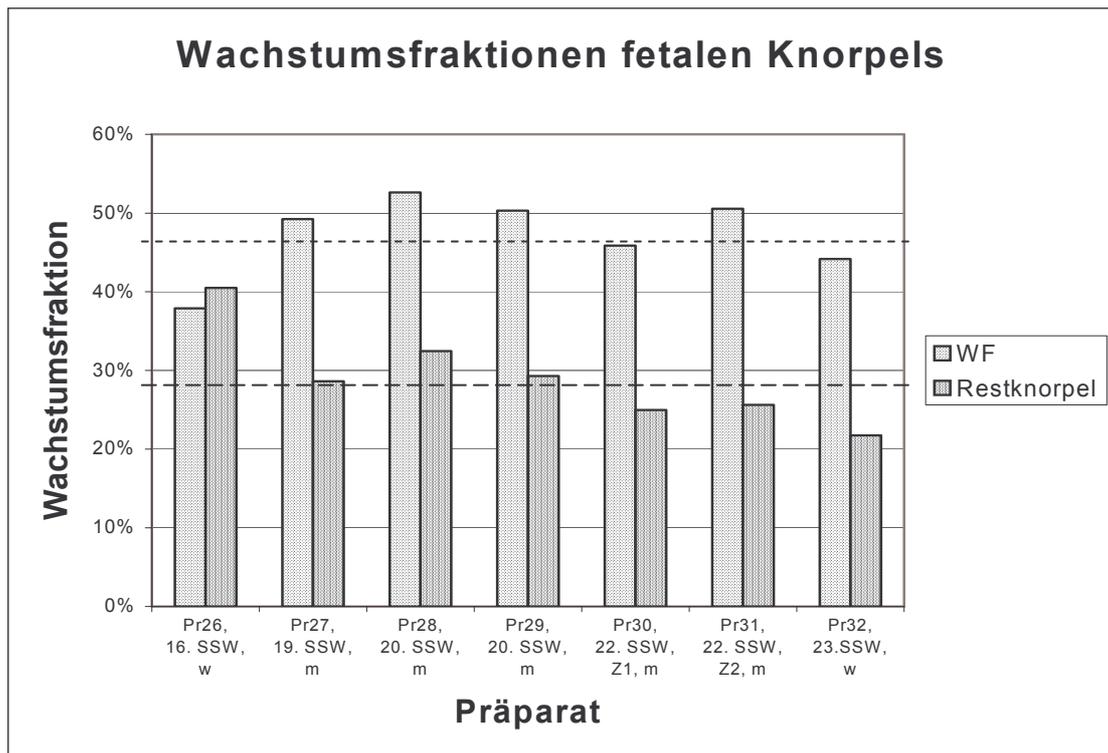


Abb. 19: WF: Wachstumsfuge; Z1: Eineiiger Zwilling 1; Z2: Eineiiger Zwilling 2

----- Arithmetisches Mittel der Wachstumsfraktionen der WF

----- Arithmetisches Mittel der Wachstumsfraktionen des Restknorpels

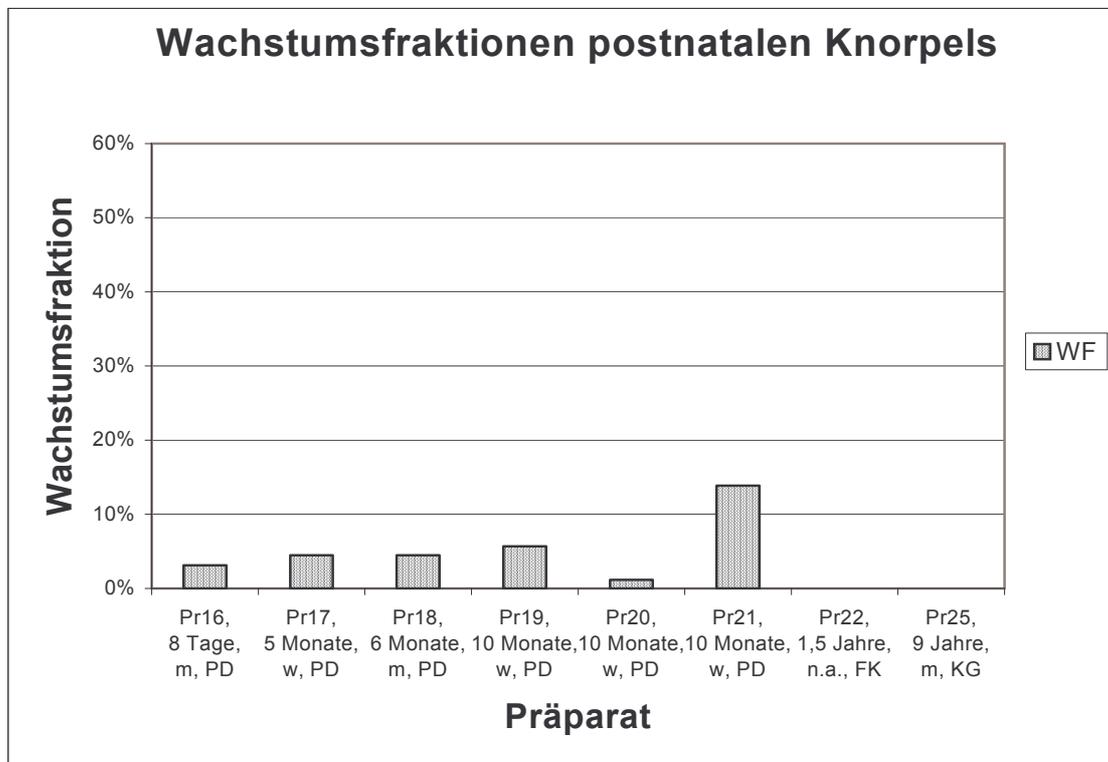


Abb. 20: WF: Wachstumsfuge; PD: Polydaktylie; FK: Femurkopf; KG: Kniegelenk

Zusammengefasst erhielt man den im Diagramm angegebenen Wert von 38 %. Auch die restliche Epiphyse schien in diesem Entwicklungsstadium stärker zu proliferieren. Dies ist mit dem Gedanken an ein vermehrt zentrifugales Wachstum zu vereinbaren, zumal die Zelldichte dieser Epiphyse wesentlich höher ausfiel als in den restlichen Proben. Ab der 19. SSW lag die Wachstumsfraktion des Epiphysenknorpels zwischen 22 und 32 % (10 Prozentpunkte Unterschied).

Zusammenfassend ähnelten sich die Präparate der 19. bis 23. SSW (Pr27-32) sehr stark in Morphologie und Architektur. Ebenso waren die Wachstumsfraktionen der jeweils betrachteten Areale sehr konsistent untereinander. Die Architektur der Wachstumsfuge des jüngsten Feten (Pr26, 16. SSW, w) hingegen wich deutlich von den übrigen ab. Insbesondere konnte nur schwer eine genaue Grenze zwischen Epiphysenfuge und der Epiphyse selbst festgestellt werden.

Betrachtete man die *Polydaktylien*, so fiel im Gegensatz zu den fetalen Kniegelenken die wesentlich geringere Proliferationsrate ins Auge. Die Ki-67-Wachstumsfraktion in der Epiphysenfuge bewegte sich zwischen 1 und 6% (Abb. 20).

Eine Ausnahme stellte jedoch das Resektat eines der 10 Monate alten Mädchen (Pr21) dar. Es besaß eine Wachstumsfraktion von 14 % in der Wachstumsfuge. Dies mag seine Erklärung darin finden, dass dies die einzige Patientin mit einer beidseitigen Hexadaktylie der Zehen war, wobei zu postulieren wäre, dass die Anlage folglich einen weniger rudimentären Charakter aufwies.

Die Zellen der restlichen Areale der Epiphysen zeigten nur eine schwache Teilungstendenz. Bei den Polydaktylien war die Wachstumsfraktion dort stets kleiner als 1% (nicht im Diagramm dargestellt). In absoluten Zahlen bedeutet dies, dass zwischen einer und 13 Zellen auf jeweils mehrere tausend ausgezählte Zellen positiv waren.

Von den 3 zur Verfügung stehenden *Femurköpfen* erwies es sich als sinnvoll, nur den Schnitt des 1 ½-jährigen Kindes (Pr22) auf Ki-67 hin zu untersuchen, da die restlichen Präparate entkalkungsbedingt allenfalls noch Kernschatten erkennen ließen. Hier konnte jedoch wie auch bei dem Resektat des Kniegelenks des 9-Jährigen (Pr25) keinerlei Proliferation nachgewiesen werden. Bei dem für Ki-67 gefärbten Femurkopf mochte ebenfalls eine zu aggressive Entkalkung eine Rolle gespielt haben, was an durchaus alterierten Kernstrukturen zu erkennen war. Das Kniepräparat hingegen besaß, wie bereits beschrieben, nur eine andeutungsweise ausgebildete Wachstumsfuge.

Bei der Beurteilung der *Exostosen* ist zu beachten, dass sie architektonisch ein sehr polymorphes Bild aufwiesen. Oftmals war die Wachstumsfuge nicht deutlich vom Rest der Knorpelkappe zu trennen. Daher ist die Wachstumsfraktion in den Abbildungen 21 und 22 für die einzelnen Präparate durch 3 Balken dargestellt. Konnte keine Epiphysenfuge explizit ermittelt werden, so sind nur die Balken für die Wachstumsfraktion des Restknorpels und des gesamten Knorpels aufgetragen, welche folglich die gleiche Höhe besitzen.

War eine morphologisch deutlich ausgeprägte Wachstumsfuge bei einem Osteochondrom vorhanden, so ist ihre Wachstumsfraktion in Abb. 21 und Abb. 22 aufgetragen. Die einzelnen Werte schwankten erheblich (min. 3 %, max. 20 %). Es konnte keine Beziehung zum Alter des jeweiligen Trägers festgestellt werden. Dies gilt für multiple wie für solitäre Exostosen. Die Wachstumsfraktionen in der restlichen Knorpelkappe bewegten sich zwischen 0 und 7 %. Macht man keinen Unterschied zwischen Wachstumsfuge und Restknorpel, so erhält man den Gesamtproliferationswert der Knorpelkappe für den jeweiligen Schnitt einer Exostose. Dieser lag zwischen 0 und 10 %. Auffällig ist aber, dass bei allen Exostosen, die von adulten Trägern stammten, keine Zellteilung von Chondrozyten mehr nachweisbar war. Auch bei der solitären Exostose des ältesten präadoleszenten, 15-jährigen Mädchens fand sich keine positive Zelle.

In der Zusammenschau wird deutlich, dass die Exostosen untereinander bezüglich ihrer Wachstumsfraktionen sehr unterschiedlich geartet waren, dass jedoch diesbezüglich keine einschneidenden Differenzen zwischen multiplen und solitären Osteochondromen bestanden.

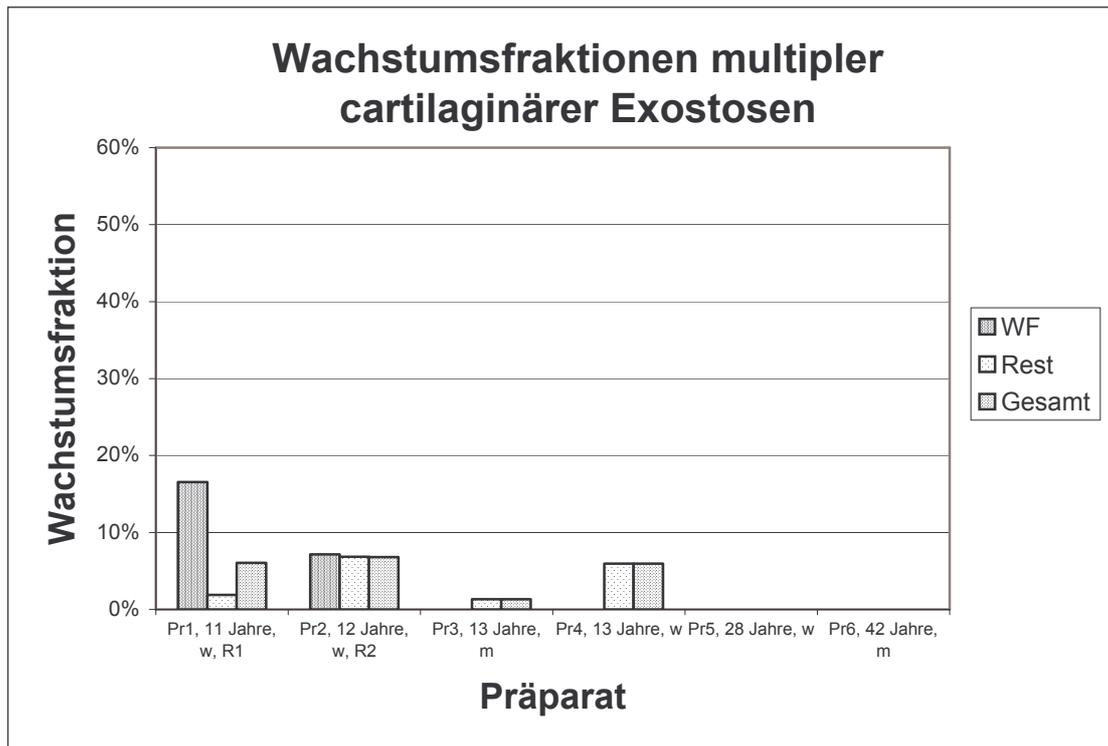


Abb. 21: WF: Wachstumsfuge; Rest: Restknorpel über der Wachstumsfuge; Gesamt: Wachstumsfuge zusammen mit Restknorpel; R1 und R2: Resektate derselben Patientin. Bei dem Präparat Pr2 ist der „Gesamt“-Balken niedriger als der der WF und des Restknorpels. Dies ist der Fall, weil sich zwischen WF und Restknorpel eine zusätzliche proliferationsarme Übergangszone (nicht dargestellt) befand.

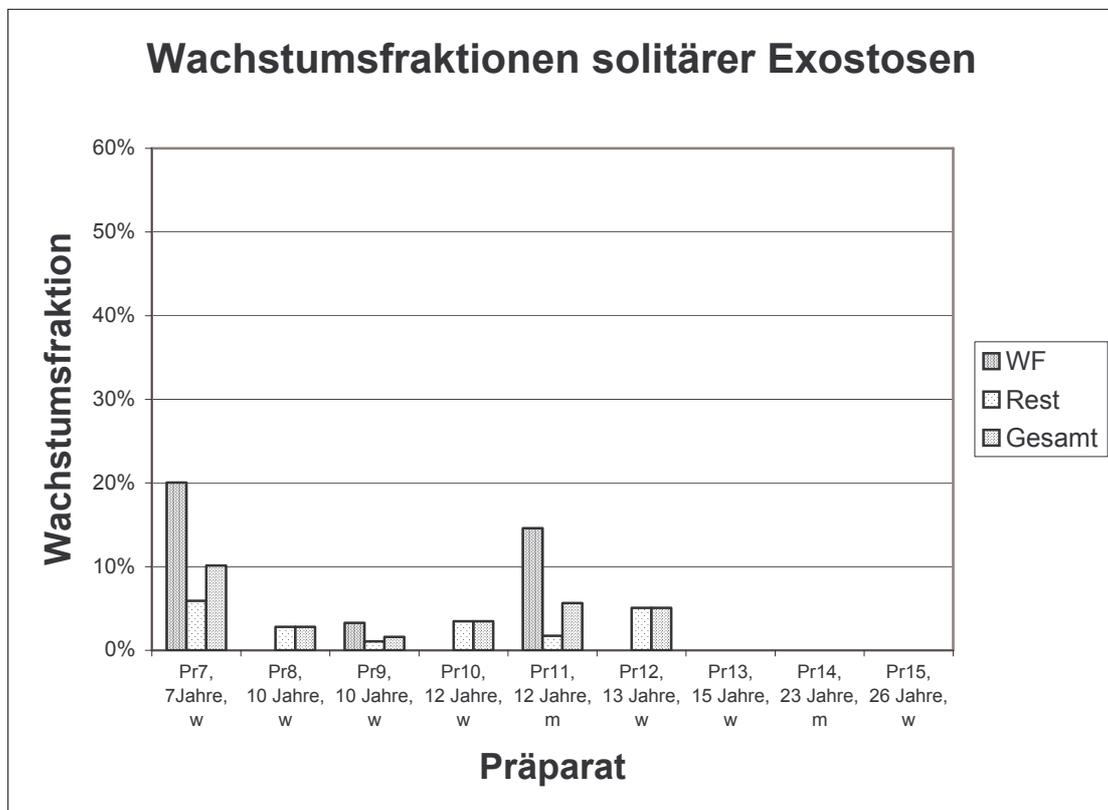


Abb. 22: WF: Wachstumsfuge

Das sehr homogene Bild der Ki-67-Wachstumsfraktion bei den untersuchten pränatalen Wachstumsfugen und den Polydaktylien ließ sich bei den Exostosen nicht nachweisen. Diese besaßen auch weder eine derart hochorganisierte Wachstumsfuge, noch zeichneten sie sich durch eine derart konsistent einheitliche Morphologie aus.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

Die Verwendung von Polydaktylien als Beispiele für postnatale normale Knorpel-Knochen-Präparate

Resektate von menschlichen Polydaktylien eignen sich deshalb für eine vergleichende Studie mit cartilaginären Exostosen, da sie wie diese eine Wachstumsfuge besitzen und ähnlich wie hereditäre multiple Osteochondrome in ihrer Entwicklung bereits zu fetalen Zeiten angelegt sind [11]. Polydaktylien werden i.d.R. bald nach der Geburt vornehmlich aus kosmetischen Gründen chirurgisch entfernt. Die Pathogenese der Polydaktylien verspricht, dass es sich - wenn auch um abnorm angelegte Extremitätenabschnitte - doch um histologisch und molekular regelrecht aufgebaute Finger- bzw. Zehen(glieder) handelt. Polydaktylien treten in einer Fülle von Ausprägungen auf wie z.B. einseitig, beidseitig, präaxial, zentral, postaxial, nur in Form von zusätzlich ausgebildetem Weichgewebe (Typ I nach Temtamy und McKusic 1978 [124]), als knöchern-knorpelig angelegte Polydaktylie (Typ II), sowie als komplett ausgebildeter Finger bzw. Zehe mit eigenem Metakarpalknochen (Typ III). Des Weiteren kommen Polydaktylien im Rahmen von genetisch bedingten Syndromen vor, wie etwa dem Greig-Cephalopolysyndactylie-Syndrom (GCPS), dem Pallister-Hall-Syndrom (PHS) oder der Postaxialen Polydaktylie vom Typ A (PAP-A).

Die Pathogenesetheorien stützen sich demnach im Wesentlichen auf Defekte der Gene, die den Körperbauplan regeln.

Die Extremitätenknospe, bestehend aus Mesenchymzellen des paraxialen und des Seitenplattenmesoderms wird vom dicken Ektoderm der Randleiste (apical ectodermal ridge - AER) überzogen. Die Ausbildung der Knospe kann durch experimentelle Applikation von FGF4 bzw. FGF8 ausgelöst werden, was eine Induktion der Gentranskription von Fgf2, 4 und 8 in der Randleiste zur Folge hat, um zu deren Auswachsen beizutragen. Dieser Vorgang ist folglich für die Ausbildung der proximal-digitalen Achse verantwortlich, wohingegen eine Gruppe von mesenchymalen Zellen am posterioren Rand der Extremitätenknospe die Ausbildung der anterior-posterioren Differenzierung, also die Ausbildung von Daumen und den vier Langfingern, steuern. Diese Zellgruppe besitzt folglich polarisierende Aktivität und ist im angloamerikanischen Sprachraum unter dem Begriff „zone of polarizing activity“ (ZPA) bekannt. Unter anderem

unterstützt von der Randleiste gebildetes FGF4 die Expression von Sonic hedgehog (Shh) im Bezirk der ZPA [51]. Es existiert Anhalt dafür, dass Shh, eine bedeutende Rolle in der Entwicklung von Polydaktylien spielt, da eine ektope Expression am Vorderrand der Extremitätenknospe bei polydaktylen Mausmutanten gefunden wurde [125]. Die genaue Funktion von Shh ist bislang noch nicht geklärt, doch versetzt Shh eine Gruppe von Zinkfinger-Proteinen (Gli1, 2 und 3) in weiter anterior gelegenen Zellen in die Lage, eine Transkriptionsantwort auszulösen. Bislang wurde für verschiedene Defekte von Gli3 nachgewiesen, dass es für die Entstehung von Polydaktylien beim Menschen (GCPS, PHS und PAP-A), wie bei der Maus verantwortlich ist. Grundlage der Theorie hierzu ist, dass Gli3 die Wirkung von Shh supprimiert. Besteht nun ein Aktivitätsverlust von Gli3, so kommt es zur postaxialen Polydaktylie; trägt die Mutation im Gli3-Gen nun aber zu einer Aktivitätssteigerung des Genprodukts bei, wird die zentrale, wie die präaxiale Polydaktylie erklärbar durch eine geforderte Zunahme der Shh-Wirkung in anterioren Abschnitten [125].

Weitere Gene, die den Bauplan und die Länge der Extremitäten kontrollieren, gehören zur Familie der Homeobox-Gene (Hox). Die hierfür beteiligten Gene entstammen lediglich den HoxA- und HoxD-Komplexen, von denen die paralogen Gruppen 9 bis 11 (HoxA9-11 und HoxD9-11) die Ausbildung von Stylopodium und Zeugopodium regulieren, etwa dem menschlichen Ober- bzw. Unterarm entsprechend. Speziell für die Entwicklung der Finger und Zehen, also Anteile des Autopodiums, sind dagegen die Gene HoxA-13, HoxD-13, HoxD-12 und HoxD-11 von besonderer Bedeutung. Diese und weitere Gene besitzen sowohl ein qualitatives als auch ein quantitatives Interaktionsmuster, um die Finger- bzw. Zehenentwicklung zu steuern. Durch Einsatz von Allelen mit unterschiedlichen Defekten und folglich unterschiedlich ausgeprägtem Funktionsverlust konnte an Mäusen gezeigt werden, dass die Gruppen 11, 12 und 13 sowohl die Länge als auch die Anzahl von Fingern beeinflussen. Es konnten penta-, poly-, oligo- und adaktyle Formen erzeugt werden [141].

Tanaka et al. lieferten 2000 [122] experimentell an Mäusen und Hühnerembryonen gewonnene Hinweise, dass das Gewebe, welches in Nachbarschaft zu der jeweiligen Extremitätenknospe liegt, wie etwa Hals, Flanke und Schwanz, polarisierende Aktivität aufweist. Eine Verlagerung dessen in die Knospe könne demnach als Folge einen polydaktylen Phänotyp ausbilden. Diese Rekrutierung ortsfremden Gewebes könne aus einer in ihrer Größe stärker als normal ausgeprägten Randleiste (AER) resultieren. Die Arbeitsgruppe zeigte weiter, dass Zellen aus der Umgebung von Extremitätenknospen,

Hals, Flanke und Schwanz auf eine implantierte FGF4-Quelle hin wanderten, um so ein Modell für eine vergrößerte Randleiste (AER) zu haben. Dabei besitze Gewebe aus der hinteren Halsregion nur schwache polarisierende Aktivität, was aufgrund der Lage das seltenere Vorkommen präaxialer Polydaktylien der Vordergliedmaßen bei Mäusemutanten erklären würde im Vergleich zu den Hintergliedmaßen. Die postaxiale Polydaktylie könne hingegen abgeleitet werden von rekrutierten Zellen der vorderen Flankenregion im Falle der vorderen Extremität, von Zellen der Schwanzregion im Falle der hinteren Extremität. Diese Regionen besäßen im Gegensatz zum Halsgewebe eine stärker ausgeprägte polarisierende Aktivität mit ektopter Shh-Bildung [122].

Auch dass viele Gewebe in der Embryonalentwicklung das Potential zur Ausbildung von Extremitäten einschließlich der Finger bzw. Zehen besitzen [122], unterstützt die Annahme, dass Polydaktylien in ihrem feingeweblichen wie molekularen Aufbau und Stoffwechsel den regulär angelegten Fingern und Zehen entsprechen. Somit sollten die untersuchten Resektate von Polydaktylien ein geeignetes Bindeglied unter den normalen Gelenkknorpelpräparaten zwischen den verwendeten fetalen Kniegelenken und den anderen, bis zu 9 Jahre nach Geburt erhaltenen Entitäten, darstellen.

Die unterschiedliche Fixierung der einzelnen Entitäten

Da alle Proben fetaler wie postnataler Knorpel-Knochen-Präparate aus den Pathologischen Instituten Augsburg und München stammten, waren sie nach dem dortigen Standard in Formalin 10 % fixiert. Eines der neu akquirierten fetalen Kniegelenke wurde jedoch auf unseren ausdrücklichen Wunsch hin mit Formalin 4 % nach Lillie behandelt (Pr32, 23. SSW, w). Das Bild der Schnitte dessen ließ sich in keiner der Färbungen von dem eines Feten beispielsweise der 22. SSW unterscheiden, dessen Kniegelenk in 10-prozentigem Formalin fixiert wurde. Somit waren die eingangs unterschiedlich behandelten Präparate alle einer gemeinsamen Beurteilung zugänglich.

Die „2-Schritt-indirekte-Methode“ der Immunperoxidasefärbung

Die „2-Schritt-indirekte-Methode“ weist im Vergleich zur direkten Methode den Vorteil auf, dass sie im Bezug auf die Verwendung unterschiedlicher Primärantikörper wesentlich flexibler ist, da im Falle der Herkunft dessen aus jeweils derselben Spezies mit ein und demselben Sekundärantikörper gearbeitet werden kann. Es entfällt also bei der Herstellung des Primärantikörpers der Schritt der Markierung, handle es sich nun um das Farbkonversionsenzym selbst oder um Biotin. Die höhere Wirtschaftlichkeit der hier angewandten Technik steht daher außer Frage. Für die vorliegende Studie bedeutet dies,

dass bei Einsatz von 4 unterschiedlichen Primärantikörpern, die jeweils von der Ziege oder von der Maus stammten, nur zwei unterschiedliche Sekundärantikörper benötigt wurden.

Um eine hohe *Spezifität* zu gewährleisten, wurde nach dem Andau und vor Anwendung des ersten Antikörpers die endogen vorhandene Peroxidase nach dem Prinzip der Substrathemmung mittels H_2O_2 3 % blockiert. Dieser Schritt war notwendig, da der später erwünschten Farbkonversion dieselbe chemische Reaktion zugrunde liegt.

Weitere unspezifische Färbeargebnisse konnten gut mittels Anwendung eines Normalserums blockiert werden. Dieses musste unbedingt von derselben Spezies stammen wie der Sekundärantikörper. Dadurch war gewährleistet, dass im Verlauf der Färbeprozedur keine Reaktion des Sekundärantikörpers mit dem zugefügten Eigenserumprotein stattfand. Das Normalserum musste weiter notwendigerweise vor Anwendung des ersten Antikörpers auf den Schnitt aufgebracht werden, um eine unspezifische ionische Anlagerung von Primär- wie Sekundärantikörper an stark geladene Gewebsproteine zu verhindern. Tatsächlich bewirkte man durch diesen Schritt eine Neutralisierung vorhandener Ladungen im Gewebe und dadurch schlussendlich eine Erhöhung der Spezifität der gesamten Methodik [83].

Bezüglich der *Sensitivität* ist die „2-Schritt-indirekte-Methode“ der direkten Technik weit überlegen, da mitunter der Sekundärantikörper an mehrere Epitope des Primärantikörpers anlagern kann. Somit erhält man eine spezifische Farbverstärkung, indem die Enzymkonzentration der Meerrettichperoxidase am betreffenden Antigen deutlich erhöht wird, was wiederum die Sensitivität steigert [83].

Eine weitere Erhöhung der Sensitivität erhält man durch den Einsatz eines biotinylierten Zweitantikörpers anstatt herkömmlich angewandter direkt enzymmarkierter Sekundärantikörper. Diese Technik nutzt die starke Affinität von Avidin, bzw. Streptavidin für das Vitamin Biotin aus. Die sog. Avidin-Biotin-Komplexmethode (ABC-Methode) ist ein mögliches und häufig angewandtes Verfahren der Immunhistochemie. Hierbei wird an Biotin gekoppelte Peroxidase über das Brückenmolekül Avidin an den biotinylierten Sekundärantikörper gebunden. Andererseits kann sich über die multiplen Biotinbindungsstellen des Streptavidins ein Netzwerk aus Streptavidin, Biotin und Meerrettichperoxidase ausbilden, welches an den Zweitantikörper bindet.

Für die vorliegende Studie wurde jedoch die dieser Methode in der Sensitivität noch um das 4- bis 8-fache überlegene „markierte Streptavidin-Biotintechnik“ (labelled streptavidin-biotin technique (LSAB)) gewählt [15, 83]. Dabei ist das Enzym Peroxidase nicht über Biotin als Brückenmolekül an Streptavidin gebunden. Vielmehr ist das Streptavidin an anderer Stelle mit dem Farbkonversionsenzym konjugiert. Dies bedingt, dass an jedem Streptavidinmolekül alle vier Biotinbindungsstellen frei bleiben und es folglich mit erhöhter Wahrscheinlichkeit an den biotinylierten Sekundärantikörper anlagern kann.

Die direkte Methode der Immunperoxidasefärbung

Da, wie eben aufgezeigt, die indirekte Methode der direkten Technik weit überlegen ist, wurde letztere nur am Rande für Kontrollzwecke der Kollagen-Typ-II-Färbung eingesetzt. Es fehlt dabei der verstärkende Effekt durch den Sekundärantikörper. Somit ist eine höhere Konzentration des Primärantikörpers notwendig, um annähernd die Farbintensität der indirekten Methodik zu erreichen. In diesem Hinblick wurde auf die Vorteile der indirekten Methode gegenüber der direkten oben bereits eingegangen.

4.2 Diskussion der einzelnen Färbungen

Nachfolgend werden jeweils die spezielle Färbeprozedur zur Darstellung des jeweiligen Antigens und deren Ergebnisse einer kritischen Betrachtung unterzogen.

4.2.1 Kollagen Typ I

Als kritischer Punkt der Immunhistochemie an Paraffinschnitten ist stets der enzymatische Andauvorgang zur Freilegung der Epitope, an die der Primärantikörper binden soll, zu werten. Die „Standardenzyme“ der Kollagendarstellung sind Hyaluronidase und Pronase [1, 2, 41, 54, 57, 87]. Die hierzu durchgeführten Versuche erbrachten eine starke positive Anfärbung bei Anwendung von Pronase. Das Färbeergebnis konnte durch Hyaluronidase nicht verbessert werden. Abgesehen davon zeigten frühere Versuche aus unserem Labor eine vollständige Entfernung maskierender Proteoglykane aus hyalinem Gelenkknorpel durch Pronase, wohingegen Hyaluronidase auch in hohen Konzentrationen und nach 16-stündiger Inkubationszeit noch Proteoglykane in der Safranin-O-Färbung erkennen ließ.

Zur Kollagen-Typ-I-Darstellung wurde ein polyklonaler Ziege-anti-Mensch-Antikörper verwandt. Verdünnt um den Faktor 1:20 bis 1:40 erwies sich die Färbung als hochspezifisch und sehr sensitiv. Sowohl an der Probe der Polydaktylie (Pr16) als auch an der des fetalen Knies (Pr27) konnten bei der Entwicklung der Methodik alle aus der Literatur bekannten Kollagen I enthaltenden Gewebe mit einer positiven Färbung belegt werden. Tiefrot stellten sich dabei Perichondrium und Sehnen dar, schwächer war das lockere Bindegewebe der Dermis gefärbt. Dies ist ein typisches Phänomen, da die Dichte der Lage von Kollagenmolekülen für die Farbtiefe verantwortlich ist [126]. Weiter färbten sich Knochen, Synovialmembran und Blutgefäße an. Alle genannten Lokalisationen sind in der Literatur weithin bekannt [116, 126, 132]. Frei von Färbung blieben alle Arten von Zellen, wie etwa Epidermis oder Knochenmark. Ebenfalls ungefärbt, bis auf eine sehr dünne oberflächliche Schicht, imponierte der hyaline Gelenkknorpel. Über diese oberflächlich gelegene Kollagen-I-positive Zone wurde in der Literatur, was den Menschen betrifft, bislang noch nicht berichtet. Vielmehr beschrieben Nerlich et al. [84] humanen fetalen Gelenkknorpel als frei von Kollagen I. Dieses trete erst im Zuge von Degenerationserscheinungen in der Knorpelmatrix in Form von punktuellen Ablagerungen auf. Auch von der Mark [132] berichtete bei menschlichem Knorpel nicht über einen derartigen Befund, wohingegen dies bei Gelenkknorpel von Hühnern eine biochemisch und immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesene Tatsache sei. Eine neuere Arbeit von Pfander et al. [93] stellte eine dünne Lage von Kollagen I bei normalem, wie osteoarthrotisch verändertem Kaninchenknorpel fest. Allard et al. zeigten 1990 [4] an 8 menschlichen Knien im Alter von 13 bis 58 Jahren eine keilförmige Gewebsslippe, welche ausgehend von der Synovialis die Knorpeloberfläche bedeckt. Allerdings bestehe diese nur außerhalb der artikulierenden Knorpelfläche. Von der genannten Gewebsslippe setzten sich jedoch fibroblastenförmige Zellen direkt auf die Knorpeloberfläche fort. Diese Zellen schienen dabei zur Knorpelmitte hin kontinuierlich in ihrer Ausprägung abzunehmen. In eben dieser Arbeit wurden keine Untersuchungen zu Kollagenen durchgeführt. Da die Synovialmembran aber reich an Kollagen I ist, kann der vorliegende Sachverhalt einen Hinweis stellen, der das Vorkommen von Kollagen Typ I auf der Knorpeloberfläche greifbar macht. Erhörend für die Spezifität des Befundes ist weiterhin die Tatsache, dass bei der Darstellung von Kollagen II genau der oberflächlichste Anteil des Gelenkknorpels nicht, oder nur schwach im Vergleich zum übrigen Knorpel, angefärbt war.

Es kann festgehalten werden, dass Kollagen Typ I als dünne oberflächliche Schicht in *fetalem Gelenkknorpel* vorkommt. In der vorliegenden Studie war diese Tatsache in allen sieben untersuchten Proben fetaler Kniegelenke nachweisbar.

Weiter konnte derselbe Befund bei 4 von 6 *Polydaktylien* und bei zwei von drei *kindlichen Femurköpfen* gezeigt werden.

Die Abnahme des regelmäßigen Vorkommens mit dem Alter kann durch die Entwicklungsstadien von Chondrozyten erklärt werden. Diese gehen aus sog. Chondroprogenitorzellen, beispielsweise des Perichondriums [100], hervor und sind verständlicherweise während der fetalen Phase als relativ unreife Zellen noch in größerem Ausmaß vorhanden. Eine Eigenart der Chondroprogenitorzelle ist ihre Fähigkeit zur Produktion von Kollagen I, IIA und III [1, 2, 133], welche sie mit Heranreifen zum sog. Stadium-I-Chondrozyten verliert. Der Stadium-I-Chondrozyt, als typischer Chondrozyt des hyalinen Knorpels, bildet Kollagen II, IX und XI [133].

In der Kollagen-I-Darstellung ließen sich keine Unterschiede zwischen der multiplen und der solitären Form von *Exostosen* zeigen. Dass beide Formen histologisch nicht voneinander zu unterscheiden sind, ist in der Literatur hinreichend belegt [39, 42, 95]. Eine Gemeinsamkeit der Exostosen zeigte sich in der positiven Anfärbung für Kollagen Typ I in oberflächlichen Bezirken ihrer Knorpelkappe, die in 13 der 14 Exostosenschnitte, welche Knorpel enthielten, zur Darstellung kam. Ausgehend von diesen fibrös durchbauten Bereichen konnten in 12 der 13 Fälle Septen nachgewiesen werden, welche Kollagen I exprimierten und in die Tiefe des Knorpels zogen. Diese Phänomene, die multiplen wie solitären Osteochondromen zu eigen waren, wurden bislang in der Literatur nie beschrieben. Aigner et al. erwähnten 1997 [2] mesenchymale Zelllagen von faserigem Erscheinungsbild, die das Knorpelgewebe bedecken sollen. Dabei handle es sich aber nicht um Perichondrium im eigentlichen Sinne, sondern um eine eher diffus-faserige Übergangszone zwischen Knorpel und Perichondrium. Aigner et al. charakterisierten die sieben von ihnen untersuchten Osteochondrome nicht bezüglich ihrer Kollagen-I-Expression. Allerdings stellten sie fest, dass in dem genannten fibrösen Bereich und in der obersten Knorpelzone Kollagen II abwesend sei. Die vorliegenden Ergebnisse erweisen sich dazu kongruent, indem sie zeigen, dass vielmehr Kollagen Typ I eine der Hauptkomponenten der oberflächlichen Knorpelzone von Exostosen ist.

Auch dass fibröse Septen die Knorpelkappe von Osteochondromen durchziehen, wurde niemals beschrieben. Da diese aber in der Kollagen-I- und II-Färbung wie auch in der HE-

und Safranin-O-Darstellung nachweisbar waren, kann ihre Existenz als erwiesen betrachtet werden. Ihr fibröser Charakter ist durch das Vorhandensein von Kollagen Typ I festgehalten. Vergleichbar hierzu erscheinen die Ergebnisse von Aigner et al. [1], deren Arbeitsgruppe fibröse, bandartige Strukturen beschrieb, welche knorpelige Lobuli innerhalb von Enchondromen trennen und Kollagen I und III enthalten sollen.

Das Präparat des 42-jährigen Mannes mit multiplen cartilaginären Exostosen besaß eine dicke Knorpelkappe, die praktisch vollständig mit Kollagen Typ I durchbaut war. Daneben kam im gleichen Bereich Kollagen Typ II vor. Dies ist ein charakteristisches Merkmal des Faserknorpels [87, 132]. Beispielsweise wurde von Nerlich et al. 1997 [87] am menschlichen Anulus fibrosus aufgezeigt, dass die Farbintensität bezüglich Kollagen I mit zunehmendem Alter des Individuums ansteige, diejenige der Kollagen-II-Darstellung hingegen sich abschwäche.

Der Knorpel cartilaginärer Exostosen ist allerdings weiterhin als „hyalin“ zu bezeichnen, doch enthält er fibröse Anteile, die sich evtl. im Sinne einer Degeneration mit dem Alter ausweiten können.

4.2.2 Kollagen Typ II

Andauversuche mit Pronase, analog zu Kollagen Typ I, zeigten anhand der Präparate der Polydaktylie (Pr16) und des fetalen Kniegelenks (Pr27) die erwarteten Ergebnisse bezüglich der Verteilung von Kollagen II. Die Knorpelmatrix erwies sich als homogen gefärbt [2, 84, 86]. Zusätzlich imponierten einige Chondrozyten intrazellulär tiefrot. Das Phänomen der intrazytoplasmatischen Färbung bezüglich Kollagen II wurde bereits ausführlich von Ueda [128] anhand von Chondrosarkomen unterschiedlicher Malignität beschrieben. Durch Einsatz von Proteinase K statt Pronase konnte der Befund auch reproduzierbar gemacht werden, stellte sich aber in der qualitativen wie quantitativen Ausprägung als chargenabhängig differierend heraus, was den eingesetzten Primärantikörper betraf. Proteinase K wurde zum ersten Mal als Enzym zur Darstellung von Kollagenen an Paraffinschnitten in der Immunhistochemie eingesetzt. Es erwies sich in der Anwendung als sehr komfortabel, da nur kurze Andauzeiten notwendig waren und die Inkubation bei Raumtemperatur erfolgen konnte im Gegensatz zu Pronase, welche bei 37° C über die doppelte Zeitspanne inkubiert werden musste. Eine weitere diskrete Verstärkung des Färbeergebnisses konnte durch eine zusätzliche Vorbehandlung mit Hyaluronidase erzielt werden.

Der eingesetzte Primärantikörper war ein Ziege-anti-Rind-Antikörper mit Kreuzreaktivität zu humanem Kollagen Typ II. Die Kreuzreaktivität von Kollagen-II-spezifischen Antikörpern zwischen einzelnen Spezies ist eine bekannte Tatsache und beruht auf dem hohen Grad der Homologie der helikalen Domäne [48]. Timpl et al. fanden bereits 1977 [126] eine besonders stark ausgeprägte Kreuzreaktivität zwischen bovinem und humanem Antigen. Dabei sei insbesondere die Interspeziesvariabilität der Aminosäuresequenz wesentlich geringer als die Intraspeziesvariabilität der unterschiedlichen Kollagentypen. Dieser Sachverhalt erklärt mitunter die hohe Spezifität des hier eingesetzten Antikörpers. Weiter seien nach Timpl die antigenen Determinanten von Kollagen und Prokollagen weitgehend gleich. So komme eine gewisse Kreuzreaktivität zwischen Kollagen und Prokollagen zustande. Dies könnte die oben erwähnte intrazytoplasmatische Farbgebung von Chondrozyten bei einer der verwendeten Chargen des Primärantikörpers erklären. Da es sich um einen polyklonalen Antikörper handelte, sollte nicht von einem Chargenartefakt gesprochen werden, sondern vielmehr von erweiterter Chargenreaktivität. Die Spezifität bezüglich extrazellulären Kollagens vom Typ II bleibt dabei vollkommen unbeeinflusst. Vergleiche der Ergebnisse des polyklonalen Ziege-anti-Rind-Antikörpers mit denen eines polyklonalen kombinierten Kaninchen-anti-Mensch/Rind-Antikörpers an denselben Präparaten brachten keinen Unterschied hervor, was experimentell für einen hohen Grad an Spezifität der Färbung spricht. Eine sichtbare Kreuzreaktivität zu Kollagen Typ I war in keinem Falle vorhanden.

Bei einer Verdünnung des Primärantikörpers im Verhältnis 1:20 war ebenfalls eine hohe Sensitivität erzielbar, was sich daran zeigt, dass in sämtlichen Präparaten der Knorpel jeder Zone regelrecht angefärbt zur Darstellung kam. Abgeschwächt war die Farbtiefe lediglich in Knorpelbereichen, die gleichzeitig Kollagen I enthielten. Dies war der Fall in den oberflächlichsten Zellschichten des Gelenkknorpels der fetalen Kniegelenke, der Polydaktylien und in den fibrösen Septen der Exostosen, deren Färbung dadurch einen inhomogenen Charakter erhielt. Somit ergaben die Kollagen-I-Färbung und die Kollagen-II-Darstellung gewissermaßen ein komplementäres Bild, was die Ergebnisse der jeweils anderen Färbung in ihrer Validität bestärkt.

Es kann festgehalten werden, dass *alle Gelenkknorpelarten* eine homogene Färbung aufwiesen. Dieser Befund ist weithin bekannt und wurde z.B. von Nerlich et al. 1992 [84] und 1993 [86] beschrieben. Die Abschwächung in der oberflächlichsten Knorpelzone bei Anwesenheit von Kollagen I wurde hingegen noch nie genannt. Die neu gebildeten

Spongiosabälkchen aus enchondraler Ossifikation hervorgegangenen Knochens enthielten kalzifizierte inselförmige Knorpelreste. Diese exprimierten in intensivem Ausmaß Kollagen Typ II, wie es auch u. a. von der Mark 1981 [132] darstellte und was konsistent mit sämtlichen vorliegenden Präparaten ist.

Zum ersten Mal konnte Kollagen Typ II im Bereich der distalen Endphalanx von *Polydaktylien* nachgewiesen werden. Es kommt in einer subperiostär gelegenen Zellschicht zur Darstellung, die aus osteoblastenähnlichen Zellen besteht und diese als perizellulärer Saum umgibt. In den neu geformten Spongiosabälkchen desselben Bereichs konnten Inseln beobachtet werden, die analog zu den Knorpelresten in der durch enchondrale Ossifikation entstandenen Spongiosa Kollagen II enthielten. Im Unterschied dazu zeigte sich aber ein sehr viel weniger homogenes Farbbild. Das distale Ende der Phalanx distalis besitzt keine Epiphysenfuge. Ob dort trotzdem ein Vorgang aktiver Proliferation und Ossifikation stattfindet, bei dem Kollagen Typ II zur Ausbildung kommt, oder ob es sich lediglich um Reste des Wachstumsprozesses aus der fetalen Veranlagung der Wachstumsfuge handelt, bedarf weiterer Untersuchungen. Insbesondere die inselartigen, inhomogen gefärbten Kollagen II enthaltenden Knorpelreste der Spongiosa sind jedoch durch vollkommen ossifizierte Spongiosa deutlich abgetrennt von der proximal lokalisierten Wachstumsfuge, was einen aktiven Längenwachstumsvorgang auch am distalen Ende nahe legt. Zusätzlich ist darauf hinzuweisen, dass genau im selben Bereich Kollagen Typ X und mittels Safranin-O-Färbung Proteoglykane nachzuweisen waren. Diese Zusammensetzung des Gewebes erinnert stark an jene bei der Kallusbildung nach Frakturen. Dabei komme es zunächst zur Bildung undifferenzierten Mesenchyms, welches durch Knorpel ersetzt werde, woraufhin schließlich auf enchondralem Wege Knochen entstehe. Kollagen I, II und X seien im Kallus nachweisbar. In-situ-Hybridisierung an Ratten erbrachten außerdem den Nachweis für das Vorhandensein von mRNA für Kollagen Typ II und Proteoglykane [21]. Folglich mag die distale Phalanx auch durch enchondrale Ossifikation geformt werden, jedoch unter Abwesenheit einer definierten Epiphysenfuge.

Kollagen II konnte als charakteristisches Strukturprotein hyalinen Knorpels nach Ausarbeitung des speziellen Andauvorgangs in sämtlichen *Exostosen* nachgewiesen werden, wie es beispielsweise von Aigner und Frischholz 1997 beschrieben wurde [2]. Im Falle der alleinigen Anwendung von Proteinase K in einer Konzentration von 0,25 mg/ml (Tris-Puffer; pH 7,5; Raumtemperatur) über einen Zeitraum von 15 Minuten zur Andauung

aller Gelenkknorpelarten wurde Kollagen Typ II optimal demaskiert und kam im gesamten hyalinen Knorpel zur Darstellung. Der Knorpel cartilaginärer Exostosen hingegen war bei Anwendung dieser Methodik nur schwach und unregelmäßig angefärbt. In den tieferen Knorpelschichten war oftmals keine Färbung zu erkennen. Durch Vorverdau mit Hyaluronidase 2 mg/ml (Zitronensäure-Phosphat-Puffer; pH 5,0; 37° C; 30 min), gefolgt von Proteinase K in einer Konzentration von 0,5 mg/ml (Tris-Puffer; pH 7,5; Raumtemperatur) für 30 Minuten konnte Kollagen II auch in sämtlichen Schichttiefen aller Osteochondrome dargestellt werden. Wendete man diese Enzymkombination auf die zu untersuchenden Gelenkknorpelproben an, erhielt man jedoch dasselbe Ergebnis wie unter alleiniger Inkubation mit Proteinase K 0,25 mg/ml für 15 Minuten. Dies legt nahe, dass insbesondere die Zusammensetzung maskierender Proteoglykane in Osteochondromen zu der fetalen, wie postnatalen normalen hyalinen Knorpels differiert. Solomon [113, 114] diskutierte aufgrund des Befundes erhöhter Ausscheidung von sauren Mucopolysacchariden bei Kindern mit multiplen cartilaginären Exostosen bereits 1963 die Möglichkeit einer metabolischen Anomalie im Knorpelstoffwechsel. Er kam jedoch zu dem Schluss, dass wohl eher die vermehrte Gesamtknorpelmasse bei erkrankten Kindern als Hauptursache der erhöhten Produktion von sauren Mucopolysacchariden in Frage komme. Mit Sicherheit bleibt die genaue Zusammensetzung der Glykosaminoglycane und der Proteoglycane cartilaginärer Exostosen abzuklären im Hinblick auf die jüngsten molekularbiologischen Ergebnisse. Danach führen Defekte in den Tumorsuppressorgenen EXT1 und EXT2 zur Alterierung der Heparansulfatbiosynthese [69]. Heparansulfat seinerseits würde jedoch die Diffusion von „Indian hedgehog“ (Ihh) von den Chondrozyten der Wachstumsfuge zum Perichondrium erleichtern [9], was dort die Bildung von PTHrP („Parathyroid hormone-related protein“) induzieren sollte. Hierüber werde mittels eines Rückkopplungsmechanismus die Produktion von Bcl-2, einem antiapoptotisch wirksamen Protein, in den Knorpelzellen der Proliferationszone reguliert [69, 77]. Die Wirkung von Ihh werde über sog. BMPs (bone morphogenetic proteins), Mitglieder der TGF- β -Familie und deren zugehörigen BMP-Rezeptoren (BMPR) vermittelt [117]. Da der Regelkreis aus Ihh, PTHrP und Bcl-2 jedoch nur eine Erklärung für das longitudinale Wachstum von Röhrenknochen ist, bleibt weiter ungeklärt, wie die Pathogenese cartilaginärer Exostosen vonstatten geht.

Im Unterschied zu den untersuchten Gelenkknorpelarten zeigte sich bezüglich des Kollagens Typ II bei Osteochondromen ein inhomogeneres Färbemuster. Hingegen ließen

sich keine Unterschiede zwischen solitären und multiplen Exostosen erkennen. In beiden Fällen konnte die fibröse Septierung durch Abschwächung der Farbgebung an den Orten starker Kollagen-I-Färbung bekräftigt werden, was auch für die Inhomogenität der Färbung verantwortlich zeichnet. Dass der Befund der Septierung in der Kollagen-I- und der Kollagen-II-Färbung einander in vier Fällen nicht in aller Deutlichkeit entsprachen und beide immunhistochemischen Methoden von der Safranin-O- und der HE-Darstellung leicht abwichen, ist durch mögliche Unterschiede der Sensitivitäten zu erklären. Aigner et al. beschrieben 1997 in zwei Veröffentlichungen [1, 2] Kollagen-II-Färbungen an Enchondromen, die durch Konglomerate von Knorpeläppchen gekennzeichnet seien. Dabei geben sie jedoch nur an, dass immunhistochemisch der Knorpel bezüglich Kollagen II stark angefärbt sei, ohne weiter auf die Lobulierung einzugehen.

In sämtlichen Präparaten, die Knorpel enthielten, waren inselförmige Knorpelreste in der Spongiosa nachzuweisen, wie es nach von der Mark [132] für wachsende Röhrenknochen typisch sei. Es ist aber zu beachten, dass sie sich auch in den postpubertären Proben von Exostosen fanden. Huvos [42] berichtete über dieselben mikroskopisch sichtbaren Foci von Knorpelresiduen, die bis ins Erwachsenenalter bestehen blieben. Dies legt den Gedanken nahe, dass Osteochondrome möglicherweise das Potential des Wachstums noch über den Zeitpunkt des Schlusses der Epiphysenfugen hinaus beibehalten können. Allerdings verlieren cartilaginäre Exostosen nach allen bisherigen Untersuchungen mit Beendigung des Längenwachstums ihre Fähigkeit zur enchondralen Größenzunahme [106, 114]. Porter und Simpson [95] räumten ein, dass gelegentlich auch noch im Erwachsenenalter eine Vergrößerung insbesondere jedoch der Knorpelkappe stattfindet, die nicht zwangsläufig in der Ausbildung eines Chondrosarkoms enden müsse. Dabei sei das Osteochondrom an sich als Präneoplasie zu bezeichnen, welche in einem Allel eines EXT-Genes eine Keimbahnmutation besitze und im zweiten eine somatische. Ein Wachstum der Knorpelkappe würde ermöglicht durch eine weitere, bislang unbekannte genetische Anomalie, woraus ein sog. „neoplastisches Osteochondrom“ hervorgehe. Über Deletionen auf den Chromosomen 3q oder 10q, oder durch p53-Gen-Inaktivierung könne daraufhin ein Chondrosarkom entstehen. Dabei handelt es sich um einen Analogieschluss zu der seit langem bekannten und gut charakterisierten Adenom-Karzinom-Sequenz bei kolorektalen Karzinomen. Diese Theorie würde aber nur ein Wachstum allein der Knorpelkappe erklären und rechtfertigt nicht die Annahme fortgesetzter enchondraler Ossifikation nach Epiphysenfugenschluss. Somit sind die kalzifizierten Knorpelinseln in der Spongiosa als Reste zu betrachten, die nicht auf einen aktiven Wachstumsvorgang schließen lassen,

besonders da sich für keines der Präparate die Indikation zur Resektion aus einer beobachteten Vergrößerung ergab. Diese könnte nämlich nach einhelliger Meinung der Literatur ein Hinweis auf maligne Transformation sein [32, 42, 50, 88, 95, 106, 113]. Auch die Negativität der Chondrozytenkerne in der Färbung gegen Ki-67 unterstützt die Annahme eines abgeschlossenen Wachstums der postpubertären cartilaginären Exostosen. Auffällig war hingegen die Morphologie der Knorpelreste der Spongiosabälkchen in der Färbung für Kollagen II, X und in der Proteoglykandarstellung durch Safranin-O. Unterhalb der fetalen und postnatalen Wachstumsfugen waren die Inseln homogen gefärbt und enthielten lediglich kalzifizierten Knorpel und sehr selten in direkter Epiphysenfugennähe noch einige Reste hypertropher Chondrozyten. Bei den Osteochondromen hingegen war dies eher die Regel als die Ausnahme. In 9 der 14 Knorpel aufweisenden Exostosen konnten in der Spongiosa eingeschlossene hypertrophe Chondrozyten mitunter noch weit entfernt von der eigentlichen Wachstumsfuge gefunden werden.

4.2.3. Kollagen Typ X

Zur Entwicklung des Andauvorgangs zur Kollagen-X-Darstellung diente wiederum das Resektat der Polydaktylie des 8 Tage alten Jungen (Pr16). Die Standardenzyme Pronase und Hyaluronidase [1, 2, 34, 41, 54] zeigten durchweg negative Ergebnisse. Die erwartete Matrixfärbung der Knorpel-Knochen-Übergangszone wurde durch den Einsatz von Hyaluronidase 2 mg/ml (Zitronensäure-Phosphat-Puffer; pH 5,0; 37°C; 30 min), gefolgt von Pepsin 0,1 % (Essigssäure 0,5 M; 37°C; 60 min) erreicht. Da die Probe des fetalen Kniegelenks (Pr27), wie auch im späteren Verlauf der Untersuchungen einige Exostosen, nur eine sehr schwache Färbung aufwies, wurde der Schritt der Hyaluronidaseinkubation durch Proteinase K 0,5 mg/ml (Tris-Puffer; pH7,5; Raumtemperatur; 35 min) ersetzt, jedoch der folgende Pepsinverdau beibehalten. Diese Kombination wurde in der Literatur noch nicht beschrieben, erbrachte aber an Paraffinschnitten eine wesentlich verbesserte Sensitivität bei gleichbleibend hoher Spezifität. Das bedeutet, dass die eben genannte Probe der Polydaktylie (Pr16) unter Hyaluronidase-Pepsin-Behandlung denselben Aspekt aufwies wie unter Proteinase K-Pepsin-Anwendung. Insbesondere die Präparate fetalen Gewebes und die der cartilaginären Exostosen zeigten hingegen eine intensivere und weit ausgedehntere Färbung der für Kollagen X zu erwartenden Knorpelareale.

Der verwendete Primärantikörper war ein monoklonaler Maus-anti-Mensch-Antikörper, der an humanem, rekombinantem Kollagen Typ X (hrKolX) entwickelt wurde. Es handelt sich um den Klon X53, der nach Girkontaite et al. [34] im ELISA praktisch gleich gut mit nativem, hitzedenaturiertem und pepsinverdaulichem humanem, rekombinanten Kollagen X reagiert. Auch sei eine etwa um zwei Größenordnungen geringere Reaktion mit der alleinigen globulären NC-1-Domäne des Kollagens Typ X im ELISA zu verzeichnen. Es bestehe keinerlei Kreuzreaktion zu Kollagen Typ I und II. Auch im Western Blot reagiere der Klon X53 stark mit nativem, wie mit pepsinverdaulichem hrKolX. Testungen des Antikörpers an fetalen Proben der 24. SSW durch Girkontaite et al. [34] zeigten eine positive Färbung in tiefen Bereichen der Matrix hypertrophen Knorpels von Wachstumsfugen, die sich auf den kalzifizierten Knorpelkern enchondral formierter Spongiosatrabel fortsetze. Dieses Ergebnis ist durchweg konsistent mit anderen immunhistochemischen Untersuchungen [2, 84] wie auch mit Versuchen zur in-situ-Hybridisierung [1, 2, 41, 100]. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass der hier verwendete, gegen humanes, rekombinantes Kollagen X gerichtete Antikörper auch hochspezifisch an natives Kollagen X bindet, ohne eine Kreuzreaktivität zu den anderen untersuchten Kollagentypen zu besitzen.

Durch die geringe Verdünnung des Primärantikörpers im Verhältnis 1:10 wurde eine sehr hohe Sensitivität erreicht, wodurch in sämtlichen untersuchten Präparaten, bis auf das Kniegelenksresektat des 9-jährigen Jungen, Kollagen Typ X nachgewiesen werden konnte. Die Wachstumsfugen des distalen Femurs und der proximalen Tibia *fetaler Kniegelenke* zeigten ein charakteristisches Muster, das durch die Zunahme positiver Areale für Kollagen X mit zunehmendem Gestationsalter gekennzeichnet war. Dabei trat Kollagen X bei der Probe des Feten der 16. SSW ausschließlich in der Peripherie der Epiphysenfuge auf. Die Präparate älterer Feten zeigten Kollagen X zusätzlich in der Umgebung von gefäßführenden Knorpelkanälen, welche die Wachstumsfuge durchdrangen. Von diesen beiden Orten ausgehend konnte schließlich am Schnitt des weiblichen Feten der 23. SSW eine Färbung der territorialen, wie der interterritorialen Matrix über praktisch die gesamte Ausdehnung der Wachstumsfuge, mit stärkerer Betonung in der Peripherie und im Bereich der Knorpelkanäle, gezeigt werden. Die Zunahme der Intensität der Kollagen-X-Färbung mit steigendem Gestationsalter wurde von Nerlich et al. 1992 [84] erwähnt. In dieser Studie wurden 15 Feten der 12. bis 40. SSW untersucht, wobei auf die genaue Altersverteilung und den Umfang der Intensivierung der Färbung leider nicht eingegangen wird. Das festgestellte Verteilungsmuster mit starker Färbung in der Peripherie und in der

Umgebung von Blutgefäßen, die die Epiphysenfuge penetrieren, wurde von Thomas M. Schmid (Professor für Biochemie, Rush Medical College, Chicago, USA) nach eigenen Ergebnissen in einer persönlichen Mitteilung bestätigt. Er gibt mitunter an, dass möglicherweise Kalziumionen unter einer gerade neu formierten Knochenschicht, welche die Wachstumsfuge umgibt, verantwortlich sein könnten für die Initiierung der Synthese von Kollagen Typ X. Ähnliches möge auch für die Knorpelkanäle gelten, wobei die Färbung der Matrix oftmals aufträte, wenn das Blutgefäß eben außerhalb der Schnittebene liege. Dieses Phänomen konnte regelmäßig in den untersuchten Präparaten nachgewiesen werden. Dass das Präparat des jüngsten Feten (Pr26, 16. SSW) insgesamt wenig Kollagen X erkennen ließ, deckt sich außerdem mit der Erkenntnis, dass Kollagen vom Typ X ein entwicklungsabhängig kontrollierter Knorpelbestandteil sei, der sich nicht in ruhendem und auch nicht in sehr schnell wachsendem Knorpel finde [121]. Dazu sei auf die besonders hohe Zelldichte in eben diesem Präparat hingewiesen, das zudem mit 40,5 % die höchste Wachstumsfraktion der Ki-67-Darstellung im Epiphysenknorpel besaß. Die Wachstumsfuge befand sich zu diesem Gestationsalter erst in Ausbildung und hatte noch nicht ihre definitive hochorganisierte Struktur erhalten, was nach Rodriguez et al. 1992 der regelrechten Entwicklung entspreche [102]. Die Wachstumsfraktion der Epiphysenfuge selbst wies große lokale Schwankungen zwischen 30 und 45 % auf und hypertrophe Knorpelzellen waren erst im Ansatz zu erkennen, ohne dass sie das typische ballonierete Muster des Blasenknorpels zeigten. Auch in Knorpelresten der neu formierten Spongiosatrabel trat Kollagen X auf [2, 34, 84]. Allerdings variierte die Intensität mit der Stärke der Farbgebung des zugehörigen Epiphysenfugenknorpels. D.h., die Farbgebung der Knorpelreste im Knochen unterhalb peripherer Gebiete und unterhalb penetrierender Blutgefäße war stärker als in den dazwischen liegenden Arealen.

Bei den Präparaten der *Polydaktylien* ließ sich bezüglich des Kollagen-X-Gehalts im Gegensatz zu den fetalen Proben keine Korrelation zum Alter des jeweiligen Patienten feststellen. Auch ließ sich kein Zusammenhang finden zwischen der Ausdehnung des für Kollagen X positiven Bereichs und der durch Ki-67-Antikörper ermittelten Wachstumsfraktion. Morphologisch betrachtet fiel jedoch ins Auge, dass drei Präparate (Pr18, Pr19, Pr20) in der Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun eine ausgeprägte Verkalkung des Knorpels an der Knorpel-Knochen-Übergangszone mit gut sichtbarer Tidemark aufwiesen. Genau in diesen Präparaten konnten nur kleine Matrixareale gefunden werden, die für Kollagen Typ X positiv färbten. Die übrigen 3 Proben hingegen

(Pr16, Pr17, Pr21) erbrachten das bekannte Muster, bei dem Kollagen X in der interterritorialen Matrix hypertropher Chondrozyten zur Darstellung kommt, mit einer Verstärkung im perizellulären Bereich. Grundsätzlich sei das Bild laut Nerlich et al. [84] in fetalem und juvenilem Knorpelgewebe dasselbe. In ihrer Studie untersuchten sie dazu 8 Femurkopfresektate von Kindern mit einem Alter von 12 Tagen bis zu 16 Jahren. Demnach sollen die Kollagen X enthaltenden Areale mit zunehmendem Alter eine eher irreguläre Verteilung annehmen, die teils zu einem fleckigen Aspekt führe. Dieses Phänomen sei mit dem Eindruck einer zunehmenden „Degeneration“ der Epiphyse in Einklang zu bringen. Eine derart irreguläre Verteilung des Kollagens Typ X in der Hypertrophiezone der Wachstumsfuge konnte in deutlicher Ausprägung an den vorliegenden Polydaktylien gezeigt werden. Dabei ist selbstverständlich zu beachten, dass die Sammlung von Proben der Polydaktylien eine heterogene Gruppe bildete, die sich teilweise durch eine ossäre Verbindung zum Hand- oder Fußskelett, teilweise durch eine lediglich bindegewebig-kutane auszeichnete. Diesbezüglich konnte aber keine Korrelation zu ihrem Färbeverhalten in allen durchgeführten Untersuchungen gefunden werden. In Analogie zu den Befunden der Kollagen-II- und Safranin-O-Färbung konnte Kollagen Typ X zum ersten Mal perizellulär um osteoblastenähnliche Zellen des subperiostären Bindegewebes im Bereich der distalen Endphalanx nachgewiesen werden. Kollagen X fand sich außerdem parallel zu Kollagen II in den Knorpelinseln der distal gelegenen Spongiosa, abgetrennt durch ein vollständig verknöchertes Spongiosaareal von den neu formierten sekundären Trabekeln der proximal gelegenen Wachstumsfuge. Als Unterscheidungsmerkmal der vermuteten unterschiedlichen Herkunft dieser Knorpelinseln kann deren Morphologie dienen, die distal eher inhomogen-schlierenartig imponierte, proximal hingegen hoch homogen. Das Vorkommen von Kollagen X weist nun wiederum auf den Vorgang enchondraler Ossifikation hin, welcher an der Spitze der Endphalanx ohne das Auftreten einer Wachstumsfuge stattzufinden schien, sondern vielmehr im Sinne der Kallusbildung nach Knochenfrakturen [21, 41, 120, 121]. Da dieser Befund hiermit erstmalig an der Polydaktylie, einer skelettalen Missbildung, erhoben wurde, bliebe es interessant, die Verteilung von Kollagen Typ II, X und der Proteoglykane an Serienschnitten normaler Fingerendglieder zu untersuchen, um den vorliegenden Ergebnissen weiter Substanz zu verleihen.

Repräsentativ für die postnatale Wachstumsfuge ohne jegliche pathologische Abnormität wurde das *Femurkopfpräparat* eines 1 ½-jährigen Kindes (Pr22) gegen Kollagen X

gefärbt. Die Zone hypertrophen Knorpels der Epiphysenfuge sowie die Knorpelreste neu formierten spongiösen Knochens erbrachten ein stark positives Bild für Kollagen X in der knorpeligen Matrix, wie es in der Literatur weitreichend belegt ist [2, 34, 53, 84, 85]. Das vorliegende Präparat war das einzige in der Färbeserie für Kollagen Typ X, das ein sekundäres Ossifikationszentrum besaß. Dieses zeigte sich umrahmt von lakunären Formationen hypertrophen Knorpels, den Resten der virtuell sphärischen Wachstumsfuge [47]. Auch dort war Kollagen X charakteristischerweise vorzufinden [29, 108, 120], jedoch in insgesamt schwächerer Ausprägung, was mit Experimenten zur in-situ-Hybridisierung von Reichenberger et al. 1991 [100] vereinbar ist. Die exakte Übereinstimmung der Ergebnisse mit den Angaben aus der Literatur unterstreicht die Validität der Färbung der übrigen Entitäten und rechtfertigt das Aussetzen weiterer Untersuchungen zu den beiden restlichen vorliegenden postnatal gewonnenen Femurköpfen, besonders da sich die Kollagen-X-Färbung als sehr kostenintensiv erwiesen hatte. Dass das Resektat aus dem Kniegelenk des 9 Jahre alten Jungen, gewonnen bei einer Epiphyseodese, negativ bezüglich Kollagen X war, ist durch seine laterale Lage, seine geringe Größe und durch das Fehlen hypertropher Chondrozyten hinreichend zu erklären.

Alle bislang genannten charakteristischen Eigenschaften konnten auch an den untersuchten *Osteochondromen* nachgewiesen werden. Kollagen X war ausschließlich in den tiefen Knorpelschichten vorzufinden sowie in den Knorpelresten sekundärer Spongiosatrabel [2]. Keine Färbung trat in oberflächlichen Knorpelarealen auf, wie es auch für normalen Gelenkknorpel adulten menschlichen Gewebes von Rucklidge 1996 [105] beschrieben wurde. Allerdings war Kollagen Typ X in allen Exostosen anzutreffen, wenngleich in unterschiedlicher Ausprägung. Dabei war keine Korrelation zum Alter des Trägers noch zur Ausprägungsform, handle es sich um solitäre oder multiple Osteochondrome, zu erkennen. Neun Exostosen, die Knorpel enthielten, besaßen über größere Areale interterritorial gelegenes Kollagen X. Dabei erstreckte sich die Färbung in fünf der Fälle (Pr3, Pr4, Pr7, Pr8, Pr11) bandartig über einen Großteil der Spanne der Knorpel-Knochen-Übergangszone. Vier Osteochondrome (Pr1, Pr6, Pr10, Pr12) zeigten dies nur stellenweise. Trat Kollagen X, wie in vier weiteren Fällen (Pr2, Pr9, Pr13, Pr14), in geringerer Ausprägung auf, so zeigte es sich perizellulär um Chondrozyten der tiefen Knorpelzone angeordnet, ohne dass größere Anteile der interterritorialen Matrix gefärbt waren. Insbesondere ausschließlich perizelluläre Färbung war für das Präparat der solitären Exostose des 23-jährigen Mannes (Pr14) zu verzeichnen, bei dem praktisch alle

Chondrozyten der tiefen Knorpelzone von einem Kollagen Typ X enthaltenden Ring umgeben waren, was den Eindruck eines „streuselkuchenartigen“ Aspekts entstehen ließ.

Dass Kollagen X verstärkt perizellulär vorzufinden war, in der interterritorialen Matrix dagegen meist als etwas schwächere, homogene Färbung imponierte, ist mit der besonders zu hervorhebenden Diffusionsfähigkeit des Moleküls zu erklären [29, 34].

Bemerkenswert ist auch, dass Kollagen Typ X in postpubertärem Osteochondromgewebe deutlich zur Darstellung kam. Im Präparat der 28 Jahre alten Frau (Pr5) mit multiplen Exostosen entfiel die Färbung zwar, da kein Anschnitt mit einem Knorpelanteil gewonnen werden konnte, doch das Resektat des 42-jährigen Patienten (Pr6), der an der Erbkrankheit litt, zeigte in eindrucksvoller Weise großflächige positive Areale in Kombination mit perizellulärem Muster. Chondrozyten, die in ihrer direkten, territorialen Umgebung für Kollagen X anfärbten, konnten dabei in positiven Matrixarealen sowie alleinstehend gefunden werden, wobei das Bild an das „streuselkuchenartig“ gefärbte Präparat (Pr14, SCE, 23 Jahre, m) erinnerte. Es fiel auf, dass der Schnitt des 42-jährigen Mannes (Pr6, MCE) und das Präparat der 26-jährigen Frau (Pr15, SCE) eine gut ausgeprägte Tidemark erkennen ließen, die die Grenze für die Kollagen-X-Färbung darstellte. Eerola et al. zeigten 1998 [29] Ähnliches an Mäusen. Genau denselben Sachverhalt zitierten Girkontaite et al. 1996 [34] wiederum für menschlichen Gelenkknorpel Erwachsener. Mangels Probenmaterial konnte dazu leider kein normales Gewebe aus einer vergleichbaren Altersgruppe untersucht werden. Dass Kollagen Typ X allerdings auch in adultem Gewebe zu finden ist und dort wahrscheinlich nicht nur seit juvenilem Alter persistiere, sondern fortlaufend neu gebildet werde, wurde von Aigner et al. 1998 [3] an Deckplatten menschlicher Wirbelkörper aller Altersklassen gezeigt.

Richtete man das Augenmerk auf die Knorpelreste enthaltenden Spongiosabälkchen, so konnte auch dort Kollagen Typ X nachgewiesen werden, sofern auch der darüber gelegene Knorpel positiv gefärbt war. Auch in diesen Fällen trat Kollagen X zusammen mit Kollagen Typ II und Proteoglykanen auf [2]. Die Morphologie der Knorpelinseln unterschied sich dabei deutlich, wie bereits beschrieben, von den anderen Entitäten durch den hohen Gehalt an hypertrophen Knorpelzellen, die von neu gebildetem Knochen umgeben waren und teils bis tief in den Markraum persistierten. Reichenberger et al. [100] konnten von Kollagen X eingeschlossene Chondrozyten in genannten Knorpelresten an fetalen Wachstumsfugen nur nahe bzw. in der Eröffnungszone finden, was auch mit den Erkenntnissen unserer Studie in Einklang steht.

Das heterogene Bild der Verteilung von Kollagen Typ X unter den Exostosen im Vergleich zu fetalen Wachstumsfugen, sowohl nach den hier gewonnen Ergebnissen, wie auch nach Angaben aus der Literatur [54, 84, 100] ist vereinbar mit der Tatsache, dass die enchondrale Ossifikation bei Exostosen ungeordneter vonstatten geht [42] als bei regulärem Knochenwachstum.

4.2.3 Ki-67

Um Immunreaktivität bezüglich des proliferationsassoziierten Kernproteins Ki-67 an Paraffinschnitten zu erreichen, war keine enzymatische Vorbehandlung der Schnitte notwendig, jedoch ein Erhitzen in 0,01 M Zitronensäure-Zitratpuffer, pH6,0, wie es in der einschlägigen Literatur beschrieben wird [22, 27, 37, 115]. Alle zitierten Autoren verwendeten zum Erhitzen Mikrowellengeräte unterschiedlicher Leistung und Ausstattung. Um aber den einzelnen Färbereihen maximale Reproduzierbarkeit zu verleihen, wurde in der vorliegenden Studie ein herkömmliches Wasserbad benutzt, in das die verschlossenen Küvetten eingebracht werden konnten, um so eine konstante Puffertemperatur und -konzentration zu gewährleisten. Dies war bei Einsatz des Temperaturfühlers unseres Mikrowellengerätes nicht möglich, da die offenen Küvetten eine erhebliche Verdampfung zuließen. Cattoretti et al. [22] und Davis et al. [27] bemerkten, dass aus selbigem Grund der Puffer regelmäßig mit Wasser aufzufüllen sei, um dem Verdampfen der Flüssigkeit Rechnung zu tragen. Dass sich dadurch wiederum beträchtliche Temperaturschwankungen ergeben können, bleibt unbeachtet. Versuche, die die Ergebnisse der im Wasserbad vorbehandelten Schnitte und derer im Mikrowellengerät erhitzten, verglichen, erbrachten zwar keine signifikanten Unterschiede, doch fiel die Entscheidung wegen der Einfachheit der Methode und ihrer überragenden Praktikabilität auf die Verwendung des Wasserbades. Es bleibt anzumerken, dass die Inkubationszeit eine wesentliche Rolle bei der Auswertung der Ergebnisse spielte. Kurze Inkubationszeiten von 10 bzw. 20 Minuten ließen eine hochspezifische Kernfärbung bei sehr geringer Sensitivität erkennen. Verlängerte man die Zeit, kamen mehr Kerne zur positiven Darstellung, doch nahm auch die unspezifische Färbung v.a. von Epithelzellen zu, deren Zytoplasma verstärkt positiv reagierte. Diese Tatsache wurde schon von Apte 1990 [5] und Cattoretti 1992 [22] beschrieben. Die Beurteilbarkeit der Proben werde dadurch aber in keiner Weise beeinflusst. Problematischer gestaltete sich dagegen, dass mit zunehmender Dauer der Hitzeeinwirkung die Spezifität der Untersuchung in der Form abnahm, dass sehr viele Kerne einen leichten rötlichen Farbton annahmen. Daher wurde eine Zählung vorgenommen, die nur Kerne als

positiv wertete, die tiefrot und scharf begrenzt waren. Inkubationszeiten zwischen 10 und 50 Minuten zeigten einen praktisch gleich bleibenden Wert der Wachstumsfraktion für die Probe eines fetalen Kniegelenks ab 30 Minuten. Da die Sensitivität bei geringfügiger Verkürzung der Zeit jedoch rapide abnahm, wurde die Inkubationszeit auf 35 Minuten bei gerade nicht kochendem Wasserbad festgelegt. Es ist zu beachten, dass freilich auch die Mikroskopeinstellung die Zählung beeinflussen konnte. Daher wurde die Vergrößerung auf 1,25x25 bei maximaler Beleuchtung und maximal geöffneten Blenden festgelegt.

Der verwendete Antikörper war ein monoklonaler Maus-anti-Ki-67-Antikörper vom Klon Ki-S5, der nach Herstellerangaben identisch reagiert mit dem Muster des Ki-67 Antigens, das im Immunoblot zwei zellzyklusassoziierte Banden von 345 kDa und 395 kDa zeigt [22]. Der Antikörper bindet an ein formalinresistentes Epitop des Ki-67-Antigens und stellt somit den Antikörper der Wahl dar, der in einer Verdünnung von 1:25 optimal an unseren Paraffinschnitten reagierte.

Zur Ermittlung der Wachstumsfraktion des Knorpels *fetaler Kniegelenke* wurden sowohl in der Proliferationszone der proximalen Tibia als auch im restlichen Epiphysenknorpel jeweils zwischen 819 und 1310 Zellen gezählt. Eine Zählung von 1000 Zellen wurde von Vollmer [130] und Hall [37] propagiert. Nach Scotlandi [109] sollten mindestens 500 Zellen ausgezählt werden, Davis [27] spricht sich für eine Anzahl zwischen 500 und 1000 aus. Es sei wichtig, zur Feststellung der Proliferation eines definierten Gewebes zwischen Subpopulationen von Zellen zu unterscheiden [37]. Dementsprechend erfolgte die Zählung der Zellkerne getrennt für die Zone des Säulenknorpels, die augenscheinlich die höchste Wachstumsfraktion besaß, und für den zentralen Knorpel der Epiphyse, wobei Areale in der Umgebung von Blutgefäßen nicht ausgezählt wurden. Die Wachstumsfraktion der Präparate der 16. bis 23. SSW lag in der Wachstumsfuge zwischen 38 und 53 %, in der Epiphyse zwischen 22 und 41 %. Das arithmetische Mittel berechnet sich so für die Proliferationszone der Wachstumsfuge auf gerundet 47 %, für die Epiphyse auf 29 %. Zieht man allerdings in Betracht, dass sich das Präparat des weiblichen Feten der 16. SSW (Pr26) in seiner Morphologie stark von den übrigen Schnitten unterschied, erhielt man für die Präparate der 19. bis 23. SSW Werte mit wesentlich geringerer Schwankungsbreite, die sich im Falle der Proliferationszone auf 44 bis 53 % beliefen und im Falle des Epiphysenknorpels auf 22 bis 32 %. Dies bedeutet eine Schwankungsbreite von maximal 10 Prozentpunkten in beiden Fällen, was gut mit dem Eindruck der mikroskopischen Übersicht zu vereinbaren ist, bei dem nur geringfügige Unterschiede zwischen den

betreffenden Präparaten auffielen. Apte fand 1990 [5] mittels Ki-67 in der Proliferationszone des distalen Femurs eines 5 Tage alten Kaninchens eine Wachstumsfraktion von 52,77 % und stellte fest, dass vergleichbares humanes, fetales Gewebe der 16. bis 18. Gestationswoche einen ähnlichen Wert erbringen müsse, nannte jedoch keine weiteren ausgewerteten Zahlen. 1992 trafen Apte und Athanasou [6] die Aussage, dass sich die Wachstumsfraktion der Proliferationszone humanen fetalen Epiphysenfugenknorpels zwischen 40 und 50 % bewege, was in Einklang mit den hier gewonnenen Ergebnissen steht. Gesonderte Beachtung soll noch einmal das Präparat des weiblichen Feten der 16. SSW (Pr26) finden. Es war die einzige Probe, bei der die Wachstumsfraktion der Proliferationszone (38 %) geringer war als die der Epiphysenmitte (41 %). Dass die beiden Werte aber sehr nahe beieinander liegen, scheint keineswegs Zufall zu sein. Vielmehr konnte die Wachstumsfuge im insgesamt sehr zellreichen Knorpelgewebe erst im Ansatz ermittelt werden und war schwer abzugrenzen. Dieser Befund stimmt mit der morphologischen Beschreibung von Rodriguez et al. [102] überein. Demnach entstehe die Epiphysenfuge erst nach und nach aus hochzellulärem Gewebe und bilde zwischen der 11. und 16. SSW nur ansatzweise Zellsäulen aus. Auch dass die Proliferationszone des Präparats lokal sehr unterschiedliche Wachstumsfraktionen zwischen 30 und 45 % aufwies, passt in dieses Bild. Bekannt ist dieses Phänomen der Ki-67-Färbung beispielsweise auch von malignen Osteosarkomen, welche herdförmig sehr unterschiedlich proliferieren können [115]. Die Hypertrophiezone der Wachstumsfuge war in allen Fällen negativ für Ki-67, wie es auch Apte 1990 [5] beschrieb. Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse mit den Angaben aus der Literatur kann als Merkmal der Reliabilität und Validität aller Ergebnisse bezüglich der Ki-67-Darstellung gewertet werden, besonders da Apte [5] seine Ergebnisse durch Markierung mit [³H]TdR in vivo an Kaninchen unterstreicht.

Für die Wachstumsfraktionen des Knorpels von *Polydaktylien* liegen in der Literatur bislang keinerlei Angaben vor. Augenscheinlich lagen diese jedoch wesentlich niedriger als in den fetalen Proben, auch wenn in Kauf genommen werden musste, dass aufgrund der geringeren Präparatgröße in vier der sechs Fälle die auswertbare Zellzahl der gesamten Proliferationszone auf unter 500 eingeschränkt war. Eine statistisch repräsentative Aussage kann daher nicht getroffen werden, allerdings ist eine deutliche Tendenz festzustellen: Bei fünf Präparaten lag die Wachstumsfraktion der Proliferationszone zwischen 1 und 6 %, die gezählte Zellzahl bewegte sich dabei zwischen 290 und 1120 Zellen. Das sechste Präparat,

ein Resektat eines 10 Monate alten Mädchens (Pr21), wies im selben Bereich eine Wachstumsfraktion von gerundet 14 % auf bei einer auswertbaren Zellzahl von 620 Chondrozyten. Die hohe Proliferation mag ihre Begründung darin finden, dass es sich bei diesem Mädchen um eine beidseitige Hexadaktylie der Füße handelte und nicht um eine einseitige Fehlanlage wie in den übrigen Fällen. Es ist anzunehmen, dass bei diesem Kind bereits die genetische Anlage in ihrer Ausprägung stärker war als bei den anderen und somit möglicherweise das Wachstum der jeweils 6. Zehe dem Gesamtlängenwachstum des Mädchens angepasst war. Dafür könnte eine vorliegende Fotografie des linken Fußes sprechen (nicht abgebildet), auf der die Zehen im 7. Lebensmonat allesamt in einem angemessenen Verhältnis zueinander standen, wobei nach den radiologischen Befunden eine Metatarsalgabel des 5. Strahls vorlag. Der restliche Epiphysenknorpel dagegen besaß unter allen Polydaktylien eine Wachstumsfraktion <1 %. Dazu konnten stets mehrere tausend Zellen ausgezählt werden. Eine Korrelation zum Alter der Patienten war nicht festzustellen, ebenso nicht zum Vorhandensein einer Tidemark wie bei Kollagen Typ X. Daraus ergibt sich, dass auch keine Korrelation zwischen der Wachstumsfraktion und dem Ausmaß vorhandenen Kollagens Typ X zu finden war.

Der weiteren Untersuchung standen 3 *Femurköpfe* von Kindern zwischen 1 ½ und 8 Jahren zur Verfügung. An zweien waren jedoch entkalkungsbedingte Schäden der Kernmorphologie nachzuweisen, die eine Kernfärbung unmöglich machten. Lediglich der Schnitt des 1 ½-jährigen Kindes (Pr22) wurde daher der Ki-67-Darstellung zugeführt. Es zeigte sich keine Proliferation, die anhand des Antikörpers nachweisbar war. Der Grund hierfür mag einerseits ebenfalls eine entkalkungsbedingte Schädigung sein, doch ist zu beachten, dass auch Davis et al. [27] für normalen Gelenkknorpel an 10 Femurköpfen keine signifikante Färbung bezüglich Ki-67 feststellten. Welchen Altersgruppen die Femurkopfresektate zuzuordnen seien, wird dabei leider nicht erwähnt. Das Kniegelenkspräparat des 9 Jahre alten Jungen (Pr25) wies nur einige hundert Chondrozyten auf, von denen sehr wenige in säulenartiger Formation anzutreffen waren. Die Wachstumsfuge war daher nur angedeutet, zumal kein hypertropher Knorpel zu finden war. Wie bereits in der Kollagen-X-Färbung blieb es negativ für Ki-67. Da weitere Studien zu normalem Gelenkknorpel in der Literatur nicht vorliegen, bleibt zu fordern, dass humaner, juveniler Knorpel großer Gelenke, wie etwa der Hüfte oder des Knies noch bezüglich Ki-67 systematisch zu charakterisieren ist.

Die Wachstumsfraktionen der einzelnen *Osteochondrome* waren sehr unterschiedlich. Sie lagen in einem Bereich zwischen 0 und 10 %, sofern man den gesamten Knorpel, den die Präparate besaßen, betrachtete. Wenn eine ausgeprägte Proliferationszone vorhanden war, konnten dort Werte bis zu 20 % (Pr7, 7 Jahre, w, SCE) ermittelt werden. Eine vergleichbare Aussage zu der großen Schwankungsbreite von Wachstumsfraktionen bei Knorpel-/Knochentumoren findet man in einer Arbeit von Stenzel et al. (1996) [115]. Dabei wurde für das hochmaligne zentrale Osteosarkom eine durchschnittliche Wachstumsfraktion von 29,2 % beschrieben. Es wurden aber auch Areale gefunden, in denen bis zu 80 % der Zellen für Ki-67 positiv waren.

Das arithmetische Mittel der Proliferationsfraktion für alle präadoleszenten Exostosen ausschließlich des solitären Osteochondroms des 15-jährigen Mädchens (Pr13), das in der Färbung negativ war, belief sich auf 4,89 % für den gesamten vorhandenen Knorpel, mit einer Verteilung der Werte zwischen 1,33 und 10,12 %. Zum Vergleich können Angaben aus der Literatur zu benignen wie malignen Knorpel-/Knochentumoren herangezogen werden, die bezüglich ihrer Ki-67-Expression gut untersucht sind. Dabei wurden jedoch niemals Osteochondrome miteinbezogen. Dies ist folglich die erste Studie, die Exostosen hinsichtlich der Wachstumsfraktion charakterisiert. Für benigne Knochentumoren, die das gutartige fibröse Histiozytom, die solitäre Knochenzyste, die fibröse Dysplasie, die aggressive Fibromatose, die aneurysmatische Knochenzyste und den gutartigen Riesenzelltumor umfassen, fanden Vollmer et al. [131] Werte von <1 % bis 8,9 %. Sie unterstrichen die Validität ihrer Befunde durch Bezugnahme auf frühere Ergebnisse der Flow-Cytometrie und autoradiographischer Studien [130, 131]. Stenzel et al. stellten 1996 [115] an der fibrösen Dysplasie, dem Osteoidosteom, der aneurysmatischen Knochenzyste und dem gutartigen Riesenzelltumor Wachstumsfraktionen zwischen 0,1 und 7,8 % fest. Ähnlich starke Schwankungen wie bei den hier untersuchten Exostosen wiesen ihre 6 Präparate zu den niedrigmalignen zentralen Osteosarkomen auf, die eine positive Ki-67-Markierung in 0,5 bis 11,3 % der Zellen zeigten. Die einzigen Werte in der Literatur zu Knorpeltumoren stammen wiederum von Vollmer [131], der Wachstumsfraktionen von <1 % bis 2,5 % bei Enchondromen und zwischen 2,8 % und 8,4 % bei Chondrosarkomen ermittelte.

Weiter fanden sich nach den vorliegenden Ergebnissen in der Ki-67-Darstellung wie in den Kollagenfärbungen keine Unterschiede zwischen multiplen und solitären Exostosen. Vielmehr zeigten beide in eindrucksvoller Weise, dass postpubertär in den vorliegenden Präparaten kein mittels Ki-67 feststellbares Wachstum mehr stattfand. Der Schnitt des 15-

jährigen Mädchens, das ein solitäres Osteochondrom zur Ausbildung brachte (Pr13) und keine Proliferation aufwies, nahm dabei eine Grenzstellung bezüglich des Schlusses der Epiphysenfugen ein. Dies unterstützt die Annahme von Solomon [114], dass mit dem Schluss der Wachstumsfugen auch keine weitere Größenzunahme von Osteochondromen zu erwarten sei. Dieselbe Aussage trafen Scarborough und Moreau 1996 [106]. Dies ist aber nur im Bezug auf das Längenwachstum durch enchondrale Ossifikation an der Knorpel-Knochen-Übergangszone für zutreffend zu erachten, da sich die Knorpelkappe selbst durchaus auch noch im Erwachsenenalter im Sinne einer Präneoplasie vergrößern kann, die die Gefahr der malignen Entartung in sich birgt [95]. Schließlich wird in der Literatur seit langem darauf verwiesen, dass das Wachstum eines Osteochondroms als Hinweis auf eine mögliche maligne Transformation zu werten sei [32, 46, 75, 88, 92, 106, 113, 119]. Sehr selten sei hingegen eine Entartung vor dem Schluss der Epiphysenfugen [50]. Hannekam [38] bezog sich zu diesem Thema auf Ochsner [88] und stellte fest, dass das mittlere Alter der Entartung bei 31 Jahren liege, eine Transformation aber tatsächlich sehr selten vor dem 10. und nach dem 50. Lebensjahr auftrete. Auch Garrison et al. [32] kamen zu demselben Schluss. Das mittlere Alter der Entartung unter 75 Patienten mit Osteochondromen lag in ihrer Studie bei 30,7 Jahren. Die Patienten waren zwischen 10 und 72 Jahren alt, wobei der Großteil der Entartungen zwischen dem 20. und dem 40. Lebensjahr diagnostiziert wurde.

Da aber keine der in unserer Studie untersuchten Proben mit dem Verdacht auf Malignität reseziert worden war, war auch keine positive Anfärbung des Ki-67-Antigens in den postpubertären Exostosen zu erwarten. Somit bestätigen die hier vorliegenden Ergebnisse die bekannte Beobachtung, dass Exostosen mit dem Schluss der Epiphysenfugen ihr Wachstum beenden. Zusätzlich kann die vollkommene Übereinstimmung der Ki-67-Färbung mit dieser Tatsache als Validitätskriterium für die Ergebnisse aller untersuchten Präparate herangezogen werden. Dies ist von herausragender Bedeutung, da Osteochondrome in dieser Studie zum ersten Mal hinsichtlich ihrer Wachstumsfraktion charakterisiert wurden. Schlussendlich ist aber unbedingt festzuhalten, dass die teilweise recht hohen ermittelten Werte für Wachstumsfraktionen bei präadoleszenten cartilaginären Exostosen keinesfalls als Malignitätskriterium gewertet werden können und dürfen.

Da alle vorliegenden Präparate gutartig waren, darf angenommen werden, dass signifikante, mittels Ki-67 nachweisbare Wachstumsfraktionen im Knorpel postpubertärer cartilaginärer Exostosen als Zeichen autonomen Wachstums zu werten sind. Dies darf jedoch ebenso noch nicht als Malignitätskriterium im Sinne eines Chondrosarkoms

angesehen werden, sondern lediglich als Hinweis auf eine „neoplastische cartilaginäre Exostose“, deren Existenz Porter und Simpson 1999 [95] forderten, diese aber noch nicht beweisen konnten. Es handle sich dabei um das Bindeglied zwischen benignem Osteochondrom und Chondrosarkom, in Analogie zu einem großen Adenom mit Ki-ras Onkogen-Amplifikation bei der Adenom-Karzinom-Sequenz des kolorektalen Karzinoms.

4.3 Schlussfolgerung

Letztendlich konnte die Pathogenese solitärer wie multipler hereditärer cartilaginärer Exostosen in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, doch liefert sie weiteren Aufschluss über die biochemische Zusammensetzung dieser bezüglich der Kollagene der Typen I, II und X. Die Untersuchung des Proliferationsmarkers Ki-67 erbrachte Einsicht in die Kinetik des Wachstums cartilaginärer Exostosen. Vergleichend mit den untersuchten Gelenkknorpelentitäten ergibt sich ein umfassendes Bild zu Unterschieden und Übereinstimmungen mit Osteochondromen.

Da mittlerweile die Genprodukte des EXT1- und EXT2-Gens gut charakterisiert sind, ihre Aufgabe als Heparansulfatsynthetase bekannt ist [28, 76, 127] und Porter 1999 [95] in einem Analogieschuss zur Pathogenese des kolorektalen Karzinoms die Dynamik der Entstehung von Mutationen im EXT1- und EXT2-Gen greifbar machte, ist es möglich heute die Pathogenese cartilaginärer Exostosen wie folgt darzustellen:

- Voraussetzung zur Entstehung multipler hereditärer cartilaginärer Exostosen ist eine rezessive Keimbahnmutation in einem Allel des EXT1- oder EXT2-Gens. Träger von solitären Exostosen besitzen kein defektes Allel [95].
- Eine weitere somatische Mutation muss im Falle der Erbkrankheit hinzutreten, um eine signifikante Alterierung des Genproduktes hervorzurufen. Am Ort der somatischen Mutation entsteht folglich ein defekter Zellklon. Im Falle des solitären Osteochondroms sind zwei somatische Mutationen nötig, um dessen Entstehung Vorschub zu leisten [95].
- Ein im Golgi-Apparat lokalisierter membranständiger heterooligomerer Komplex aus EXT1- und EXT2-Genprodukten bildet die Heparansulfatpolymerase von biologisch relevanter Aktivität [28, 78]. Dies bedeutet, dass ein Defekt in einem der beiden Gene jeweils die Entstehung desselben Phänotyps zur Folge hat. Ein defektes Allel in beiden Genen führt zu keiner Ausbildung eines Osteochondroms.
- Das EXT1/EXT2-Genprodukt vermittelt über die Polymerisation von Heparansulfatmolekülen die Diffusion von Ihh, gebildet von prähypertrophen

Chondrozyten des Säulenknorpels, zu den Zellen des Perichondriums. In diesen wird die Expression von PTHrP angeregt, welches in einer Rückkoppelungsschleife die Produktion des antiapoptotisch wirkenden Proteins Bcl-2 in den Chondrozyten der Wachstumsfuge induziert. Daraus folgt eine Retardierung des Übergangs in das Stadium der Hypertrophie und so ein reguläres Längenwachstum durch enchondrale Ossifikation. Eine lokale Störung dieses Systems durch verlangsamte Diffusion von Ihh führt demnach zu vorzeitiger Apoptose mit aberranter Knochenbildung in der unmittelbaren Umgebung des Gendefekts [28].

Entwickelt man den Gedankengang dieser Erklärung weiter, so kann man sich vorstellen, dass ein EXT^{-/-}-Zellklon, der nahe am Perichondrium entsteht, stärker durch das Fehlen der PTHrP-Wirkung beeinflusst wird als ein Klon im Zentrum der Wachstumsfuge, der gewissermaßen von allen Seiten durch Diffusion von PTHrP erreicht wird. Da nun die Zellen des somatisch mutierten Klons einer vorzeitigen Differenzierung unterliegen, ist an dieser Stelle das Längenwachstum retardiert. Der Klon wird von den regulär proliferierenden Anteilen „überholt“ und aus dem Verband der übrigen Wachstumsfuge herausgelöst. Er bleibt auf der Oberfläche der Epiphysenfuge zurück, wandert relativ zum weiteren Wachstum diaphysenwärts und richtet sich entsprechend der dynamischen Knochenentwicklung sowie den wirkenden Zugkräften im umgebenden Weichgewebe aus, wodurch die typischerweise schaftwärts gerichtete, gestielte cartilaginäre Exostose entsteht.

Die Notwendigkeit, eine neue Andamethode für die Darstellung von Kollagen II und X in Exostosen - im Gegensatz zu der anfangs an Polydaktylien und fetalen Kniegelenken eingesetzten - zu entwickeln, liefert in der vorliegenden Studie einen Hinweis auf die abweichende Proteoglykansituation. Dass stets die Färbung in der Tiefe des Knorpels der Exostosen, also der Bereich um die Wachstumsfuge betroffen war, ist demnach keineswegs als Zufall zu betrachten, sondern vereinbar mit den oben dargestellten neueren molekularbiologischen Erkenntnissen. Für beide Färbungen war die Entfernung der Proteoglykane durch Hyaluronidase und Pronase, sowohl einzeln als auch in Kombination, insuffizient. Eine regelrechte Darstellung von Kollagen II und X war unter anderem nur durch den Einsatz von Proteinase K 0,5 mg/ml (Tris-Puffer; pH 7,5) bei Raumtemperatur und einer Inkubationszeit von 30 bzw. 35 Minuten zu erreichen.

5. Zusammenfassung

Cartilaginäre Exostosen kommen als häufigste benigne Knochentumoren sporadisch in solitärer, oder bei der autosomal dominanten Erbkrankheit in multipler Ausprägung vor. Für ihre Entstehung sind drei Gene (EXT1, 2 und 3) verantwortlich. Die Pathogenese beruht im Wesentlichen auf einer Störung des Regelkreises von Ihh (Indian hedgehog) und PTHrP (Parathyroid hormone-related Protein), welcher die Progression proliferierender Chondrozyten zu hypertrophen Knorpelzellen steuert. Die Beeinträchtigung dabei liegt vornehmlich in einem Defekt des Genproduktes von EXT1 bzw. EXT2, welches Heparansulfatpolymeraseaktivität aufweist. Die dadurch fehlende Glycosylierung von Heparansulfat verändert die Zusammensetzung der Knorpelmatrix und erschwert die Diffusion von Ihh.

Die vorliegende Studie zeigt, dass sich multiple und solitäre Osteochondrome weder in ihrer Zusammensetzung noch in der Verteilung von Kollagen I, II und X unterscheiden, noch dass ihre Entwicklungskinetik, quantifiziert durch den Proliferationsmarker Ki-67, unterschiedlich wäre. Cartilaginäre Exostosen besitzen in ihrer oberflächlichsten Knorpelschicht Kollagen Typ I, welches sich in Form von Septen in die Tiefe erstreckt und so die Knorpelkappe lobuliert. Das Vorhandensein von Kollagen I auch in tieferen Schichten des Knorpels ist ein Charakteristikum von cartilaginären Exostosen und unterscheidet diese dadurch von normalem Gelenkknorpel. In letzterem konnte erstmals an menschlichen Präparaten in oberflächlichen Arealen, direkt an die Gelenkfläche angrenzend, Kollagen Typ I nachgewiesen werden. Dieser Befund war am stärksten an fetalen Proben ausgeprägt, aber noch bis zum 8. Lebensjahr vorzufinden. Kollagen Typ II stellte sich durchweg als homogene Färbung in allen untersuchten Gelenkknorpelpräparaten dar und ebenso in Knorpelresiduen epiphysennaher Spongiosatrabekel. Ausgespart blieben hingegen Bereiche, die durch das Vorkommen von Kollagen Typ I geprägt waren, also jene Knorpelschichten, die direkt an die Gelenkfläche angrenzten. In Konsequenz dessen zeigte sich der Knorpel von Exostosen inhomogen gefärbt, mit Aufhellungen der Farbgebung im Bereich der fibrösen, Kollagen Typ I enthaltenden Septen. Weiter konnte gezeigt werden, dass das distale Ende distaler Phalangen von Polydaktylien, ohne eine Epiphysenfuge zu enthalten, Zeichen der enchondralen Ossifikation aufweist. Dort wurden in medianen Anschnitten Proteoglykane, Kollagen II und X in subperiostärer Lage sowie in angrenzenden Knorpelinseln der Spongiosa gefunden. Kollagen X, charakteristischerweise exprimiert von hypertrophen

Chondrozyten, war in sämtlichen untersuchten Präparaten nachzuweisen, auch in Resektaten postpubertärer cartilaginärer Exostosen, die keine Wachstumsfuge mehr enthielten. Das Auftreten war dabei kosequent auf den direkt an den Knochen angrenzenden Knorpelbereich beschränkt. Unter den fetalen Präparaten konnte eine Zunahme an Kollagen X mit zunehmendem Gestationsalter bestätigt werden. Abweichungen im Proteoglykanmuster der Exostosen machten die Entwicklung eines speziellen enzymatischen Andauvorgangs sowohl für die Darstellung von Kollagen Typ X, als auch Kollagen Typ II notwendig. Proteinase K wurde dafür erstmals in der Immunhistochemie eingesetzt und erwies sich überlegen gegenüber Hyaluronidase und Pronase. Die mittels Ki-67 ermittelte Wachstumsfraktion fetalen epiphysären Knorpels lag bei Vorhandensein einer gut abzugrenzenden Epiphysenfuge ab der 19. SSW zwischen 44 und 53 % im Bereich der Proliferationszone, im übrigen Knorpel zwischen 22 und 32 %. Die Polydaktylien besaßen Wachstumsfraktionen zwischen 1 und 14 % in der Proliferationszone und im restlichen Epiphysenknorpel jeweils <1 %. Für postpubertär resezierte Exostosen konnte keinerlei Proliferation verzeichnet werden, für die Resektate in der Wachstumsphase befindlicher Patienten hingegen Werte zwischen 1,33 und 10,12 % mit einem arithmetischen Mittel bei 4,89 %. Obwohl alle vorliegenden Präparate gutartig waren, darf angenommen werden, dass mittels Ki-67 nachweisbare Wachstumsfraktionen im Knorpel postpubertärer cartilaginärer Exostosen als Zeichen autonomen Wachstums zu werten sind. Dies dürfte jedoch noch nicht als Malignitätskriterium zur Diagnose eines Chondrosarkoms angesehen werden, sondern lediglich als Hinweis für das Vorliegen einer „neoplastischen cartilaginären Exostose“. Ein Beweis für deren Existenz - das Bindeglied zwischen benignem Osteochondrom und Chondrosarkom - steht aber derzeit noch aus.

6. Literaturverzeichnis

1. Aigner T, Dertinger S, Vornehm SI, Dudhia J, von der Mark K, Kirchner T: Phenotypic diversity of neoplastic chondrocytes and extracellular matrix gene expression in cartilaginous neoplasms. *Am J Pathol* 150: 2133-2141 (1997)
2. Aigner T, Frischholz S, Dertinger S, Beier F, Girkontaité I, von der Mark K: Type X collagen expression and hypertrophic differentiation in chondrogenic neoplasias. *Histochem Cell Biol* 107: 435-440 (1997)
3. Aigner T, Greskötter KR, Fairbank JCT, von der Mark K, Urban JPG: Variation with age in the pattern of type X collagen expression in normal and scoliotic human intervertebral discs. *Calcif Tissue Int* 63: 263-268 (1998)
4. Allard SA, Bayliss MT, Maini RN: The synovium-cartilage junction of the normal human knee. Implications for joint destruction and repair. *Arthritis Rheum* 33: 1170-1179 (1990)
5. Apte SS: Expression of the cell proliferation-associated nuclear antigen reactive with the Ki-67 monoclonal antibody by cells of the skeletal system in humans and other species. *Bone Miner* 10: 37 -50 (1990)
6. Apte SS, Athanasou NA: An immunohistological study of cartilage and synovium in primary synovial chondromatosis. *J Pathol* 166: 277-281 (1992)
7. Arms DM, Strecker WB, Manske PR, Schoenecker PL: Management of forearm deformity in multiple hereditary osteochondromatosis. *J Ped Orthoped* 17: 450-454 (1997)
8. Arnold G, Beier HM, Herrmann M, Kaufmann P, Kretschmann H-J, Kühnel W, Schiebler TH, Schmidt W, Steiniger B, Winckler J, van der Zypen E, Zilles K: Kapitel 3.4 Bindegewebe. In: Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K (Hrsg.): *Anatomie*, 6. Auflage, Springer Berlin, Heidelberg, New York, S. 50-62 (1995)
9. Bellaïche Y, The I, Perrimon N: Tout-velu is a drosophila homologue of the putative tumour suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion. *Nature* 394: 85-88 (1998)
10. Bernard MA, Hogue DA, Cole WG, Sanford T, Snuggs MB, Montufar-Solis D, Duke PJ, Carson DD, Scott A, van Winkle WB, Hecht JT: Cytoskeletal abnormalities in chondrocytes with EXT1 and EXT2 mutations. *J Bone Miner Res* 15: 442-450 (2000)
11. Bethge JF: Hereditäre, multiple Exostosen und ihre pathogenetische Deutung. *Arch Orthop Unallchir* 54: 667-696 (1963)
12. Bisgard JD, Bisgard ME: Longitudinal growth of long bones. *Arch Surg* 31: 568-578

(1935)

13. Bourne JA: Handbuch I der Immunperoxidase-Färbemethoden. Übersetzung: Mittag H, Torka B; Broschüre, DAKO Corporation, Carpinteria, USA (1983)
14. Bovée JVM, Cleton-Jansen A-M, Wuyts W, Caethoven G, Taminiau AHM, Bakker E, Van Hul W, Cornelisse CJ, Hogendoorn PCW: EXT-mutation analysis and loss of heterozygosity in sporadic and hereditary osteochondromas and secondary osteochondromas. *Am J Hum Genet* 65: 689-698 (1999)
15. Brandtzaeg P: The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry. *J Immunol Methods* 216: 49-67 (1998)
16. Brown DC, Gatter KC: Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopath* 40: 2-11 (2002)
17. Bruckner P, van der Rest M: Structure and function of cartilage collagens. *Microsc Res Tech* 28: 378-384 (1994)
18. Buur T, Morch MM: Hereditary multiple exostoses with spinal cord compression. *J Neurol Neurosurg Psych* 46: 96-98 (1983)
19. Campanacci M: Bone and soft tissue tumors. Springer Verlag Wien - New York, Aulo Gaggi Editore - Boigna: 199-206 (1990)
20. Canella P, Gardini F, Boriani S: Exostosis: development, evolution and relationship to malignant degeneration. *Ital J Orthop Traumatol* 7: 293-298 (1981)
21. Cancedda R, Descalzi-Cancedda F, Castagnola P: Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol* 159: 265-358 (1995)
22. Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J: Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168: 357-363 (1992)
23. Cotta H, Rauterberg K: Physiologie und Pathologie der Wachstumsfuge. *Z Orthop* 117: 1-12 (1979)
24. Cuomo F, Blank K, Zuckerman JD, Present DA: Scapular osteochondroma presenting with exostosis bursata. *Bulletin Hospital for joint diseases* 52: 55-58 (1993)
25. D'Ambrosia, R, Ferguson AB: The formation of osteochondroma by epiphyseal cartilage transplantation. *Clin Orthop Rel Res* 61: 103-115 (1968)
26. Danielsson LG, El-Haddad I, Quadros O: Distal tibial osteochondroma deforming the fibula. *Acta Orthop Scand* 61(5): 469-470 (1990)
27. Davis RI, Foster H, Arthur K, Trewin S, Hamilton PW, Biggart DJ: Cell proliferation

- studies in primary synovial chondromatosis. *J Pathol* 184: 18-23 (1998)
28. Duncan G, McCormick C, Tufaro F: The link between sulfate and hereditary bone disease: finding a function for the EXT family of putative tumor suppressor proteins. *J Clin Invest* 108: 511-516 (2001)
 29. Eerola I, Salminen H, Lammi P, Lammi M, von der Mark K, Vuorio E, Saamanen AM: Type X collagen, a natural component of mouse articular cartilage: association with growth, aging, and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 41: 1287-1295 (1998)
 30. El-Khoury GY, Bassett GS: Symptomatic bursa formation with osteochondromas. *Am J Roentgenol* 133: 895-898 (1979)
 31. Feely MG, Boehm AK, Bridge RS, Krallman PA, Neff JR, Nelson M, Bridge JA: Cytogenetic and molecular cytogenetic evidence of recurrent 8q24.1 loss in osteochondroma. *Cancer Genet Cytogenet* 137: 102-107 (2002)
 32. Garrison RC, Unni KK, McLeod RA, Pritchard DJ, Dahlin DC: Chondrosarcoma arising in osteochondroma. *Cancer* 49: 1890-1897 (1982)
 33. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacher H, Schwab U, Stein H: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133:1710-1715 (1984)
 34. Girkontaite I, Frischholz S, Lammi P, Wagner K, Swoboda B, Aigner T, von der Mark K: Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies. *Matrix Biol* 15: 231-238 (1996)
 35. Griffiths HJ, Thompson RC, Galloway HR, Everson LI, Suh J-S: Bursitis in association with solitary osteochondromas presenting as mass lesions. *Skeletal Radiol* 20: 513-516 (1991)
 36. Gupta NK, Gaikwad S, Pande HK, Phansopkar M, Gupta VK: First-rib exostosis bursata. *Ann Thorac Surg* 61: 219-220 (1996)
 37. Hall PA: Die Abschätzung von Zellproliferationsmarkern mit besonderer Berücksichtigung von Ki-67 und PCNA. Bericht für DAKO A/S (1993)
 38. Hannekam RCM: Hereditary multiple exostoses. *J Med Genet* 28: 262-266 (1991)
 39. Harsha WN: The natural history of osteocartilaginous exostosis (osteochondroma). *Am Surg* 20: 65-72 (1954)
 40. Hershey SL, Lansden FT: Osteochondromas as a cause of false popliteal aneurysms. *J Bone Joint Surg* 54A: 1765-1768 (1972)
 41. Hoyland JA, Thomas JT, Donn R, Marriott A, Ayad S, Boot-Handford RP, Grant ME, Freemont AJ: Distribution of type X collagen mRNA in normal and osteoarthritic

- human cartilage. *Bone Miner* 15: 151-164 (1991)
42. Huvos AG: Solitary and multiple osteochondromas and enchondromas; juxtacortical chondroma; Maffucci's disease. In: Huvos AG: *Bone tumors - diagnosis, treatment and prognosis*. Saunders, Philadelphia, S. 253-293 (1991)
 43. Iannotti JP: Growth plate physiology and pathology. *Orthop Clin North Am* 21: 1-17 (1990)
 44. Jacobi CA, Gellert K, Zieren J: Rapid development of subscapular exostosis bursata. *J Shoulder Elbow Surg* 6: 164-166 (1997)
 45. Jaffe HL: Hereditary multiple exostosis. *Arch Pathol* 36: 335-357 (1943)
 46. Jaffe HL: Solitary and multiple osteocartilaginous exostosis. In: Jaffe HL: *Tumors and tumorous conditions of bone and joint*. Henry Kimpton, London, 143-168 (1958)
 47. Jaramillo D, Shapiro F: Growth cartilage - normal appearance, variants and abnormalities. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 6: 455-471 (1998)
 48. Jimenez SA, Ala-Kokko L, Prockop DJ, Merryman CF, Shepard N, Dodge GR: Characterization of human type II procollagen and collagen-specific antibodies and their application to the study of human type II collagen processing and ultrastructure. *Matrix Biol* 16: 29-39 (1997)
 49. Karasick D, Schweitzer ME, Eschelman DJ: Symptomatic osteochondromas: imaging features. *Am J Roentgenol* 168: 1507-1512 (1997)
 50. Karbowski A, Eckardt A, Rompe JD: Multiple kartilaginäre Exostosen. *Orthopäde* 24: 37-43 (1995)
 51. Karsenty G: Genetics of skeletogenesis. *Dev Genet* 22: 301-313 (1998)
 52. Keith A: Studies on the anatomical changes which accompany certain growth-disorders of the human body. *J Anatom* 54: 101-115 (1920)
 53. Kirsch T, von der Mark K: Isolation of bovine type X collagen and immunolocalization in growth-plate cartilage. *Biochem J* 265: 453-459 (1990)
 54. Kirsch T, von der Mark K: Isolation of human type X collagen and immunolocalization in fetal human cartilage. *Eur J Biochem* 196: 575-580 (1991 a)
 55. Kirsch T, von der Mark K: Ca²⁺ binding properties of type X collagen. *FEBS Lett* 294: 149-152 (1991 b)
 56. Kivioja A, Ervasti H, Kinnunen J, Kaitila I, Wolf M, Böhling T: Chondrosarcoma in a family with multiple hereditary exostoses. *J Bone Joint Surg* 82B: 261-266 (2000)
 57. Klareskog L, Johnell O, Hulth A, Holmdahl R, Rubin K: Reactivity of monoclonal anti-type II collagen antibodies with cartilage and synovial tissue in rheumatoid

- arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 29: 730-738 (1986)
58. Krooth RS, Macklin MT, Hilbish TF: Diaphysal aclasis (multiple exostoses) on Guam. *Am J Hum Genet* 13: 340-347 (1961)
 59. Kuijer R, van de Stadt RJ, de Koning MHMT, van Kampen GPJ, van der Korst JK: Influence of cartilage proteoglycans on type II collagen fibrillogenesis. *Connect Tissue Res* 17: 83-97 (1988)
 60. Kwan KM, Pang MK, Zhou S, Cowan SK, Kong RY, Pfordte T, Olsen BR, Silience DO, Tam PP, Cheah KS: Abnormal compartmentalization of cartilage matrix components in mice lacking collagen X: implications for function. *J Cell Biol* 136: 459-471 (1997)
 61. Lange RH, Lange TA, Rao BK: Correlative radiographic, scintigraphic, and histological evaluation of exostoses. *J Bone Joint Surg* 66A: 1454-1459 (1984)
 62. Langenskiöld A: Normal and pathological bone growth in the light of the development cartilaginous foci in chondrodysplasia. *Acta Chir Scand* 95: 367-386 (1947)
 63. Legeai-Mallet L, Margaritte-Jeannin P, Lemdani M, Le Merrer M, Plauchu H, Maroteaux P, Munnich A, Clerget-oarpoux F: An extension of the admixture test for the study of genetic heterogeneity in hereditary multiple exostoses. *Hum Genet* 99: 298-302 (1997)
 64. Legeai-Mallet L, Rossi A, Benoist-Lasselien C, Piazza R, Mallet J-F, Delezoide A-L, Munnich A, Bonaventure J, Zylberberg L: EXT 1 gene mutation induces chondrocyte cytoskeletal abnormalities and defective collagen expression in the exostoses. *J Bone Miner Res* 15: 1489-1500 (2000)
 65. Leone NC, Shupe JL, Gardner EJ, Millar EA, Olson AE, Phillips EC: Hereditary multiple exostosis – a comparative human-equine-epidemiologic study. *J Hered* 78: 171-177 (1987)
 66. Lichtenstein L: Chaper 4, Osteocartilaginous exostosis (osteochondroma). In: Lichtenstein L: *Bone tumors*. 5. Auflage, Mosby, Saint Louis, S. 17-29 (1977)
 67. Lin X, Gan L, Klein WH, Wells D: Expression and functional analysis of mouse EXT1, a homolog of the human multiple exostoses type 1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 738-743 (1998)
 68. Lin X, Wei G, Shi Z, Dryer L, Esko JD, Wells DE, Matzuk MM: Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice. *Dev Biol* 224: 299-311 (2000)
 69. Lind T, Tufaro F, McCormick C, Lindahl U, Lidholt K: The putative tumor

- suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate. *J Biol Chem* 273: 26265-26268 (1998)
70. Linsenmayer TF, Long F, Nurminskaya M, Chen Q, Schmid TM: Type X collagen and other up-regulated components of the avian hypertrophic cartilage program. *Progr Nucleic Acid Res Mol Biol* 60: 79-109 (1998)
 71. Luckman SP, Rees E, Kwan APL: Partial characterization of cell and type X collagen interactions. *Biochem J* 372: 485-493 (2003)
 72. MacCallum DE, Hall PA: Biochemical characterization of pKi67 with the Identification of a mitotic-specific form associated with hyperphosphorylation and altered DNA binding. *Exp Cell Res* 252: 186-198 (1999)
 73. MacCallum DE, Hall PA: The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. *J Pathol* 190: 537-544 (2000a)
 74. MacCallum DE, Hall PA: The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi67. *J Pathol* 191: 286-298 (2000b)
 75. Malghem J, Van de Berg B, Noël H, Maldague B: Benign osteochondromas and exostotic chondrosarcomas: evaluation of cartilage cap thickness by ultrasound. *Skeletal Radiol* 21: 33-37 (1992)
 76. McCormick C, Leduc Y, Martindale D, Kattison K, Esford LE, Dyer AP, Tufaro F: The tumour suppressor EXT1 alters the expression of cell-surface heparan sulfate. *Nat Genet* 19: 158-161 (1998)
 77. McCormick C, Duncan G, Tufaro F: New perspectives on the molecular basis of hereditary bone tumours. *Mol Med Today* 5: 481-486 (1999)
 78. McCormick C, Duncan G, Goutsos KT, Tufaro F: The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 668-673 (2000)
 79. Miller EJ, Gay S: The collagens: An overview and update. *Methods Enzymol* 144: 3-41 (1987)
 80. Mirra JM: Benign cartilaginous exostoses, osteochondroma and osteochondromatosis. In: Mirra JM, Picci P, Gold RH: *Bone tumors - clinical, radiologic and pathologic correlations*. Lea & Febiger, Philadelphia, London, 1626-1635 (1989)
 81. Müller E: Über hereditäre multiple cartilaginäre Exostosen und Ecchondrosen. *Beitr Pathol* 57: 232-281 (1914)

82. Murken J-D: Zur Häufigkeit und Genetik der multiplen cartilaginären Exostosen (multiple Osteochondromatose). *Z Kinderchir* 6: 563-567 (1969)
83. Naish SJ: Handbuch immunochemischer Färbemethoden II. Übersetzung: Mally M, Stankic E; Broschüre, DAKO Corporation, Carpinteria, USA (1989)
84. Nerlich AG, Kirsch T, Wiest I, Betz P, von der Mark K: Localization of collagen X in human fetal and juvenile articular cartilage and bone. *Histochemistry* 98: 275-281 (1992)
85. Nerlich AG, Parsche F, Kirsch T, Wiest I, von der Mark K: Immunohistochemical detection of interstitial collagens in bone and cartilage tissue remnants in an infant Peruvian mummy. *Am J Phys Anthropol* 91: 279-285 (1993)
86. Nerlich AG, Wiest I, von der Mark K: Immunohistochemical analysis of interstitial collagens in cartilage of different stages of osteoarthritis. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 63: 249-255 (1993)
87. Nerlich AG, Schleicher ED, Boos N: 1997 Volvo Award winner in basic science studies. Immunohistologic markers for age related changes of human lumbar intervertebral discs. *Spine* 22: 2781-2795 (1997)
88. Ochsner PE: Zum Problem der neoplastischen Entartung bei multiplen kartilaginären Exostosen. *Z Orthop* 116: 369-378 (1978)
89. Ogden JA: Kapitel 5 Diagnostic Imaging. In: Ogden JA: *Skeletal injury in the child*. 3. Auflage, Springer New York, Berlin, Heidelberg, S. 115-146
90. Orlow LW: Die Exostosis bursata und ihre Entstehung. *Deutsche Z Chir* 31: 293-308 (1891)
91. Pazzaglia UE, Pedrotti L, Beluffi G, Monafò V, Savasta S: Radiographic findings in hereditary multiple exostoses and a new theory of the pathogenesis of exostoses. *Pediatr Radiol* 20: 594-597 (1990)
92. Peterson HA: Multiple hereditary osteochondromata. *Clin Orthop* 239: 222-230 (1989)
93. Pfander D, Rahmanzadeh R, Scheller EE: Presence and distribution of collagen II, collagen I, fibronectin and tenascin in rabbit normal and osteoarthritic cartilage. *J Rheumatol* 26: 386-394 (1999)
94. Plenk H jr.: Kapitel 25.3 Knochengewebe und Zähne. In: Böck P (Hrsg.): *Romeis mikroskopische Technik*. 17. Auflage, Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, S. 527-566 (1989)
95. Porter DE, Simpson AHRW: The neoplastic pathogenesis of solitary and multiple

- osteochondromas. *J Pathol* 188: 119-125 (1999)
- Bovée JVMG, Hogendoorn PCW: Letter to the Editor: Re. Review Article entitled 'The neoplastic pathogenesis of solitary and multiple osteochondromas'. *J Pathol* 190: 516-517 (2000) (Brief an den Herausgeber)
- Porter DE, Simpson AHRW: Authors' Reply. *J Pathol* 190: 517 (2000) (Brief)
96. Pritchett JW: Growth and predictions of growth in the upper extremity. *J Bone Joint Surg* 70-A: 520-525 (1988)
97. Pritchett JW: Growth plate activity in the upper extremity. *Clin Orthop* 268: 235-242 (1991)
98. Pritchett JW: Longitudinal growth and growth-plate activity in the lower extremity. *Clin Orthop* 275: 274-279 (1992)
99. Raskind WH, Conrad EUC, Matsushita M, Wijsman EM, Wells DE, Chapman N, Sandell LJ, Wagner M, Houck J: Evaluation of locus heterogeneity and EXT1 mutations in 34 families with hereditary multiple exostoses. *Hum Mutat* 11: 231-239 (1998)
100. Reichenberger E, Aigner T, von der Mark K, Stöß H, Bertling W: In situ hybridization studies on the expression of type X collagen in fetal human cartilage. *Dev Biol* 148: 562-572 (1991)
101. Reinhardt K, Angel HW: Exostosis bursata scapulae. *Radiologe* 14: 142-145 (1974)
102. Rodriguez JI, Razquin S, Palacios J, Rubio V: Human growth plate development in the fetal and neonatal period. *J Orthop Res* 10: 62-71 (1992)
103. Román G: Hereditary multiple exostoses – a rare case of spinal cord compression. *Spine* 3: 230-233 (1978)
104. Rosati R, Horan GSB, Pinero GJ, Garofalo S, Keene DR, Horton WA, Vuorio E, de Crombrughe D, Behringer RR: Normal long bone growth and development in type X collagen-null mice. *Nat Genet* 8: 129-135 (1994)
105. Rucklidge GJ, Milne G, Robins SP: Collagen type X: a component of the surface of normal human, pig, and rat articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 297-302 (1996)
106. Scarborough MT, Moreau G: Benign cartilage tumors. *Ped Orthop Oncology* 27: 583-589 (1996)
107. Schmale GA, Conrad EU, Raskind WH: The natural history of multiple exostoses. *J Bone Joint Surg Am* 76A: 986-992 (1994)
108. Schmid TM: (2000 persönliche Mitteilung)

109. Scotlandi K, Serra M, Manara C, Maurici D, Benini S, Nini G, Campanacci M, Baldini N: Clinical relevance of Ki-67 expression in bone tumors. *Cancer* 75: 806-814 (1995)
110. Shapiro F, Simon S, Glimcher MJ: Hereditary multiple exostoses - anthropometric, roentgenographic and clinical aspects. *J Bone Joint Surg Am* 61A: 815-824 (1979)
111. Smithius T: Exostosis bursata. *J Bone Joint Surg* 46B: 544-545 (1964)
112. Solomon L: Bone growth in diaphysial aclasis. *J Bone Joint Surg Br* 43B: 700-716 (1961)
113. Solomon L: Hereditary multiple exostosis. *J Bone Joint Surg Br* 45B: 292-304 (1963)
114. Solomon L: Hereditary multiple exostosis. *Am J Hum Genet* 16: 351-363 (1964)
115. Stenzel I, Pösl M, Ritzel H, Hentz M, Werner M, Delling G: Zellproliferation bei Knochtumoren. Immunhistologische Untersuchung zur Ki-67-Proteinexpression. *Pathologe* 17; 56-62 (1996)
116. Stevens A, Lowe J: Kapitel 4 Supportzellen und extrazelluläre Matrix. In: Stevens A, Lowe J: *Histologie*, 1. Auflage, Chapman & Hall Weinheim, S. 42-56 (1992)
117. Stevens DA, Williams GR: Hormone regulation of chondrocyte differentiation and enchondral bone formation. *Mol Cell Endocrinol* 151: 195-204 (1999)
118. Stickens D, Brown D, Evans GA: EXT genes are differentially expressed in bone and cartilage during mouse embryogenesis. *Dev Dyn* 218: 452-64 (2000)
119. Sugiura Y, Sugiura I, Iwata H: Hereditary multiple exostosis: Diaphyseal aclasis. *Jap J Human Genet* 21: 149-167 (1976)
120. Sussman MD: Collagen of growth plate cartilage. In: *Behavior of the growth plate*, Hrsg. Uthhoff HK und Wiley JJ, Raven Press, New York, 31-33 (1988)
121. Suttmüller M, Bruijn JA, de Heer E: Collagen types VIII and X, two non-fibrillar, short-chain collagens. Structure homologies, functions and involvement in pathology. *Histol Histopathol* 12: 557-566 (1997)
122. Tanaka M, Cohn MJ, Ashby P, Davey M, Martin P, Tickle C: Distribution of polarizing activity and potential for limb formation in mouse and chick embryos and possible relationships to polydactyly. *Development* 127: 4011-4021 (2000)
123. Tang WM, Luk KDK, Leong JCY: Costal osteochondroma – a rare case of spinal cord compression. *Spine* 23: 1900-1903 (1998)
124. Temtamy S, McKusick: Polydactyly as an isolated malformation. In: Temtamy S, McKusick: *The genetics of hand malformations*. Birth defects. Alan R. Liss, New York, S. 364-392 (1978)

125. Theil T, Kaesler S, Grotewold L, Böse J, Rüther U: Gli genes and limb development. *Cell Tissue Res* 296: 75-83 (1999)
126. Timpl R, Wick G, Gay S: Antibodies to distinct types of collagens and procollagens and their application in immunohistology. *J Immunol Methods* 18: 165-182 (1977)
127. Toyoda H, Kinoshita Toyoda A, Selleck SB: Structural analysis of glycosaminoglycans in drosophila and caenorhabditis elegans and demonstration that tout-velu, a drosophila gene related to EXT tumor suppressors, affects heparan sulfate in vivo. *J Bioi Chem* 275: 2269-2275 (2000)
128. Ueda Y, Oda Y, Tsuchiya H, Tomita K, Nakanishi I: Immunohistological study on collagenous proteins of benign and malignant human cartilaginous tumours of bone. *Virchows Arch A Pathol Anat* 417: 291-297 (1990)
129. Unni KK: Osteochondroma (osteocartilaginous exostosis). In: Unni KK: Dahlin's Bone tumors - general aspects and data on 11087 cases. 5. Aufl., Lippincott-Raven, Philadelphia New York, S. 11-23 (1996)
130. Vollmer E, Roessner A, Gerdes J, Mellin W, Stein H, Hong-Schachel S, Grundmann E: Short communication. Improved grading of bone tumors with the monoclonal antibody Ki-67. *J Cancer Res Clin Oncol* 112: 281-282 (1986)
131. Vollmer E, Roessner A, Wuisman P, Härle A, Grundmann E: The proliferation behavior of bone tumors investigated with the monoclonal antibody Ki-67. *Curr Top Pathol* 80: 91-114 (1989)
132. von der Mark K: Localization of collagen types in tissues. *Int Rev Connect Tissue Res* 9: 265-324 (1981)
133. von der Mark K: (2000 Vortrag am Universitätsklinikum Ulm, Abteilung und Poliklinik für Orthopädie, Sektion Biochemie der Gelenks- und Bindegewebserkrankungen)
134. Virchow R: Über multiple Exostosen, mit Vorlegung von Präparaten. *Verh Ges Dt Naturforscher* 25: 159-161 (1892)
135. Voutsinas S, Wynne-Davis R: The infrequency of malignant disease in diaphyseal aclasis and neurofibromatosis. *J Med Genet* 20: 345-349 (1983)
136. Wicklund CL, Pauli RM, Johnston D, Hecht JT: Natural history study of hereditary multiple exostoses. *Am J Med Genet* 55: 43-46 (1995)
137. Wirganowicz PZ, Watts HG: Surgical risk for elective excision of benign exostoses. *J Ped Orthop* 17: 455-459 (1997)
138. Wright JM, Matayoshi E, Goldstein AP: Bursal osteochondromatosis overlying an

- osteochondroma of a rib. A case report. *J Bone Joint Surg* 79A: 1085-1088 (1997)
139. Wuyts W, van Hul W, de Boulle K, Hendrickx J, Bakker E, Vanhoenacker F, Mollica F, Lüdecke H-J, Sayli BS, Pazzaglia UE, Mortier G, Hamel B, Conrad EU, Matsushita M, Raskind WH, Willems PJ: Mutations in the EXT1 and EXT2 genes in hereditary multiple exostoses. *Am J Hum Genet* 62: 346-354 (1998)
140. Wuyts W, van Hul W: Molecular basis of multiple exostoses: Mutations in the EXT1 and EXT2 genes. *Hum Mutat* 15(3): 220-227 (2000)
141. Zákány J, Duboule D: Hox genes in digit development and evolution. *Cell Tissue Res* 296: 19-25 (1999)

Danksagung

Ich möchte allen an dieser Arbeit Beteiligten – sei es durch ihren Beitrag an Material, Arbeitskraft, Wissen oder seelischem Beistand – meinen persönlichen Dank aussprechen.

B. Amann

Prof. Dr. H. Arnholdt

Prof. Dr. R. E. Brenner

Prof. Dr. K.-P. Günther

PD Dr. K. Huch

S. Kleffner

G. Mettenleiter

Prof. Dr. A. G. Nerlich

Prof. Dr. W. Puhl

G. Ravalli

R. Schubert-Schmitt