

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. M. Rudert

**UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION VON KNOCHENSIALOPROTEIN
(BSP) AN GEWEBE VON KNOCHENMETASTASEN MITTELS
IMMUNHISTOLOGIE:**

**VERGLEICH EINES ANTIKÖRPERS GEGEN NICHT- GLYKOSYLIERTES
BSP MIT EINEM ANTIKÖRPER GEGEN GLYKOSYLIERTES BSP**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Katharina Flegler

aus Wertheim

Würzburg, Juni 2011

Referent: Prof. Dr. rer. nat. N. Schütze
Koreferent bzw. Korreferentin : Prof. Dr. A. Rosenwald
Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.06.2012

Die Promovendin ist Ärztin

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 Klinisches Bild der Knochenmetastasen	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Klinische Symptomatik	1
1.1.3 Diagnostik und Therapiemöglichkeiten	2
1.2 Zellbiologie der Knochenmetastasen	4
1.2.1 Normales Knochenmilieu	4
1.2.2 Metastasierungskaskade	5
1.2.3 Osteolytische und osteoblastische Metastasen	6
1.2.4 Epitheliale-mesenchymale Transition und Osteomimikry	9
1.2.5 Tumorstammzellen	9
1.3 Knochensialoprotein (BSP)	10
1.3.1 Struktur, Vorkommen und Funktion	10
1.3.2 Knochensialoprotein und Tumor	11
1.4 Zielsetzung der Arbeit	15
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Tumormaterial	16
2.2 Herstellung der immunhistologisch gefärbten Schnitte	16
2.2.1 Prinzip der Immunhistologie	16
2.2.2 Primärantikörper	17
2.2.3 Färbeverfahren	17
2.2.4 Negativ-/Positivkontrolle	18
2.3 Auswertung der Schnitte	19
2.4 Statistik/Auswertung	19
3 ERGEBNISSE	20
3.1 Patientenkollektiv	20
3.2 Auswertung Knochenmetastasen allgemein	22
3.2.1 Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP	27
3.2.2 Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP	29
3.3 Auswertung:	31
Knochenmetastasen mit Primärtumor Mammakarzinom	31
3.3.1 Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP	33
3.3.2 Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP	35
3.4 Auswertung:	37
Knochenmetastasen mit Primärtumor Prostatakarzinom	37
3.4.1 Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP	38
3.4.2 Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP	40
3.5 Auswertung:	42
Knochenmetastasen mit Primärtumor Nierenkarzinom	42

3.5.1	Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP _____	43
3.5.2	Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP _____	45
3.6	Auswertung:_____	47
	Knochenmetastasen mit Primärtumor Lungenkarzinom _____	47
3.6.1	Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP _____	48
3.6.2	Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP _____	50
3.7	Auswertung:_____	52
	Knochenmetastasen mit Primärtumor Schilddrüsenkarzinom _____	52
3.7.1	Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP _____	53
3.7.2	Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP _____	55
3.8	Auswertung:_____	56
	Knochenmetastasen mit Primärtumor Karzinom im Bereich des Magendarmtrakts _____	56
3.8.1	Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP _____	57
3.8.2	Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP _____	59
3.9	Auswertung:_____	61
	Knochenmetastasen mit Primärtumor eines selteneren Karzinoms _____	61
3.9.1	Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP _____	61
3.9.2	Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP _____	61
3.10	Vergleich der verschiedenen Primärtumoren _____	62
3.10.1	Vergleich der verschiedenen Primärtumoren in Bezug auf die Tumorzellen _____	62
3.10.2	Vergleich der verschiedenen Primärtumoren in Bezug auf das Stroma__	63
3.11	Situation im normalen Knochen _____	64
4	DISKUSSION _____	68
4.1	Einleitung _____	68
4.2	Bewertung der Methodik _____	69
4.3	Immunhistochemie mit dem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP _____	70
4.4	Vergleich der beiden Antikörper _____	71
5	ZUSAMMENFASSUNG _____	74
6	LITERATURVERZEICHNIS _____	75

1 EINLEITUNG

1.1 Klinisches Bild der Knochenmetastasen

1.1.1 Epidemiologie

Ein maligner Tumor hat die Fähigkeit zu metastasieren. Nach Leber und Lunge ist der Knochen die dritthäufigste Lokalisation für Metastasen. Einige Tumore metastasieren allerdings gehäuft in den Knochen. Dazu gehören vor allem das Mammakarzinom und das Prostatakarzinom. Außerdem, allerdings seltener, sind Karzinome im Bereich der Niere, Lunge, Schilddrüse und des Magen-Darm-Trakts zu erwähnen.

Das Mammakarzinom ist in Deutschland das häufigste Karzinom der Frau. Jährlich treten etwa 57000 Neuerkrankungen auf (Schätzungen für das Jahr 2004). Jede 11. Frau wird im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkranken. Insgesamt sterben in Deutschland zirka 17000 Patientinnen jährlich an Brustkrebs (Schätzungen für das Jahr 2003). Die Fünfjahresüberlebenswahrscheinlichkeit beträgt bei Diagnosestellung 1994 zirka 78% (Angaben des Robert-Koch-Instituts).

Die Prävalenz von Knochenmetastasen beim Mammakarzinom ist schwer abzuschätzen. In einer Untersuchung von Coleman et al. 1987 konnte gezeigt werden, dass zirka 69% der Frauen, die an Brustkrebs verstarben, Knochenmetastasen in der Bildgebung aufwiesen. Die mittlere Überlebensdauer nach Entdeckung der Knochenmetastasierung beträgt 24 Monate (Coleman et al., 1987). Daraus kann man schließen, dass Knochenmetastasen ein relevantes, behandlungsbedürftiges Problem darstellen.

1.1.2 Klinische Symptomatik

Sehr häufig haben Patienten mit Knochenmetastasen unerträgliche Knochenschmerzen. Diese werden von 80% der Patienten beschrieben. Der Knochenschmerz stellt oft das erste Anzeichen der Metastasierung dar. Außerdem kommt es bei 10-30% der Patienten zu pathologischen Frakturen. Diese betreffen vor allem die beanspruchten Teile des Skeletts, also Wirbelsäule, Becken und proximalen Femur. Solche Frakturen im Bereich der Wirbelsäule können zu einer weiteren Komplikation führen, nämlich zu einem

spinalen Kompressionssyndrom bis hin zu einer kompletten Querschnittslähmung. Dies wird mit unter 10% der Fälle beschrieben. Ein weiteres Symptom der Knochenmetastasierung ist bei 10-30% der Patienten die Hyperkalziämie, ausgelöst durch verstärkte Osteolysen. Klinisch manifestiert sich die Hyperkalziämie sehr unterschiedlich. Es kann zu Übelkeit und Erbrechen, Polyurie, Polydipsie, Dehydratation, Herzrhythmusstörungen, Verwirrheitszuständen bis hin zu Koma und Tod kommen. Die seltenste Komplikation bei Knochenmetastasen, die bei weniger als 10% der Patienten beschrieben wird, ist die Verdrängungsmyelopathie. Die Tumorzellen durchsetzen das Knochenmark und unterdrücken so die normale Hämatopoiese. Es kommt zu Blutungs- und Infektionsneigung sowie Anämie (Diel et al., 1999 a).

1.1.3 Diagnostik und Therapiemöglichkeiten

Apparativ kann man Knochenmetastasen mittels Röntgen sichtbar machen, allerdings erst, wenn diese weit fortgeschritten sind. Das MRT ist genauer in der Darstellung, allerdings sollte bei unklaren Veränderungen auf jeden Fall eine Biopsie entnommen werden. Diese ist zur Diagnosesicherung unverzichtbar. Die Szintigraphie ist im Prozess des Tumorstaging von großer Bedeutung. Neben diesen Methoden gibt es noch verschiedene Blut- und Urinparameter, die verstärkten Knochenabbau (z.B. Alkalische Phosphatase, Prokollagen I aminoterminales Propeptid) beziehungsweise Knochenabbau (z.B. Collagen crosslinked N- Telopeptide) widerspiegeln (Clines et al., 2005).

Die Therapiemöglichkeiten bei Knochenmetastasen sind im Zusammenhang mit denen des Primärtumors zu sehen. Für die Behandlung ist interdisziplinäre Zusammenarbeit äußerst wichtig. Es geht darum, die beschriebenen Komplikationen der Knochenmetastasierung soweit möglich zu verhindern, beziehungsweise geschädigte Areale wiederherzustellen und damit die Lebensqualität des Patienten zu erhalten. Außerdem versucht man das weitere Tumorwachstum zu verhindern, beziehungsweise zu verlangsamen. Die Therapie sollte individuell auf den Patienten und die für ihn im Vordergrund stehenden Beschwerden abgestimmt sein.

Zuerst ist eine Schmerzbehandlung nach den WHO- Kriterien wichtig. Weiterhin sind Bisphosphonate zu erwähnen. Sie stellen eine speziell auf den Knochen zugeschnittene Therapieoption dar. Chemisch gesehen sind Bisphosphonate Analoga des Pyrophosphat, allerdings stabiler. Sie reichern sich im Knochen an und verhindern die Resorption des Knochens durch Hemmung der Osteoklasten. Molekular wirkt die ältere Generation der Bisphosphonate über die Bildung toxischer ATP-Metabolite, die neueren Generationen sind Enzymhemmer der Farnesylysynthetase. Beides führt letztendlich zur Apoptose der Osteoklasten. Den Bisphosphonaten werden auch direkte Anti- Tumor- Effekte zugeschrieben. Bisphosphonate können *in vitro* direkt die Apoptose von Tumorzellen induzieren. Außerdem können sie *in vitro* die Adhäsion und die Invasion von Tumorzellen verhindern. Möglicherweise haben sie auch anti- angiogene Effekte (Brown et al., 2004; Heymann et al., 2004). Bisphosphonate werden klinisch zur Behandlung von Knochenschmerzen im Rahmen der Knochenmetastasierung mit guten Ergebnissen eingesetzt. In vielen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Bisphosphonaten zu einer Reduktion knochenrelevanter Ereignisse und dadurch zu einer Verbesserung der Lebensqualität der Patienten führt. Eine weitere Indikation für Bisphosphonate ist der Verlust von Knochenmasse durch Medikamente bei der Behandlung eines Tumors (Coleman et al., 2008). Eine ernstzunehmende, erst seit einigen Jahren bekannte Nebenwirkung der Bisphosphonate stellt die Bisphosphonat- assoziierte Osteonekrose des Kiefers dar. Die genaue Entstehung der Osteonekrosen des Kiefers ist noch nicht aufgeklärt. Wichtige Risikofaktoren für die Entstehung sind die operative Manipulation an Zähnen und Zahnfleisch, Vorerkrankungen an Zahn und Zahnfleisch und eine hohe Keimzahl in der Mundhöhle mit schlechter Mundhygiene. Diese Risikofaktoren sollten zu Beginn der Behandlung minimiert werden, um die Entstehung von Osteonekrosen des Kiefers möglichst zu reduzieren (Filleul et al., 2010).

Bei drohenden und bestehenden Frakturen sind operative Eingriffe nötig. Die Entscheidung für eine Operation hängt davon ab, inwieweit der Patient in seiner Gesamtsituation davon profitiert. Bei Metastasen im Bereich der Wirbelsäule stellen auch therapieresistente Schmerzen, eine progrediente neurologische Symptomatik und ein Wirbelkörperkollaps mit drohender Gefährdung des Myelons eine Operationsindikation dar. Einzige Kontraindikation ist der moribunde Patient (AWMF

Leitlinien Orthopädie, 2002). Nach der Operation wirkt eine lokale Bestrahlung sehr effektiv, um ein lokales Rezidiv zu verhindern. Bei drohenden Frakturen bildet die Bestrahlung eine Alternative zur Operation. Außerdem ist die Bestrahlung besonders wirksam bei Knochenschmerzen solitärer Metastasen. Eine Schmerzlinderung stellt sich nach 2 bis 3 Wochen ein.

Weitere Optionen im Bezug auf den Primärtumor bieten die systemische Chemotherapie und die Hormontherapie, beispielsweise die Androgenblockade mittels Antiandrogenen und Gonadotropin-releasing-Hormon-Agonisten beim Prostatakarzinom. Es ist wichtig, die Pathophysiologie der Knochenmetastasen weitergehend zu verstehen, um die Metastasen gezielter behandeln zu können.

1.2 Zellbiologie der Knochenmetastasen

1.2.1 Normales Knochenmilieu

Die Knochensubstanz wird ständig ab- und wieder aufgebaut. Diesen Umbau bezeichnet man als Remodeling. Das Remodeling wird beeinflusst von systemischen Hormonen, genauso wie von lokalen Faktoren im Knochen. Für die Knochenresorption sind die Osteoklasten zuständig. Osteoklasten entwickeln sich aus Vorläuferzellen des Monozyten-Makrophagen-Systems. Für die Bildung der extrazellulären Matrix sind die Osteoblasten zuständig. Sie entstehen aus den mesenchymalen Zellen (Yin et al., 2005).

Für die Aktivierung der Osteoklasten zur Knochenresorption ist die Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten wichtig. Ein wichtiger Faktor hierfür ist RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) ligand), der sich auf der Oberfläche von Osteoblasten und Stromazellen befindet und von T- Zellen sezerniert werden kann. RANKL bindet an seinen Rezeptor RANK, der auf den Vorläuferzellen der Osteoklasten lokalisiert ist. Dadurch kommt es über die NF- κ B (nuclear factor- κ B) und JNK (Jun N-terminal kinase) Signalwege zur Bildung von Osteoklasten. Ein weiterer löslicher Rezeptor für RANKL stellt das Osteoprotegerin dar, das sich normalerweise im Knochen befindet und somit die Differenzierung der Osteoklasten und damit den Knochenabbau unterdrückt. Induktoren der Knochenresorption durch Osteoklasten sind einerseits systemische Hormone wie Parathormon, 1,25-

Dihydroxyvitamin D₃ und Thyroxin, die die Produktion von RANKL auf Osteoblasten und Stromazellen stimulieren. Auf der anderen Seite können Osteoblasten über Faktoren wie Interleukin 6, Interleukin 1, Prostaglandinen und CSF (colony stimulating factor) die Bildung von Osteoklasten auslösen (Akhtari et al., 2008).

Wichtig für die Differenzierung der Osteoblasten ist der Transkriptionsfaktor Runx2/CBFA1 (core-binding factor α 1). Faktoren, die Wachstum und Differenzierung von Osteoblasten stimulieren können, sind zum Beispiel Wachstumsfaktoren wie BMPs (bone morphogenetic proteins), FGF (basic fibroblast growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), TGF β (transforming growth factor β), aber auch Parathormon, Prostaglandine und Zytokine (Roodman, 2004).

Die Knochenmatrix besteht zum überwiegenden Anteil aus Typ I Kollagen, außerdem sind Signalmoleküle wie Osteopontin, Osteonektin, Knochensialoprotein, Wachstumsfaktoren wie oben genannt und Zytokine zu erwähnen. Dieses Reservoir von Wachstumsfaktoren und Zytokinen bildet ein geeignetes Microenvironment für Knochenzellen und Zellen der Hämatopoese, aber auch für die Ansiedlung von Tumorzellen (Akhtari et al., 2008).

1.2.2 Metastasierungskaskade

Um erfolgreich Metastasen im Knochen zu bilden, müssen sich Tumorzellen vom Primärtumor lösen, in die Blutzirkulation gelangen, dort unbeschädigt das Zielorgan Knochen erreichen und besiedeln. Alle diese einzelnen Schritte sind sehr ineffizient und jeder einzelne Schritt kann zum Scheitern der Metastasierungskaskade führen. Deshalb gelingt es auch nur sehr wenigen Tumorzellen erfolgreich Metastasen zu bilden.

Zu der Frage, warum bestimmte Tumorzellen ausgerechnet in den Knochen metastasieren, hat Stephen Paget 1889 die „seed and soil“-Hypothese aufgestellt. Bildlich gesprochen benötigt der Samen, also die Tumorzelle, eine dazu passende Erde, also das Microenvironment des Knochens, um dort aufgenommen zu werden und wachsen zu können. Tumorzelle und Knochen beeinflussen einander über spezifische Interaktionen.

Auf molekularer Ebene hat man verschiedene Faktoren gefunden, die in Chemotaxis und Adhäsion zum Knochen involviert sind. Eine wichtige Rolle hierbei spielt das

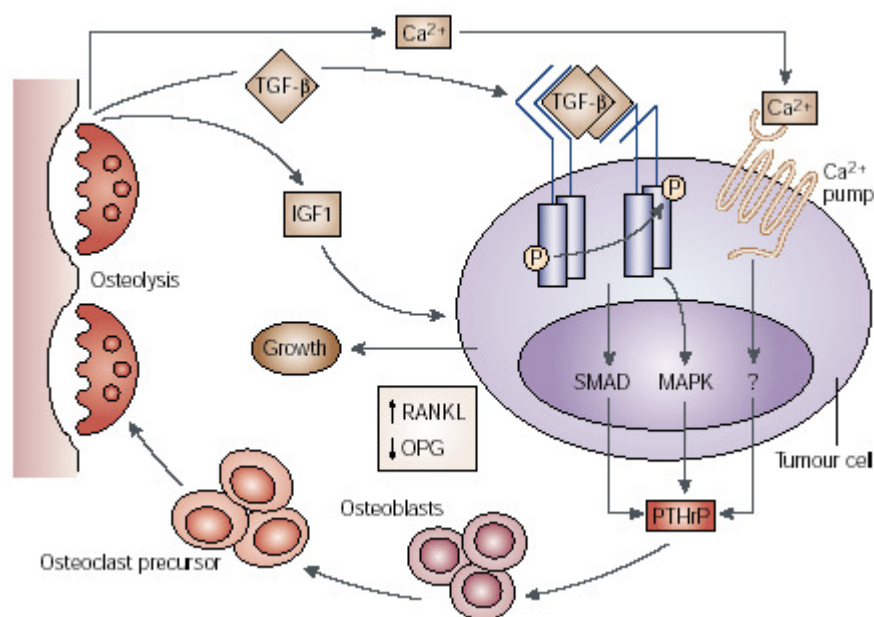
CXCL12/CXCR4 System. CXCL12 (oder SDF1 stromal derived factor 1) ist hochexprimiert im Knochen, wohingegen auf den Tumorzellen der zugehörige Chemokinrezeptor CXCR4 überexprimiert gefunden wird. Eindrucksvoll ist das Beispiel des Mammakarzinoms. Normales Brustgewebe exprimiert CXCR4 nur gering, bei Karzinomzellen dagegen findet man hohe Expressionen. Hohe Levels CXCR4 sprechen für eine schlechte Prognose der Patientinnen. Weiterhin ist CXCR4 eines der Gene, das bei Brustkrebszellen in Knochenmetastasen im Vergleich zum Primärtumor erhöht ist. An den häufigen Lokalisationen von Brustkrebsmetastasen (Knochen, Lunge, Leber, Lymphknoten) findet man hohe Expressionen CXCL12. Überexpression von CXCR4 allein führt zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl von Knochenmetastasen *in vivo* (Wang et al., 2006). Weitere Faktoren für Homing und Adhäsion sind verschiedene, von Tumorzellen exprimierte Integrine, wie zum Beispiel Integrin α 5 β 3. α 5 β 3Integrinrezeptor bindet die Arg-Gly-Asp(RGD-)Sequenz, die sich an Knochenmatrixproteinen wie Vitronektin, Osteopontin und Knochensialoprotein befindet (Clines et al., 2005). Weiterhin sind RANK/RANKL (Hofbauer et al., 2008) in diesen Prozess involviert.

1.2.3 Osteolytische und osteoblastische Metastasen

Traditionell unterscheidet man zwischen osteolytischen und osteoblastischen Metastasen. Diese Beschreibung stellt zwei Extreme dar, meist liegen in einer Metastase osteolytische Anteile neben osteoblastischen. Das Prostatakarzinom bildet Metastasen, die überwiegend osteoblastischen Charakter haben. Beispiele für überwiegend osteolytische Metastasen sind solche mit dem Primärtumor eines Mammakarzinoms oder eines Lungenkarzinoms. Allerdings sind 20% der Metastasen eines Mammakarzinoms osteoblastisch (Mundy, 2002). Diese sind nun getrennt voneinander dargestellt, unabhängig davon, dass meist gemischte Metastasen vorliegen.

Bei der **osteolytischen** Metastase steht die Knochenresorption im Vordergrund. Diese geschieht nicht durch die Tumorzellen selbst, sondern durch eine verstärkte Aktivierung der Osteoklasten. Die Tumorzellen sezernieren Substanzen, die zu einer Aktivierung der Osteoklasten führen. Eine zentrale Rolle hierbei spielt das Parathormon related Protein

(PTHrP). Die Produktion von PTHrP durch die Tumorzellen führt dazu, dass Osteoblasten RANKL produzieren und die Bildung von OPG (Osteoprotegerin) mindern. Die Tumorzellen sezernieren auch direkt RANKL. RANKL bindet an deren Rezeptor auf den osteoklastären Vorläuferzellen und führt auf diese Weise zu einer verstärkten osteoklastären Knochenresorption. Die Tumorzellen missbrauchen also die physiologische Regulation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten zu ihren Zwecken. Durch die Osteolysen werden Wachstumsfaktoren aus der Knochenmatrix freigesetzt, wie zum Beispiel TGF β und IGF1 (insulin like growth factor 1). Diese können an Rezeptoren der Tumorzelle binden und über die SMAD und MAPK Pathways die Tumorzelle beeinflussen. Auch das freigewordene Kalzium kann an die Tumorzelle binden. Diese Mechanismen führen zur Proliferation der Tumorzelle und zur weiteren Produktion von PTHrP. So kommt es zu einem Circulus vitiosus, der letztendlich zur Zerstörung des Knochens und der Entfaltung der Tumorzellen führt (siehe Figur 1) (Mundy, 2002; Roodman, 2004).

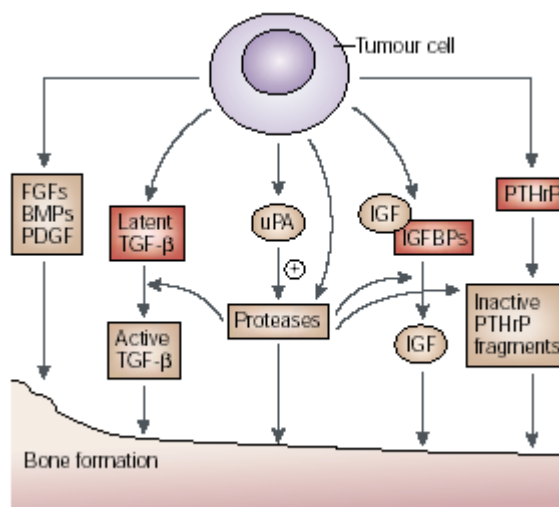


Figur 1: Osteolytische Metastase und Circulus vitiosus (Mundy, 2002)

PTHrP ist zu 90% in Knochenmetastasen von Brustkrebs exprimiert, aber nur zu 50% im Primärtumor und zu 17% in viszerale Metastasen (Yin et al., 2005). In Tiermodellen reduziert ein Antikörper gegen PTHrP die Progression von Knochenmetastasen bedingt durch Brustkrebs (Clines et al., 2005). Andererseits hat PTHrP wahrscheinlich auch anabole Eigenschaften und ist in die Entstehung

osteoblastischer Metastasen involviert (Mundy, 2002). Abgesehen von PTHrP gibt es noch weitere Moleküle, die mit der Entstehung von osteolytischen Knochenmetastasen assoziiert sind. Dazu gehören Prostaglandin E₂, M-CSF (macrophage colony stimulating factor), Interleukine (1, 6, 8, 11, 15, 17) und TNF α (tumor necrosis factor α) (Akhtari, 2008).

Bei der Entstehung einer **osteoblastischen** Metastase kommt es zur Bildung von neuem Knochen mit schlechter Qualität. Die Tumorzellen sezernieren verschiedene Faktoren, die die Proliferation der Osteoblasten und damit die Knochenneubildung stimulieren (siehe Figur 2). Zu diesen Faktoren gehören Wachstumsfaktoren wie BMP, TGF β , FGF, PDGF-BB, Endothelin1 und Wnt (Mundy, 2002). Genauer untersucht ist Endothelin1. Dieses ist bei Patienten mit osteoblastischen Metastasen im Serum erhöht. Es wirkt über die Bindung des EndothelinA-Rezeptors. Antagonisten gegen den EndothelinA-Rezeptor reduzieren im Tiermodell Knochenmetastasen dramatisch (Yin et al., 2005). Zusätzlich zu diesen Faktoren sezernieren die Tumorzellen die Serinprotease PSA (prostate-specific antigene) und uPA (urinary plasminogen activator). Diese spalten Wachstumsfaktoren wie TGF β von ihren Bindungsproteinen der Extrazellulären Matrix ab und aktivieren diese damit (Roodman, 2004). Zu Beginn und bei Fortschreiten der Metastase kommt es wahrscheinlich auch zu vermehrter Osteoklasten vermittelter Knochenresorption (Ye et al., 2007).



Figur 2: Modell einer osteoblastischen Metastase (Mundy, 2002)

Neben der Interaktion der Tumorzellen mit Knochenzellen und Knochenmatrix gibt es auch Wechselwirkungen der Tumorzellen mit den anderen, im Knochen vorliegenden Zellen, also den Stammzellen, hämatopoietischen Zellen, mesenchymalen Zellen und Stromazellen. Inwieweit diese Zellen bei der Bildung der Knochenmetastasen beteiligt sind, ist noch genau zu klären (Siclari et al., 2006).

1.2.4 Epitheliale-mesenchymale Transition und Osteomimikry

Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) wurde zuerst in der Entwicklungsgeschichte beschrieben. Man versteht darunter, dass die epithelialen Eigenschaften einer Zelle, wie die Expression von E-Cadherin, herunterreguliert werden und die Zelle die Fähigkeit zur Migration erlangt. Bei der Loslösung der Tumorzellen vom Primärtumor geht man von einem ähnlichen Prinzip aus (Baum et al., 2008).

Osteomimikry besagt, dass bestimmte Tumorzellen, die bevorzugt in den Knochen metastasieren, die normalen Knochenzellen imitieren. So zeigen zum Beispiel Zellen eines Prostatakarzinoms, die Knochenmetastasen bilden, osteomimetische Eigenschaften. Sie produzieren extrazelluläre Matrixproteine des Knochens wie zum Beispiel Osteopontin, Osteokalzin und Knochensialoprotein und exprimieren OPG und den Transkriptionsfaktor Cbfa als wichtigen Transkriptionsfaktor des Osteoblasten. *In vitro* kommt es zur Osteoblasten ähnlichen Mineralisation (Ye et al., 2007).

1.2.5 Tumorstammzellen

Stammzellen, wie hämatopoietische und mesenchymale, zeichnen sich durch bestimmte Merkmale aus. Sie sind wenig differenziert, fähig zur Selbsterneuerung, meist pluripotent, das heißt sie können in verschiedene Richtungen differenzieren und der Zellzyklus läuft langsam ab. Nach der Teilung bleibt eine der beiden, oder beide Zellen im Stammzellvorrat, die mögliche andere verliert die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und beginnt sich zu teilen und zu differenzieren. Die Stammzellen sind in gewisse Nischen eingebettet, wo sie ein optimales, geschütztes Milieu vorfinden. Diese Nischen haben aber auch die Funktion, die Stammzellen in ihrer Aktivität zu beeinflussen und zu

kontrollieren. Ähnlich wie bei den normalen Stammzellen gibt es das Konzept der Tumorstammzellen, aus denen die heterogene Population des Tumors hervorgeht und die dafür verantwortlich sind, den Tumor aufrechtzuerhalten. Der Ursprung der Tumorstammzellen ist unklar. Die Tumorstammzellen benötigen ebenfalls ein geeignetes, sie umgebendes Milieu, was durch gegenseitige Interaktionen zu einer Unterstützung und Beeinflussung der Tumorzellen führt. Dies ergibt sich entweder durch Besetzung bestehender Stammzellnischen oder durch Bildung eines Tumorstromas (Malanchi et al., 2008). Ein Subtyp der Tumorstammzellen ist wahrscheinlich verantwortlich für die Metastasierung (Li et al., 2007). Es gibt Daten, die dafür sprechen, dass vor Beginn der eigentlichen Metastasierung Nischen an dem Ort der späteren Metastase gebildet werden, die die Umgebung auf die Tumorzellen vorbereiten und die Tumorzellen in der Ansiedlung dort unterstützen. Es konnte gezeigt werden, dass VEGFR1+ hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark an den Ort späterer Metastasen rekrutiert werden und dort Nischen bilden. Dies wird initiiert von Faktoren, die vom Primärtumor sezerniert werden (Kaplan et al., 2006).

1.3 Knochensialoprotein (BSP)

1.3.1 Struktur, Vorkommen und Funktion

BSP ist ein Protein der Extrazellulären Matrix, das vor allem im Knochen und mineralisierten Geweben vorkommt. Die Extrazelluläre Matrix des Knochen besteht zu 90% aus Typ I Kollagen und zu 10% aus nicht kollagenen Proteinen. BSP macht mit zirka 12% der nicht kollagenen Proteine einen relativ großen Anteil aus. Es gehört zu der SIBLING (Small Integrin Binding Ligand, N-linked Glycoprotein) Familie. Dazu zählt neben BSP unter anderem auch Osteopontin (OPN).

BSP ist ein phosphoryliertes Glykoprotein, das aus 327 Aminosäuren besteht. N-terminal sind zwei Glutaminsäurereiche Bereiche lokalisiert, die wahrscheinlich für die Bindung an Hydroxylapatit wichtig sind. C-terminal findet man die RGD-(arginine-glycine-aspartate) Sequenz, über die eine Integrinbindung stattfinden kann. Außerdem gibt es mehrere Tyrosinreiche Regionen. Die Tyrosinreste sind zu einem großen Anteil sulfatiert. BSP hat ein Molekulargewicht von 80000 Dalton, wobei Kohlenhydrate 50%

des Gewichts ausmachen. Diese setzen sich unter anderem zusammen aus 12% Sialinsäuren, woher das Protein seinen Namen hat, 7% Glukosaminen und 6% Galaktosaminen.

BSP wird exprimiert von Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten, Chondrozyten, Odontoblasten, Zementoblasten und Trophoblasten der menschlichen Plazenta. Hohe BSP-Expressionen finden sich bei der Knochenentwicklung und im Bereich des Knochenumbaus. Die Funktion von BSP im Knochen ist noch nicht genau aufgeklärt. Das RGD- Motiv ist ein Ligand für das Integrin $\alpha 5\beta 3$ und ermöglicht so die Adhäsion an verschiedenen Zelloberflächen wie unter anderem von Osteoblasten und Osteoklasten. BSP fördert wahrscheinlich über die Bindung der Osteoklasten die Knochenresorption und über die Bindung von Prä-Osteoblasten die vermehrte Differenzierung zu Osteoblasten. Somit wird die Knochenmineralisierung stimuliert. Es gibt auch Zelladhäsionen, die unabhängig von der RGD-Sequenz sind. An diesen sind wahrscheinlich die Tyrosinreichen Regionen beteiligt. Außerdem ist BSP vermutlich in den Prozess der Knochenmineralisierung involviert. BSP hat eine hohe Affinität zu Hydroxylapatit über die Glutaminsäurereichen Regionen und ist *in vitro* Nukleator für Hydroxylapatitkristalle. Zusätzlich dazu ist die Expression von BSP immer dort hoch, wo es zur Neubildung von Knochen kommt. (Ganss et al., 1999)

BSP könnte auch eine Rolle in der Angiogenese spielen. Es konnte gezeigt werden, dass BSP über die Interaktion der RGD-Sequenz mit dem Integrin $\alpha 5\beta 3$ die Adhäsion und Migration von Endothelzellen vermittelt. Anti $\alpha 5\beta 3$ Antikörper können dies verhindern. Diese Eigenschaft kann im Knochen wichtig sein, aber auch in Tumorwachstum und Metastasierung (Bellahcene et al., 2000 a).

1.3.2 Knochensialoprotein und Tumor

BSP wird nicht nur von den eben erwähnten Zellen im Knochen exprimiert, sondern auch von verschiedenen Tumorzellen. Mammakarzinomzellen exprimieren BSP in der immunhistochemischen Untersuchung, wobei Mammakarzinome mit Mikrokalzifikation die höchste BSP Expression aufweisen. Normales Brustgewebe und gutartige Veränderungen der Brustdrüse zeigen dagegen kaum eine bis keine BSP Expression (Bellahcene et al., 1994; Castronovo et al., 1998). BSP wird von den

Mammakarzinomzellen selbst produziert. Dies konnte dadurch nachgewiesen werden, dass Mammakarzinomzellen aus menschlichem Gewebe und bestimmte Mammakarzinomzell-Linien auf mRNA- und Proteinebene eine BSP-Expression zeigen (Bellahcene et al., 1996 a). Außerdem konnte eine BSP-Expression nachgewiesen werden bei Prostatakarzinomen (Waltregny et al., 1998), Lungenkarzinomen (Bellahcene et al., 1997), Schilddrüsenkarzinomen (Bellahcene et al., 1998), Multiplen Myelom (Bellahcene et al., 2000 b), Magenkarzinomen, Darmkarzinomen, Nierenkarzinomen (Fisher et al., 2004), Pankreaskarzinomen (Kayed et al., 2007), Zervixkarzinomen (Detry et al., 2003), maligne Melanomen (Riminucci et al., 2003) und Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle (Ogbureke et al., 2007).

Die Expression von BSP beim Mammakarzinom ist assoziiert mit einer schlechten Prognose und dem erhöhten Risiko für eine spätere Knochenmetastasierung (Bellahcene et al., 1996 b, c). Der Nachweis von erhöhten BSP-Werten im Serum von Patientinnen mit Mammakarzinom ist ein Marker dafür, später Knochenmetastasen zu entwickeln (Diel et al., 1999 b). Ähnliche Daten gibt es für das Prostatakarzinom (Waltregny et al., 1998, Jung et al., 2004) und das Nicht-Kleinzellige Lungenkarzinom (Zhang et al., 2009).

Wie sieht es mit der BSP Expression in der Knochenmetastase aus? Knochenmetastasen bedingt durch ein Mammakarzinom zeigen zu 33%, solche mit Primärtumor Prostatakarzinom zeigen zu 100% eine starke BSP Expression (Carlinfante et al., 2003). Andere Untersuchungen zeigen in allen Knochenmetastasen von Mammakarzinomen eine mittlere bis starke BSP-Expression (Ibrahim et al., 2000). Beim Vergleich der BSP-Expression im Primärtumor, der Knochenmetastase und einer viszeralen Metastase bei Patienten mit Brust- und Prostatakrebs fällt auf, dass die Expression in viszeralen Metastasen signifikant geringer ist als in Knochenmetastasen (Waltregny et al., 2000).

BSP scheint einen Einfluss auf die Entstehung von Knochenmetastasen zu haben. In Tiermodellen mit MDA-231 Mammakarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von BSP in den Tumorzellen zu einer verstärkten Ausbildung von Knochenmetastasen führt (Zhang et al., 2003). Bringt man in Mammakarzinomzellen, die im Tiermodell nur ins Gehirn metastasieren, BSP-cDNA ein, so entstehen im Tiermodell plötzlich doch Knochenmetastasen (Zhang et al., 2004).

Interessanterweise unterscheidet sich die Proteinstruktur des BSP aus Tumorzellen von der des normalen BSP im Knochen. Beim BSP aus Tumorzellen fehlt in einem bestimmten Bereich des Moleküls die posttranslationale Glykosylierung, was zu einer veränderten Faltung des Proteins führt. Dadurch entstehen Epitope, die charakteristisch für das BSP aus Tumorzellen sind (Armbruster et al., 2009). Auf Grund dieser Tatsache sind Antikörper beschrieben, die speziell aus Tumorzellen sezerniertes BSP binden, normal glykosyliertes BSP jedoch nicht. Diese „Antikörper gegen das humane Bone-Sialoprotein können insbesondere Epitope binden, die auf humanem Bone-Sialoprotein aus Tumorzellen vorhanden sind, dessen posttranslationale Glykosylierung im Bereich der Aminosäuren 120-135, beinhaltend die Aminosäuren TGLAA, gegenüber normalen Bone-Sialoprotein aus dem Knochen verändert oder unvollständig ist.“ (Armbruster et al., 2009). Versuche im Tiermodell mit MDA-MB-231 Mammakarzinomzellen ergaben, dass eine gleichzeitige Gabe von Tumorzellen und Tumor spezifischen Antikörpern gegen BSP zu einer Reduktion der Knochenmetastasen führt. Wenn sich Knochenmetastasen schon entwickelt haben und die Tiere dann mit einem Antikörper gegen BSP behandelt werden, kommt es ebenfalls zu einer Verminderung der Knochenmetastasen (Bäuerle et al., 2005, 2006).

Wie genau BSP in die Metastasierung involviert ist, ist bis jetzt unklar. BSP bewirkt eine Interaktion zwischen Knochenmatrix und Mammakarzinomzellen. So hat es Auswirkungen auf Adhäsion, Migration und Proliferation von Mammakarzinomzellen. Adhäsion und Proliferation könnten über die Interaktion der RGD- Sequenz mit dem Integrin α 5 β 5 gesteuert sein. Die Migration könnte über die Bindung mit Integrin α 5 β 3 vermittelt sein (Sung et al., 1998). BSP stimuliert die Fähigkeit der Tumorzellen Endothelzellen zu durchdringen (Chen et al., 2003). Außerdem kann BSP dazu führen, die Invasivität der Tumorzellen zu steigern. BSP bildet einen Komplex mit Integrin α 5 β 3 und MMP2 (matrix metalloproteinase 2) und führt so zu einem gesteigerten Abbau der umgebenden Matrix (Karadag et al., 2004). In weiteren Untersuchungen wurde herausgefunden, dass die Tumorzellen Transkriptionsfaktoren exprimieren, die eigentlich bei Osteoblasten zu finden sind. Dies unterstützt die Theorie des Osteomimikry von Tumorzellen, die bevorzugt in den Knochen metastasieren (siehe 1.2.4.). So konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren Runx2/Cbfa1 und MSX2 als wichtige Transkriptionsfaktoren

der Osteoblasten die Expression von BSP in Mammakarzinomzellen vermitteln (Barnes et al., 2003). Ähnliches konnte auch für Tumorzellen des malignen Melanoms gezeigt werden (Riminucci et al., 2003).

Eine weitere mögliche Rolle von BSP in der Metastasierungskaskade ist der Schutz der Tumorzellen vor der Attacke des Immunsystems. BSP bindet den Faktor H des Komplementsystems, der ein Schutzschild der Tumorzellen gegen den Angriff des Komplementsystems bildet (Fedarko et al., 2000).

BSP scheint in verschiedene Schritte der Metastasierung involviert zu sein. Dies macht BSP zu einem potentiellen Angriffspunkt für neue Behandlungsmethoden der metastasierten Tumorerkrankungen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Knochensialoprotein (BSP) ist ein Protein der Extrazellulären Matrix, das vor allem in Knochen und mineralisierten Geweben vorkommt. Ihm wird eine Beteiligung an der Mineralisation und die Funktion als Adhäsionsmolekül zugeschrieben. Außerdem spielt BSP eine Rolle bei der Knochenmetastasierung und der Tumorprogression. Viele Tumorzellen, wie das Mamma- und Prostatakarzinom, exprimieren BSP. Dies ist assoziiert mit einer schlechten Prognose und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Knochenmetastasen (Bellahcene et al., 1996).

Es gibt einen Antikörper, der ein Epitop des BSP erkennt, welches im BSP aus Tumorzellen nicht glykosyliert ist, im BSP aus mineralisiertem Gewebe allerdings schon. Dadurch kann dieser Antikörper zwischen normalem und Tumor-BSP unterscheiden (Armbruster et al., 2009). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Knochenmetastasen verhindert werden können bei gleichzeitiger Gabe von Tumorzellen und Antikörpern gegen BSP beziehungsweise, dass bei vorhandenen Knochenmetastasen eine Behandlung der Tiere mit einem Anti-BSP-Antikörper die Metastasen zurückbildet (Bäuerle et al., 2005, 2006).

In dieser Arbeit soll die Expression von BSP an menschlichem Gewebe von Knochenmetastasen unterschiedlicher Primärtumoren mittels Immunhistologie untersucht werden. Dazu werden zwei verschiedene Antikörper verwendet. Der eine erkennt ein Epitop des BSP, welches im BSP aus Tumorzellen nicht glykosyliert ist, der andere erkennt das normal glykosylierte BSP. Dabei soll dargestellt werden,

- ob die Tumorzellen eine BSP Expression aufweisen und dabei ein Unterschied zwischen den beiden Antikörpern vorliegt.
- inwieweit die beiden Antikörper das umgebende Stroma anfärben.
- welche Unterschiede sich in der Auswertung in Abhängigkeit vom Primärtumor zeigen.
- ob auch der Antikörper gegen das nicht glykosylierte BSP in der Routinediagnostik eingesetzt werden kann, da ja auch im Normalgewebe nicht glykosyliertes BSP vorliegt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tumormaterial

Das Tumormaterial stammt aus dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg im Zeitraum von 1996 bis 2007. Im Archiv wurden zunächst diejenigen Fälle herausgesucht, die als Knochenmetastase diagnostiziert wurden und die mikroskopisch eine deutliche Infiltration des Knochens durch den Tumor aufwiesen. So wurden letztendlich 84 Patienten in die Untersuchung eingeschlossen.

Zu jedem Fall wurde der Paraffinblock nach den Einlaufnummern des Pathologischen Instituts aus dem Archiv entnommen. Von jedem Block wurden mit einem Schlitten-Mikrotom Schnitte in der Dicke von 1-3 µm angefertigt. Diese wurden auf mit Silan beschichtete Objektträger übertragen und über Nacht bei 37° getrocknet.

2.2 Herstellung der immunhistologisch gefärbten Schnitte

2.2.1 Prinzip der Immunhistologie

Mit Hilfe der Immunhistologie lassen sich Antigene in einem histologischen Schnitt farblich darstellen. Dies beruht darauf, dass bei Inkubation eines Gewebeschnittes mit Antikörpern gegen ein spezielles Antigen dieses Antigen gebunden, dadurch markiert und in dem Gewebe lokalisiert wird. Diese Bindung des Antikörpers mit dem Antigen wird farblich sichtbar gemacht.

Dazu wird das Prinzip der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) verwendet. Dabei inkubiert man das Gewebe mit einem spezifischen Primärantikörper, der das Antigen bindet. Danach wird ein Sekundärantikörper eingesetzt, der wiederum an die Fc-Region des Primärantikörpers bindet und mit Biotin markiert (biotinyliert) ist. Nun wird ein Avidin-Biotin-Enzymkomplex zugefügt, der mit dem biotinylierten Sekundärantikörper reagiert. Das Enzym Peroxidase kann jetzt über ein Chromogen sichtbar gemacht werden und damit analog auch das Substrat. Das beigefügte Wasserstoffperoxid zerfällt durch die Peroxidase zu Wasser und Sauerstoff. Das Chromogen stellt für diesen

Vorgang die Elektronen zur Verfügung und wird dabei selbst oxidiert. Durch die Oxidation des Chromogens kommt es zu einem Farbumschlag.

2.2.2 Primärantikörper

Für die Färbung wurden drei verschiedene, polyklonale Kaninchen-Anti-human BSP-Antikörper der Firma Immundiagnostik, Bensheim in unterschiedlichen Verdünnungen auf ihre Eignung geprüft.

Die Struktur des Knochensialoproteins variiert, je nachdem, ob es von Tumorzellen oder von Knochenzellen produziert wird (siehe 1.3.2.).

Der erste Anti- BSP- Antikörper bindet nach Angaben der Firma Immundiagnostik an ein Epitop von BSP, das im Gegensatz zum normal glykosylierten BSP nicht glykosyliert ist. Dieses Epitop wird nach Angaben der Literatur dann gefunden, wenn BSP von Tumorzellen sezerniert wird, beziehungsweise wenn „normales“ BSP die posttranslationale Glykosylierung noch nicht durchlaufen hat. Es wird durch die Aminosäuren 108-122 codiert. Dieser Antikörper gegen nicht glykosyliertes BSP wurde in einer 1:2000 Verdünnung eingesetzt.

Die beiden weiteren Antikörper binden an unterschiedliche Epitope des normal glykosylierten, von Knochenzellen produzierten Knochensialoproteins. Auf Grund der besseren Darstellung hat man sich für den Anti-human BSP (aa262-279)-Antikörper entschieden. Dieser Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP wurde in einer 1:1500 Verdünnung verwendet.

2.2.3 Färbeverfahren

Die Objektträger, auf denen sich das Gewebe befindet, werden über Nacht bei 37°C in einen Trockenschrank gelegt. Das Gewebe wird dann zunächst im Xylobad für zweimal fünf Minuten entparaffiniert und danach in einer absteigenden Alkoholreihe (95% Ethanol, 70% Ethanol und 50% Ethanol) für jeweils 5 Minuten rehydriert. Nach diesem Vorgang werden die Objektträger mit Gewebe in dest. Wasser gewaschen.

Die Proben werden jetzt für 10 Minuten in einem Citratpuffer im Schnellkochtopf gekocht, um eine Antigendemaskierung durchzuführen und damit das spätere Andocken

des Antikörpers zu ermöglichen. Das Gewebematerial wird kurz mit dest. Wasser gewaschen und in PBS (puffer based saline) gestellt. Die Lösung lässt man abtropfen und markiert anschließend mit einem Diamantstift auf dem Objektträger das Gewebe, das immunhistologisch angefärbt werden soll.

Danach trägt man den Primärantikörper auf und legt das Präparat für 60 Minuten in eine feuchte Kammer. Nach dieser Zeit wird der Objektträger zweimal 5 Minuten auf dem Schüttler in PBS gewaschen. Dann lässt man die Flüssigkeit abtropfen, aber nicht trocknen.

Nun wird der Sekundärantikörper ADVANCE HRP Link (Firma Dako, Hamburg) aufgetragen und für 20 Minuten in die feuchte Kammer gelegt. Danach wird der Objektträger zweimal 5 Minuten auf dem Schüttler in PBS gewaschen und lässt ihn abtropfen, aber nicht trocknen.

Anschließend wird das ADVANCE HRP Enzyme (Firma Dako, Hamburg) aufgetragen und nochmals für 20 Minuten in der feuchten Kammer aufbewahrt. Danach wird das Gewebe zweimal 5 Minuten auf dem Schüttler in PBS gewaschen.

Nun kann das Chromogen DAB (3,3-Diaminobenzidine) (Firma Dako, Hamburg) aufgetragen werden. Es wird 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit dest. Wasser abgewaschen.

Für die Gegenfärbung wird das Präparat 20 bis 30 Sekunden in Hämalaunlösung gelegt und für eine Minute unter Leitungswasser gehalten. Dadurch werden die basischen Gewebestrukturen, wie zum Beispiel das Chromatin der Zellkerne, blau gefärbt. Zum Schluss wird es mit einem Deckglas eingedeckt.

2.2.4 Negativ-/Positivkontrolle

Um unspezifische Färbungen auszuschließen, wird bei jeder Färbeserie (ca. 14 Schnitte je Serie) eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle durchgeführt. Beide (Positiv- und Negativkontrolle) bestehen aus Präparaten, die eine deutliche Infiltration des Knochens durch Tumorzellen zeigen.

Die Negativkontrolle durchläuft das Färbeverfahren, wie unter 2.2.3. beschrieben. Allerdings wird kein Primärantikörper, sondern stattdessen Kaninchenserum verwendet.

2.3 Auswertung der Schnitte

Für die Auswertungen der eingefärbten Schnitte wird ein Lichtmikroskop der Firma Zeiss mit 50- bis 400-facher Vergrößerung verwendet.

Zunächst werden die Standardfärbungen aus der Pathologie [meist HE (Hämatoxylin-Eosin)- Färbungen] charakterisiert, um die histologische Art des Tumors darzustellen. Hierbei wird auf die typischen histologischen Kriterien einer Tumorzelle geachtet, wie verschobene Kern-Plasma-Relation, atypische Mitosen und prominente Nukleoli. Charakteristische Stellen des Präparats werden mit digitalen Fotoaufnahmen dokumentiert.

Die immunhistologischen Färbungen zeigen als positives Signal eine Braunfärbung, als negatives eine Blau-/Lilafärbung. Zur Auswertung werden Tumorzellen und Stroma getrennt betrachtet. Bei beiden wird zum einen dokumentiert, ob nahezu alles positiv, ein Teil positiv, ein Teil negativ oder nahezu alles negativ ist. Auf der anderen Seite wird bewertet, wie intensiv die positive Färbung ist (Intensität der Braunfärbung). Dies wird visuell bewertet mit schwach= 1+, mittel= 2+ oder stark= 3+. Charakteristische Stellen werden mit Fotos festgehalten.

Neben den immunhistologischen Färbungen des Knochengewebes mit einer Tumormetastase wird auch normales Knochengewebe mit beiden Antikörpern angefärbt und dokumentiert.

2.4 Statistik/Auswertung

Die Auswertung und die Darstellung der Graphen erfolgt mit Microsoft Excel.

Für die statistische Auswertung der immunhistologischen Färbung werden zwei Gruppen gebildet. Gruppe Nummer eins zeigt eine schwache bis keine BSP Expression und setzt sich zusammen aus dem als negativen (0) und 1+ positiven dokumentieren Gewebe. Gruppe Nummer zwei dagegen stellt eine mittlere bis starke BSP Expression dar und bildet sich aus den 2+ und 3+ positiven Fällen. Bei beiden Gruppen werden Tumorzellen, beziehungsweise Stroma, als positiv bezeichnet, wenn sie nahezu komplett positiv oder teils positiv, teils negativ sind. Als negativ gelten sie nur, wenn nahezu das komplette Präparat negativ ist.

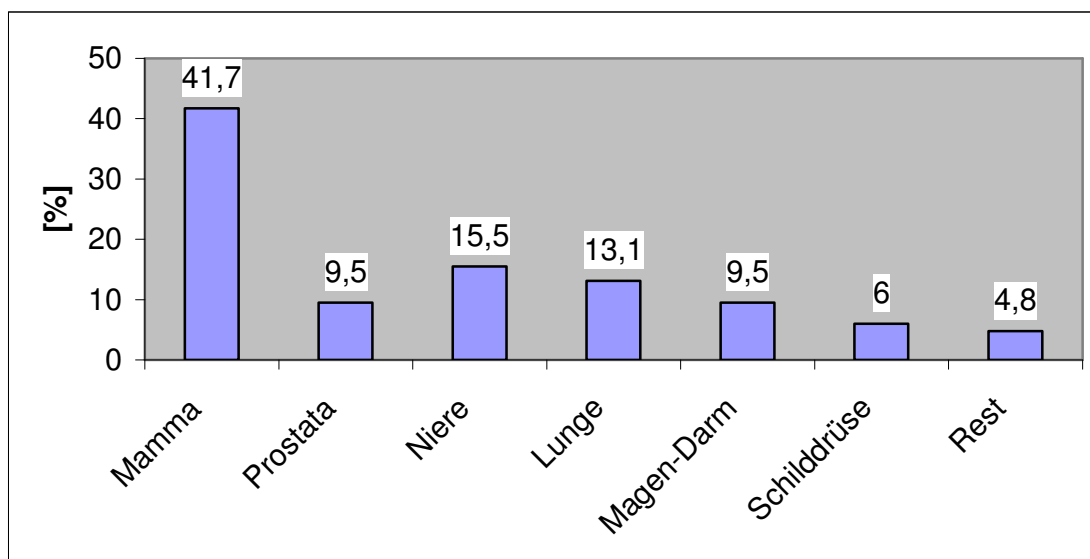
3 ERGEBNISSE

3.1 Patientenkollektiv

Das ausgewählte Kollektiv besteht aus 84 Patienten, die an einem fortgeschrittenen Tumorleiden mit Knochenmetastasen erkrankt sind und deren Knochengewebe in dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg untersucht und als Tumormetastase diagnostiziert wurde. Die Fälle von Knochenmetastasen erstrecken sich über einen Zeitraum von 1996 bis 2007.

Voraussetzung für die Aufnahme in das Kollektiv ist das Vorhandensein histologischen Materials, das eine deutliche Infiltration des Knochens durch eine Tumormetastase zeigt. Die Art des Primärtumors ist kein Auswahlkriterium.

So ergibt sich folgende Verteilung des Primarius. Am häufigsten handelt es sich mit 35 Fällen um ein Mammakarzinom (41,7%), außerdem mit 8 Fällen um ein Prostatakarzinom (9,5%), mit 13 Fällen um ein Nierenkarzinom (15,5%), mit 11 Fällen um ein Lungenkarzinom (13,1%), mit 8 Fällen um ein Karzinom im Bereich des Magendarmtrakts (9,5%), mit 5 Fällen um ein Schilddrüsenkarzinom (6,0%) und mit 4 Fällen um seltenere Karzinome (4,8%).



Figur 3: Lokalisation der Primärtumore (in Prozent)

Beim Probenmaterial handelt es sich zu 81% um Resektate und zu 19% um Biopsate.

Die untersuchten Metastasen sind im Skelett zu 60% im Femur lokalisiert, ansonsten zu 14% in den Wirbelkörpern und zu kleineren Anteilen in Rippen, Becken, Schädel, Unterschenkel und Arm.

Von den 84 Patienten sind 54 weiblich und 30 männlich. Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung beträgt 64,6 Jahre (38 bis 90 Jahre).

Vor Beginn der Herstellung der Schnitte für die immunhistologische Färbung bestand das Kollektiv aus 102 Patienten. Die Verteilung des Primärtumors setzte sich wie folgt zusammen: 41 Fälle mit Mammakarzinom (40,2%), 11 Fälle mit Prostatakarzinom (10,8%), 14 Fälle mit Nierenkarzinom (13,7%), 13 Fälle mit Lungenkarzinom (12,7%), 11 Fälle mit Karzinomen im Bereich des Magendarmtrakts (10,8%), 5 Fälle mit Schilddrüsenkarzinom (4,9%) und 7 Fälle mit selteneren Karzinomen (6,9%).

Da das Knochenmaterial sehr schwierig zu schneiden ist, sind 5 Fälle, die aus sehr wenig Gewebe bestanden, aussortiert worden. Darunter waren zwei Fälle mit dem Primärtumor Mammakarzinom, ein Präparat mit dem Primärtumor Nierenkarzinom, ein Fall mit dem Primarius Lungenkarzinom und ein Fall mit dem Primarius eines selteneren Karzinoms.

Beim Auswerten unter dem Mikroskop stellte sich bei einigen Präparaten heraus, dass sie durch das Schneiden sehr zerrupft worden sind. Dadurch sind relevante Bereiche des Tumors nicht mehr vorhanden oder nur noch schlecht auswertbar. Deshalb sind weitere 14 Fälle nicht in die Auswertung eingegangen. Diese haben folgende Primärtumoren: fünf Fälle mit Mammakarzinom, drei Fälle mit Prostatakarzinom, ein Fall mit Lungenkarzinom, drei Fälle mit Karzinomen im Bereich des Magendarmtrakts und zwei Fälle von selteneren Karzinomen.

3.2 Auswertung Knochenmetastasen allgemein

Die lichtmikroskopische Auswertung der immunhistologischen Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP und dem Antikörper gegen glykosyliertes BSP an Gewebe von Knochenmetastasen ergab die in Figur 4 dargestellten Ergebnisse. Die Tabelle zeigt die Nummer des histologischen Schnittes aus dem Pathologischen Institut, den Primärtumor der Metastase und die Bewertung der beiden Färbungen, aufgeteilt in Tumorzellen und Stroma. In dem weiteren Ergebnisteil wird immer wieder auf diese Tabelle verwiesen.

Um unspezifische Färbungen auszuschließen und die Einteilung in 1+ bis 3+ zu definieren, wird bei jeder Färbeserie (ca. 14 Schnitte je Serie) eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle durchgeführt. Beide (Positiv- und Negativkontrolle) bestehen aus Präparaten, die eine deutliche Infiltration des Knochens durch Tumorzellen zeigen.

Figur 4: Lichtmikroskopische Auswertung der 84 Gewebeschnitte von Knochenmetastasen in der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP und dem Antikörper gegen glykosyliertes BSP.

Nr.	E- Nr.	Primärtumor	Immunhistologie:Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP		Immunhistologie:Antikörper gegen glykosyliertes BSP	
			Tumorzellen	Stroma	Tumorzellen	Stroma
1	23475/96	Mamma- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 3+	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 3+
2	5522/97	invasiv- duktales Mamma- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 3+	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 3+, teils negativ
3	5594/97	Mamma- Ca	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ	negativ	teils positiv 2+, teils negativ
4	15717/97	Mamma- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 3+	negativ	positiv 2+
5	17198/97	Mamma- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ	negativ	teils positiv 2+, teils negativ
6	13879/98	Mamma- Ca	negativ	positiv 2+	negativ	positiv 2+
7	20207/98	invasiv- lobuläres Mamma- Ca	negativ	positiv 3+	negativ	positiv 2+
8	23036/98	invasiv- duktales Mamma- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ	negativ	teils positiv 2+, teils negativ
9	28607/98	Mamma- Ca	negativ	positiv 3+	negativ	positiv 1+

3 ERGEBNISSE

10	5846/99	Mamma- Ca	negativ		negativ	
11	9915/99	invasiv- duktales Mamma- Ca	negativ	positiv 2+	negativ	positiv 2+
12	996/00	Mamma- Ca	negativ	positiv 3+	negativ	positiv 3+
13	7607/00	Mamma- Ca	negativ	positiv 3+	negativ	positiv 3+
14	910/01	invasiv- duktales Mamma- Ca	negativ	teils positiv 2+, teils negativ	negativ	teils positiv 2+, teils negativ
15	1446/01	Mamma- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 3+	negativ	teils positiv 2+, teils negativ
16	3281/01	invasiv- duktales Mamma- Ca	negativ	positiv 3+	negativ	teils positiv 2+, teils negativ
17	3280/01	invasiv- duktales Mamma- Ca	negativ	positiv 2+	negativ	positiv 2+
18	7019/01	invasiv- duktales Mamma- Ca	negativ		negativ	
19	13190/01	teils invasiv duktales teils invasiv lobuläres Mamma- Ca	positiv 1+	positiv 3+	negativ	positiv 2+
20	18251/01	Mamma- Ca	negativ	positiv 1+ - 2+	negativ	teils positiv 1+ - 2+, teils negativ
21	18437/01	Mamma- Ca	negativ	positiv 2+	negativ	positiv 2+
22	20737/01	Mamma- Ca	negativ	positiv 2+	negativ	positiv 1+
23	7009/02	Mamma- Ca	negativ	negativ	negativ	negativ
24	12840/02	Mamma- Ca	negativ	positiv 3+	negativ	positiv 3+
25	26867/02	invasiv- duktales Mamma- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 2+	negativ	positiv 2+
26	9573/03	Mamma- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 2+	teils positiv 2+, teils negativ	positiv 2+
27	455/04	Mamma- Ca	negativ	positiv 2+	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 2+
28	5179/05	Mamma- Ca	negativ	teils positiv 2+, teils negativ	negativ	teils positiv 2+, teils negativ
29	10808/05	invasiv- duktales Mamma- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ

3 ERGEBNISSE

30	2975/06	invasiv- duktales Mamma-Ca	negativ	negativ	negativ	positiv 2+
31	4521/06	invasiv- duktales Mamma-Ca	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ
32	10306/06	invasiv- lobuläres Mamma- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 2+	negativ	negativ
33	2174/07	invasiv- duktales Mamma- Ca	teils positiv 2+, teils negativ	positiv 2+	teils positiv 2+, teils negativ	positiv 2+
34	9346/07	invasiv- duktales Mamma- Ca	negativ	positiv 2+	negativ	teils positiv 2+, teils negativ
35	15288/07	invasiv- duktales Mamma- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ
36	27804/97	Prostata- Ca	teils positiv 1+ - 2+, teils negativ	positiv 2+ - 3+	teils positiv 1+ - 2+, teils negativ	positiv 2+ - 3+
37	1720/00	Prostata- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 2+	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ
38	3162/02	Prostata- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 2+	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 2+
39	30214/02	Prostata- Ca	teils postiv 1+, teils negativ	positiv 2+	negativ	negativ
40	22377/04	Prostata- Ca	negativ	positiv 2+	negativ	positiv 3+
41	7688/05	Prostata- Ca	teils positiv 1+ - 2+, teils negativ	positiv 2+ -3+	teils positiv 1+ - 2+, teils negativ	positiv 2+ - 3+
42	7594/06	Prostata- Ca	teils positiv 1+ - 2+, teils negativ	positiv 3+	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 2+
43	7545/07	Prostata- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ
44	10881/97	klarzelliges Nierenzell- Ca	negativ	teils positiv 3+, teils negativ	negativ	teils positiv 2+, teils negativ
45	22035/97	Urothel- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 2+	negativ	teils positiv 2+, teils negativ
46	22071/97	Nierenzell- Ca	teils positiv 3+, teils negativ	positiv 2+	negativ	positiv 1+
47	2134/98	klarzelliges Nierenzell- Ca	negativ	positiv 1+	negativ	positiv 1+
48	15099/00	klarzelliges Nierenzell- Ca	Positiv 1+ - 2+	positiv 3+	positiv 1+ - 2+	positiv 3+
49	1403/01	klarzelliges Nierenzell- Ca	negativ	teils positiv 2+, teils negativ	negativ	teils positiv 2+, teils negativ
50	9187/01	Nierenbecken- Ca	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ

3 ERGEBNISSE

51	15407/01	klarzelliges Nierenzell- Ca	negativ	teils positiv 1+, teils negativ	negativ	teils positiv 1+, teils negativ
52	22795/01	Urothel- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 3+	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 2+
53	4966/02	klarzelliges Nierenzell- Ca	negativ	negativ	negativ	negativ
54	5616/02	klarzelliges Nierenzell- Ca	negativ	positiv 1+	negativ	negativ
55	16082/02	klarzelliges Nierenzell- Ca	negativ	positiv 2+	negativ	teils positiv 1+, teils negativ
56	29551/06	klarzelliges Nierenzell- Ca	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ
57	6961/98	undifferenziertes, großzelliges Lungen- Ca	negativ	teils positiv 2+, teils negativ	negativ	teils positiv 2+, teils negativ
58	29425/00	mäßig differenziertes Lungen- Ca	negativ	teils positiv 1+, teils negativ	negativ	teils positiv 1+, teils negativ
59	31372/00	kleinzelliges Lungen- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 2+	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 2+
60	20055/01	wenig differenziertes großzelliges Bronchial- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 2+	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 2+
61	29709/01	mittelgroßzelliges Lungen- Ca	teils positiv 3+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 3+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ
62	10796/04	adeno- squamoses Bronchial- Ca	negativ	positiv 2+	negativ	positiv 2+
63	15063/05	event. Lungen- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ
64	7201/06	wenig differenziertes Lungen- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ
65	23267/06	wenig differenziertes Lungen- Ca	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ
66	27941/06	mäßig differenziertes Lungen- Ca	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ	positiv 2+
67	1967/07	mäßig differenziertes Lungen- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 2+	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 2+
68	26878/98	follikuläres Schilddrüsen- Ca	teils positiv 3+, teils negativ	teils positiv 3+, teils negativ	negativ	teils positiv 1+, teils negativ
69	9437/99	follikuläres Schilddrüsen- Ca	negativ	positiv 1+ - 2+	negativ	positiv 1+

3 ERGEBNISSE

70	13001/00	follikuläres Schilddrüsen- Ca	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 1+
71	15333/02	follikuläres Schilddrüsen- Ca	negativ	teils positiv 2+, teils negativ	negativ	negativ
72	xx1/07	follikuläres Schilddrüsen- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ	negativ	teils positiv 2+, teils negativ
73	6288/99	Colon- Ca	negativ	positiv 2+	negativ	teils positiv 1+, teils negativ
74	22729/02	Rectum- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 3+	negativ	teils positiv 2+, teils negativ
75	28087/02	Rectum- Ca	negativ	positiv 3+	negativ	teils positiv 2+, teils negativ
76	7427/03	Rectum- Ca	negativ	teils positiv 1+, teils negativ	negativ	teils positiv 1+, teils negativ
77	19158/05	Pankreas-, Gallen- Ca	negativ	teils positiv 2+, teils negativ	negativ	teils positiv 1+, teils negativ
78	31818/05	Ösophagus- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 3+	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 2+
79	20490/06	Rectum- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	Positiv 2+	teils positiv 1+, teils negativ	positiv 2+
80	1133/07	Hepatocelluläres Ca	teils positiv 2+ - 3+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ
81	3731/99	Aesthesioneuro- blastom	negativ	positiv 2+	negativ	positiv 2+
82	286/06	Plattenepithel- Ca	negativ	teils positiv 2+, teils negativ	negativ	teils positiv 2+, teils negativ
83	32147/06	Parotis- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ
84	3997/07	Plattenepithel- Ca	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ	teils positiv 1+, teils negativ	teils positiv 2+, teils negativ

3.2.1 Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP

Zunächst wurde in der Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP festgestellt, wie viele Fälle als negativ, einfach positiv, zweifach positiv oder dreifach positiv gewertet wurden. Dies ist unterteilt nach den einzelnen Primärtumoren. Figur 5 zeigt die Anzahl der Fälle bei Betrachtung der Tumorzellen, Figur 6 bei Untersuchung des Stromas.

Figur 5: Anzahl der Fälle, die negativ, 1+, 2+ oder 3+ gewertet wurden in Abhängigkeit vom Primärtumor bei Betrachtung der **Tumorzellen** in der Färbung mit dem **Antikörper gegen nicht-glykosyliertes BSP**.

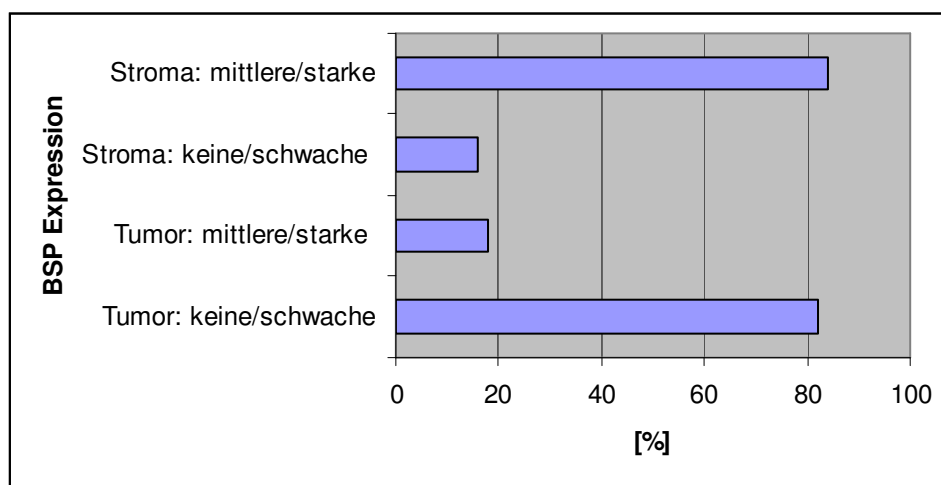
Primärtumor	Anzahl der Fälle	0	1+	2+	3+
Mamma- Ca	35	20	13	2	0
Prostata- Ca	8	1	4	3	0
Nieren- Ca	13	7	2	3	1
Lungen- Ca	11	3	5	2	1
Schilddrüsen- Ca	5	2	1	1	1
Magen- Darm- Ca	8	4	3	0	1
andere	4	2	2	0	0
insgesamt	84	39	30	11	4

Figur 6: Anzahl der Fälle, die negativ, 1+, 2+ oder 3+ gewertet wurden in Abhängigkeit vom Primärtumor bei Betrachtung des **Stromas** in der Färbung mit dem **Antikörper gegen nicht-glykosyliertes BSP**.

Primärtumor	Anzahl der Fälle	0	1+	2+	3+
Mamma- Ca	33	2	1	19	11
Prostata- Ca	8	0	0	5	3
Nieren- Ca	13	1	4	5	3
Lungen- Ca	11	0	3	8	0
Schilddrüsen- Ca	5	0	0	4	1
Magen- Darm- Ca	8	0	2	3	3
andere	4	0	0	4	0

insgesamt	82	3	10	48	21
------------------	-----------	----------	-----------	-----------	-----------

Betrachtet man die negativen und einfach positiven Fälle als eine Gruppe und die zwei- und dreifach positiven als eine zweite Gruppe, so ergibt sich folgendes Ergebnis. Die Tumorzellen zeigen bei Auswertung der gesamten Schnitte zu 82,1% eine schwache bis keine BSP- Expression und zu 17,9% eine mittlere bis starke positive Färbung. Das Stroma hingegen weist zu 84,1% eine mittlere bis starke BSP-Expression auf und nur zu 15,9% eine schwache bis keine Färbung. Dies ist anschaulich in Figur 7 dargestellt.



Figur 7: Auswertung aller Schnitte der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper gegen nicht-glykosyliertes BSP

3.2.2 Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP

Bei der immunhistologischen Färbung mit dem Antikörper gegen glykosyliertes BSP wurde ebenfalls zunächst ausgewertet, wie oft die Fälle als negativ, einfach-, zweifach- oder dreifach- positiv gewertet wurden. Dies zeigt Figur 8 bei Betrachtung der Tumorzellen und Figur 9 bei Untersuchung des Stromas.

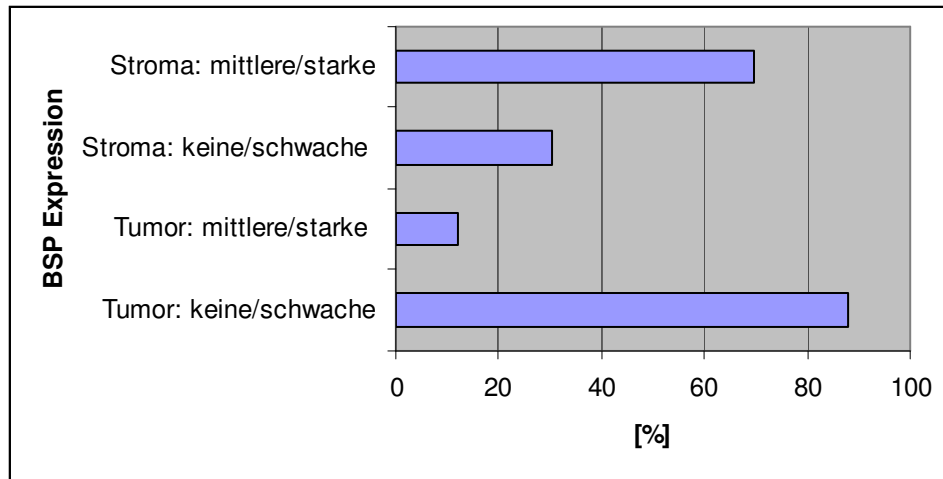
Figur 8: Anzahl der Fälle, die negativ, 1+, 2+ oder 3+ gewertet wurden in Abhängigkeit vom Primärtumor bei Betrachtung der **Tumorzellen** in der Färbung mit dem **Antikörper gegen glykosyliertes BSP**

Primärtumor	Anzahl der Fälle	0	1+	2+	3+
Mamma- Ca	35	27	6	2	0
Prostata- Ca	8	2	4	2	0
Nieren- Ca	13	9	2	2	0
Lungen- Ca	11	3	5	2	1
Schilddrüsen- Ca	5	4	1	0	0
Magen- Darm- Ca	8	5	2	1	0
andere	4	2	2	0	0
insgesamt	84	52	22	9	1

Figur 9: Anzahl der Fälle, die negativ, 1+, 2+ oder 3+ gewertet wurden in Abhängigkeit vom Primärtumor bei Betrachtung des **Stromas** in der Färbung mit dem **Antikörper gegen glykosyliertes BSP**

Primärtumor	Anzahl der Fälle	0	1+	2+	3+
Mamma- Ca	33	2	3	23	5
Prostata- Ca	8	1	0	4	3
Nieren- Ca	13	2	6	4	1
Lungen- Ca	11	0	3	8	0
Schilddrüsen- Ca	5	1	3	1	0
Magen- Darm- Ca	8	0	4	4	0
andere	4	0	0	4	0
insgesamt	82	6	19	48	9

Bildet man hier zwei Gruppen aus negativen und einfach positiven im Gegensatz zu zwei- und dreifach positiven Fällen, so ergibt sich für die Tumorzellen zu 88,1% eine schwache bis keine BSP Expression und zu 11,9% eine mittlere bis starke positive Färbung. Das Stroma zeichnet sich aus mit 30,5%iger schwacher bis keiner BSP Expression und mit 69,5%igem mittleren bis starken positiven Signal. Dies ist graphisch in Figur 10 wiedergegeben.



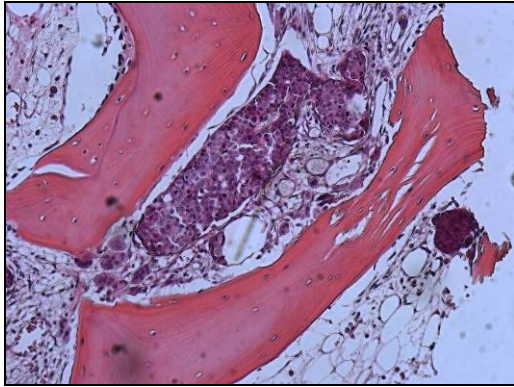
Figur 10: Auswertung aller Schnitte der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper gegen glykosyliertes BSP

3.3 Auswertung:

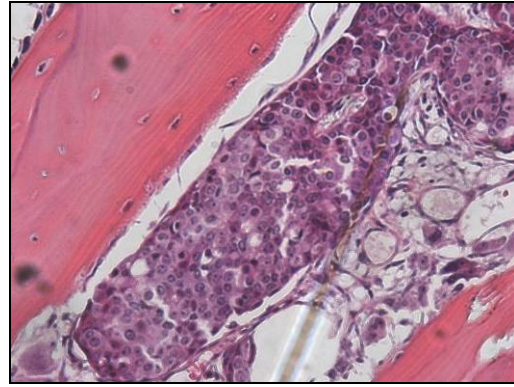
Knochenmetastasen mit Primärtumor Mammakarzinom

Insgesamt bestehen 35 der 84 untersuchten histologischen Schnitte, also 41,7%, aus einer Knochenmetastase eines Mammakarzinoms.

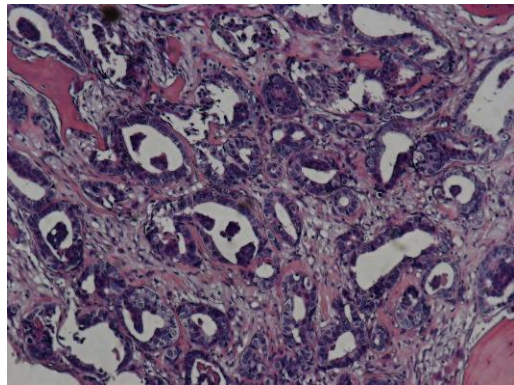
Beispielhaft hierfür werden 2 verschiedene Gewebe mit Knochenmetastasen unterschiedlicher Mammakarzinome mit Bildern vorgestellt (in Figur 4 Nr. 4, 21). Der erste Fall (Figur 4 Nr. 21) zeigt sich in Figur 11 in der Standardfärbung der Pathologie, in Figur 14 in der Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP und in Figur 17 in der Färbung mit dem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP. Der zweite Fall (Figur 4 Nr. 4) wird dargestellt in Figur 12 in der Standardfärbung der Pathologie, in Figur 15 in der Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP und in Figur 18 in der Färbung mit dem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP.



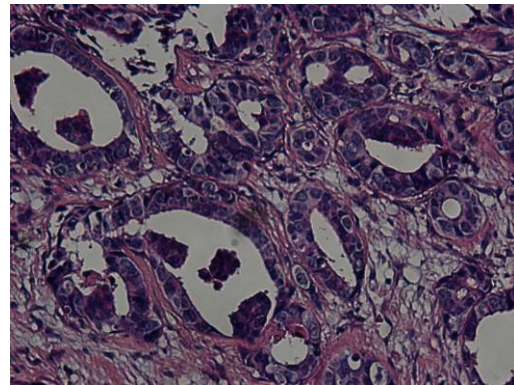
Figur 11a: Knochenmetastase eines Mammakarzinoms, HE- Färbung, 100-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.21)



Figur 11b: Knochenmetastase eines Mammakarzinoms, HE- Färbung, 200-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr. 21)



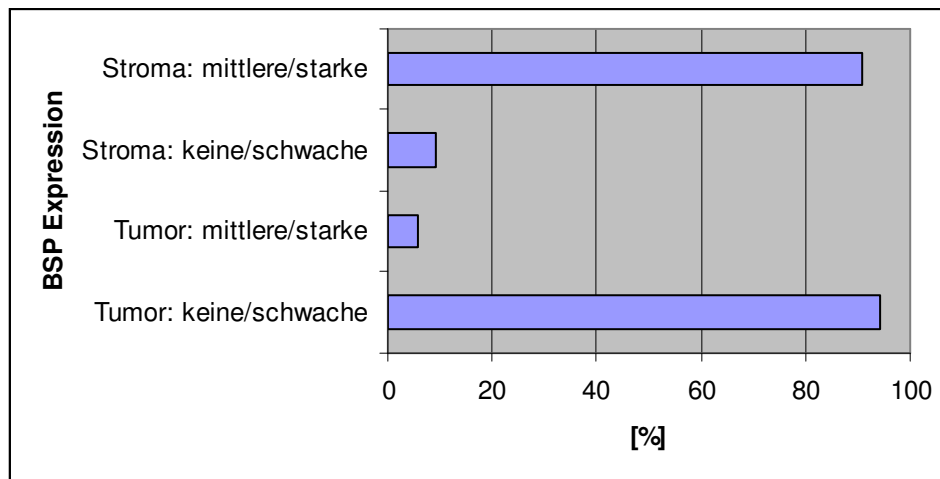
Figur 12a: Knochenmetastase eines Mammakarzinoms, HE- Färbung, 100- fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.4)



Figur 12b: Knochenmetastase eines Mammakarzinoms, HE- Färbung, 200- fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.4)

3.3.1 Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP

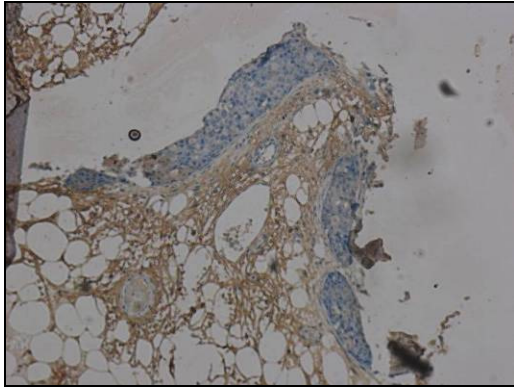
In der immunhistologischen Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP zeigt sich bei den Tumorzellen in 20 Fällen eine negative, in 13 Fällen eine einfach positive, in 2 Fällen eine zweifach positive und in keinem Fall eine dreifach positive BSP Expression. Zusammengefasst stellen 94,3% eine schwache bis keine BSP Expression und nur 5,7% eine mittlere bis starke BSP Expression dar. Das Stroma dagegen zeigt in nur 2 Fällen eine negative und nur einem Fall eine einfach positive BSP Expression, aber in 19 Fällen eine zweifach und in 11 Fällen eine dreifach positive Expression. Dementsprechend ist das positive Signal zu 9,1% schwach bis nicht vorhanden und zu 90,9% mittel bis stark. Dies ist graphisch in Figur 13 dargestellt.



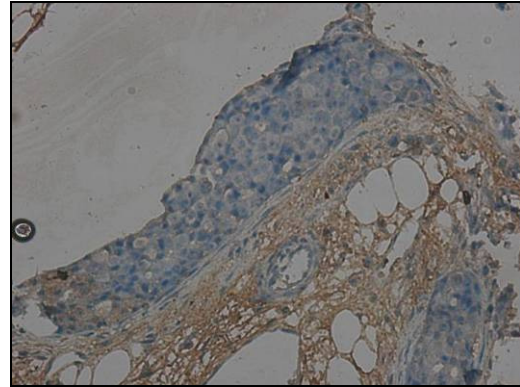
Figur 13: Auswertung aller Schnitte mit dem Primärtumor **Mammakarzinom** in der immunhistochemischen Färbung mit dem **Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP**

Beispiele für die schwache BSP Expression der Tumorzellen und die starke des Stromas in den Schnitten von Knochenmetastasen mit Primärtumor Mammakarzinom ist die Figur 14. Die Figuren 14a und b zeigen negative Tumorzellen und 2+ positives Stroma (siehe Figur 4 (Nr.21) unter 3.2.). Dies sind Schnitte des Gewebes, das in Figur 11a und b in HE Färbung dargestellt ist.

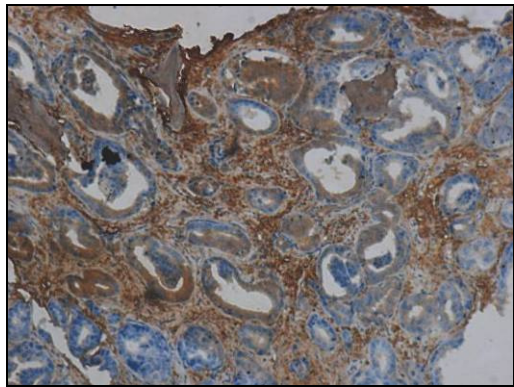
Als Beispiel für ein heterogenes Präparat sind die Figuren 15a und b gezeigt. Die Tumorzellen sind als teils 1+ positiv, teils negativ dokumentiert und das Stroma als 3+ positiv (siehe Figur 4 (Nr.4) unter 3.2.). Dies sind Schnitte des Gewebes, das in Figur 12a und b in HE Färbung dargestellt ist.



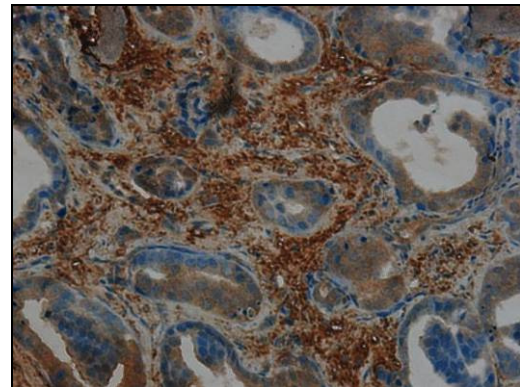
Figur 14a: Knochenmetastase eines Mammakarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr. 21)



Figur 14b: Knochenmetastase eines Mammakarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 200-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.21)



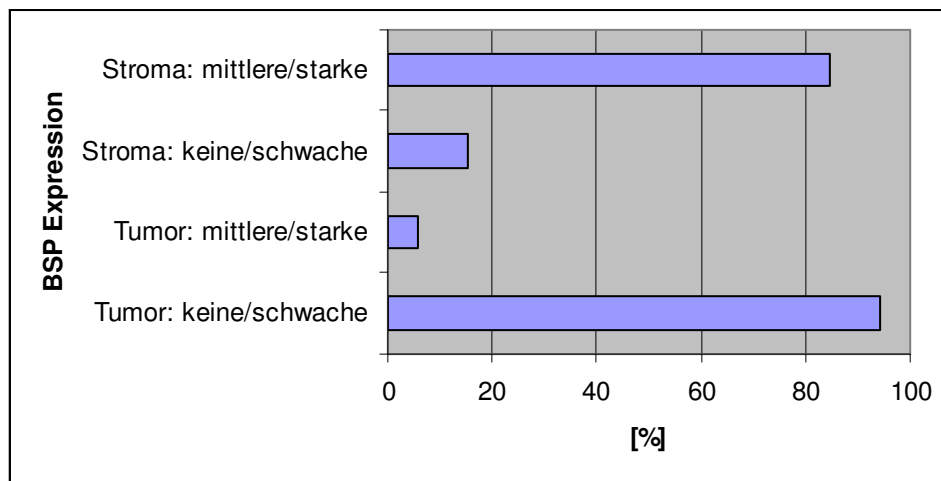
Figur 15a: Knochenmetastase eines Mammakarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.4)



Figur 15b: Knochenmetastase eines Mammakarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 200-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.4)

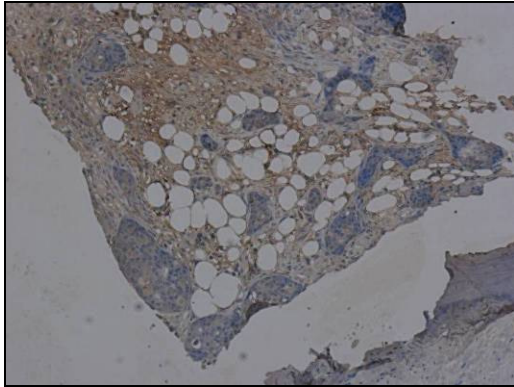
3.3.2 Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP

In der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper gegen glykosyliertes BSP fällt die Auswertung folgendermaßen aus: Die Tumorzellen sind in 27 Fällen als negativ, in 6 Fällen als einfach, in 2 Fällen als zweifach und in keinem Fall als dreifach positiv zu werten. Dies zeigt also zu 94,3% eine schwache bis keine Expression des BSP und zu 5,7% eine mittlere bis starke BSP- Expression. Das Stroma hingegen weist in 2 Fällen kein, in 3 Fällen ein einfach, in 23 Fällen ein zweifach und in 5 Fällen ein dreifach positives Signal auf. Somit zeigen 15,2% ein schwaches bis kein und 84,8% ein mittleres bis starkes Signal. Dies ist anschaulich in Figur 16 aufgezeichnet.

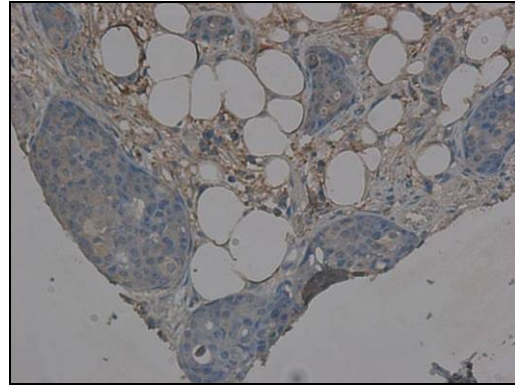


Figur 16: Auswertung aller Schnitte mit dem Primärtumor **Mammakarzinom** in der immunhistochemischen Färbung mit dem **Antikörper gegen glykosyliertes BSP**

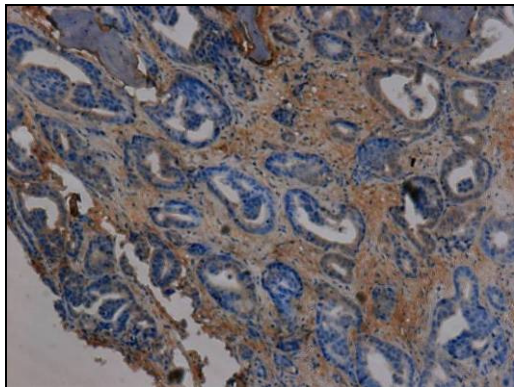
Als charakteristisches Beispiel für diese Färbung eignet sich die Figur 17. Figur 17a und b zeigen in verschiedenen Vergrößerungen negative Tumorzellen und 2+ positives Stroma (siehe Figur 4 (Nr.21) unter 3.2.). Figur 18a und b zeigen negative Tumorzellen und 2+ positives Stroma (siehe Figur 4 (Nr.4) unter 3.2.).



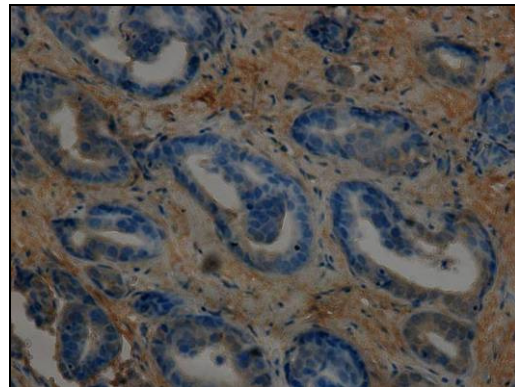
Figur 17a: Knochenmetastase eines Mammakarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.21)



Figur 17b: Knochenmetastase eines Mammakarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP, 200-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr. 21)



Figur 18a: Knochenmetastase eines Mammakarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.4)



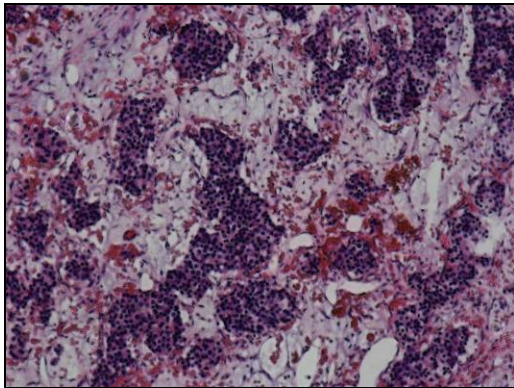
Figur 18b: Knochenmetastase eines Mammakarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP, 200-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.4)

3.4 Auswertung:

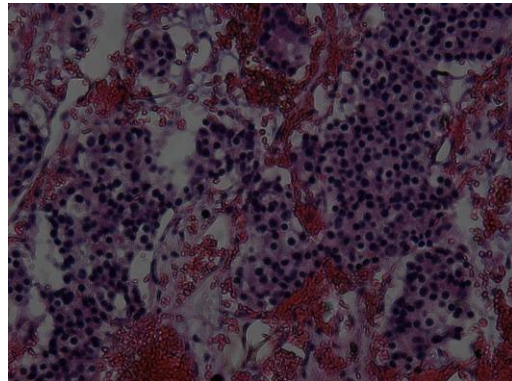
Knochenmetastasen mit Primärtumor Prostatakarzinom

Insgesamt gehen in die Auswertung 8 Gewebeschnitte mit dem Primärtumor Prostatakarzinom ein. Dies stellt lediglich 9,5% aller Gewebeschnitte dar.

Als Beispiel wird der Fall Nr. 36 aus Figur 4 unter 3.2. bildlich dargestellt. Figur 19 zeigt den histologischen Schnitt mit einem den Knochen infiltrierenden Prostatakarzinom in der Standardfärbung der Pathologie. Dasselbe Gewebe wird in Figur 21 mit der Färbung des Antikörpers gegen nicht- glykosyliertes und in Figur 23 mit der Färbung des Antikörpers gegen glykosyliertes BSP dargestellt.



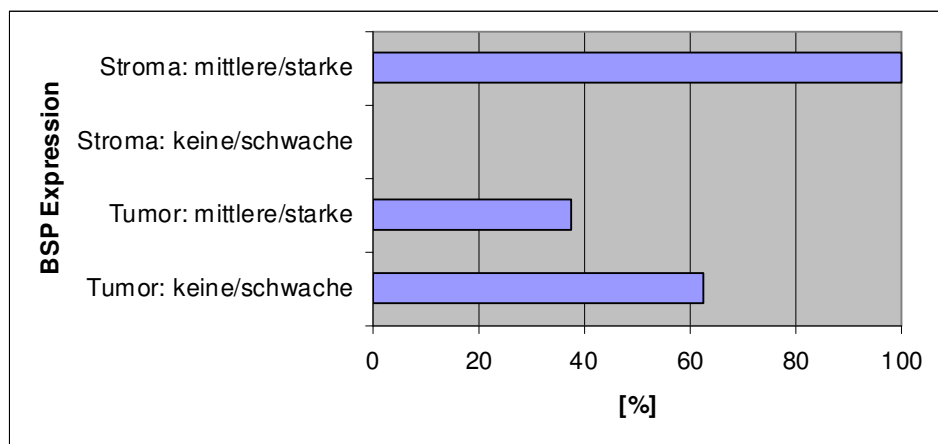
Figur 19a: Knochenmetastase eines Prostatakarzinoms, HE- Färbung, 100-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.36)



Figur 19b: Knochenmetastase eines Prostatakarzinoms, HE- Färbung, 200-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.36)

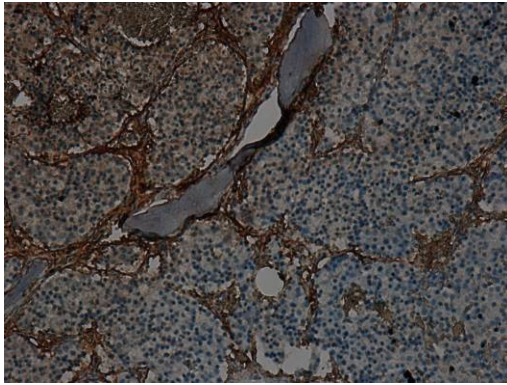
3.4.1 Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP

Die immunhistologische Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP zeigt im Bezug auf die Tumorzellen einen negativen Fall, 4 einfach, 3 zweifach und keine dreifach positive Fälle. Dies stellt also zu 62,5% eine schwache bis keine BSP Expression und zu 37,5% eine mittlere bis starke BSP Expression dar. Das Stroma zeigt in allen Schnitten ein mittelstarkes bis starkes positives Signal, nämlich 5 Fälle mit zweifach und 3 Fälle mit dreifach positiver Wertung. Dies wird in Figur 20 anschaulich dargestellt.

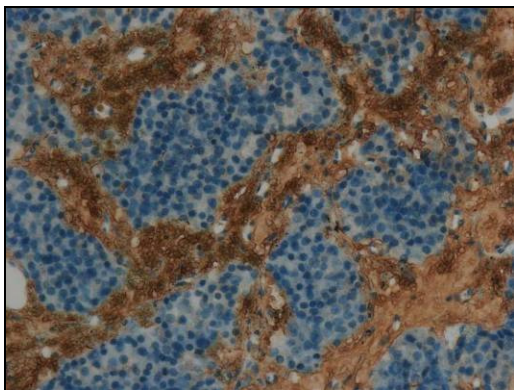


Figur 20: Auswertung aller Schnitte mit Primärtumor **Prostatakarzinom** in der immunhistochemischen Färbung mit dem **Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP**

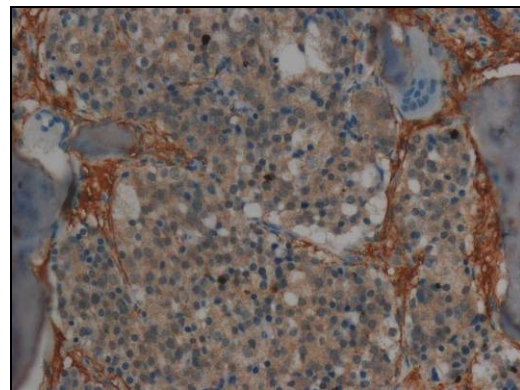
Ein typisches Beispiel für diese Färbung zeigt Figur 21. Diese ist dokumentiert als teils 1-2+ positiv, teils negativ in Bezug auf die Tumorzellen und als 2-3+ positiv bei Betrachtung des Stromas (siehe Figur 4 (Nr.36) unter 3.2.).



Figur 21a: Knochenmetastase eines Prostatakarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.36)



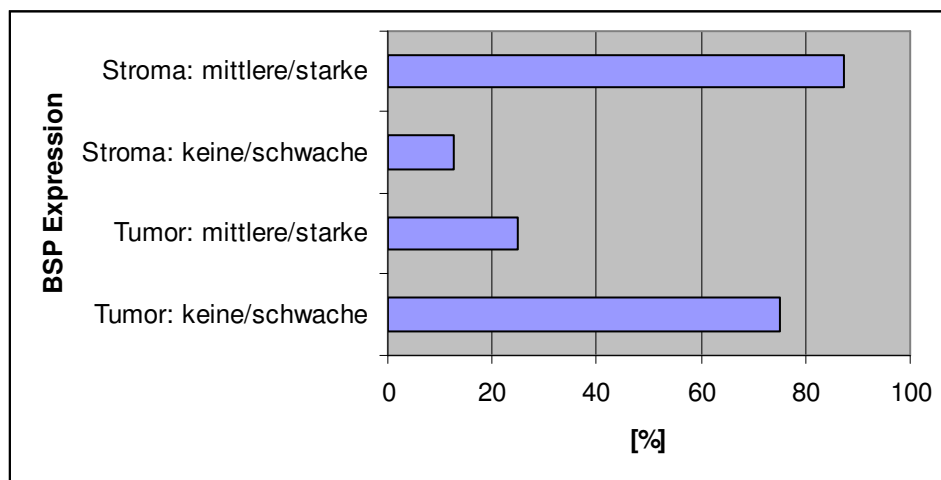
Figur 21b: Knochenmetastase eines Prostatakarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 200-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.36)



Figur 21c: Knochenmetastase eines Prostatakarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 200-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.36)

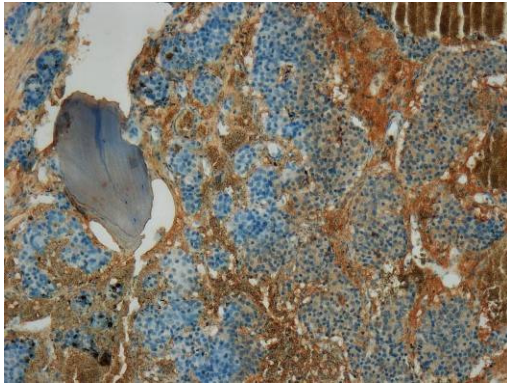
3.4.2 Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP

Die Auswertung der Färbung mit dem Antikörper gegen glykosyliertes BSP zeigt bei den Tumorzellen 2 negative, 4 einfach, 2 zweifach und keine dreifach positiven Fälle. Daraus ergibt sich zu 75,0% eine schwache bis keine BSP-Expression und zu 25,0% eine mittlere bis starke. In Bezug auf das Stroma werden 1 negativer, kein einfach, 4 zweifach und 3 dreifach positive Fälle dargestellt. Somit handelt es sich zu 12,5% um eine schwache bis negative Expression und zu 87,5% um eine mittlere bis starke Expression. Dies ist graphisch in Figur 22 dokumentiert.

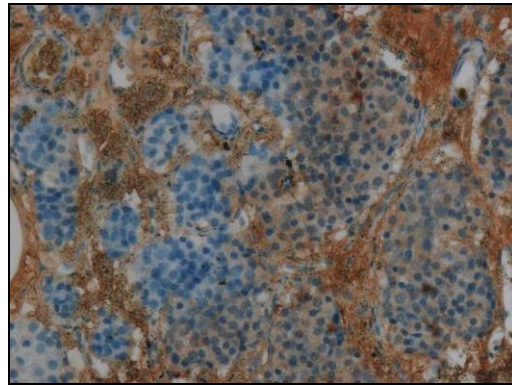


Figur 22: Auswertung aller Schnitte mit Primärtumor **Prostatakarzinom** in der immunhistochemischen Färbung mit dem **Antikörper gegen glykosyliertes BSP**

Zur Dokumentation dieser Färbung ist Figur 26 geeignet. Diese stellt die Tumorzellen als teils 1-2+ positiv, teils negativ und das Stroma als 2-3+ positiv dar (siehe Figur 4 (Nr.36) unter 3.2.).



Figur 23a: Knochenmetastase eines Prostatakarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung (Figur 6, Nr.36)



Figur 23b: Knochenmetastase eines Prostatakarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP, 200-fache Vergrößerung (Figur 6, Nr.36)

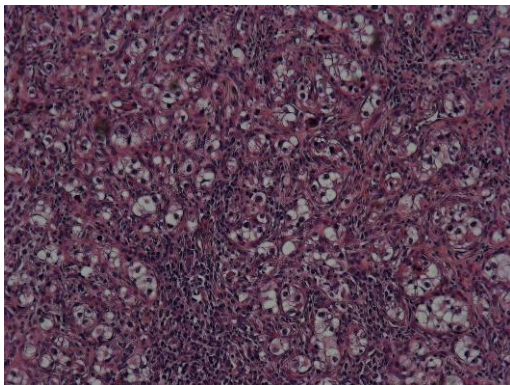
3.5 Auswertung:

Knochenmetastasen mit Primärtumor Nierenkarzinom

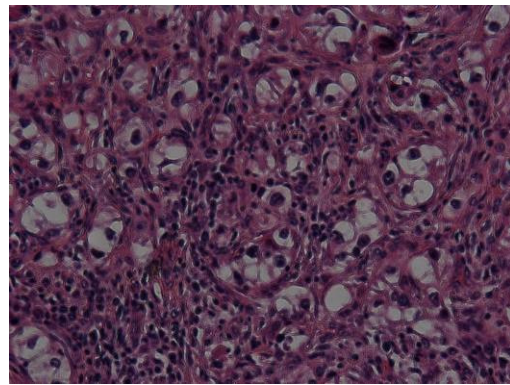
Zu der Untersuchung gehören 13 Fälle von Knochenmetastasen, die von einem Nierenkarzinom ausgehen. Dies sind 15,5% der gesamten Präparate.

Die bildliche Dokumentation zeigt die Knochenmetastase eines klarzelligem Nierenzellkarzinom in Figur 24 in der Standardfärbung der Pathologie, in Figur 27 in der Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP und in Figur 30 in der Färbung mit einem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP.

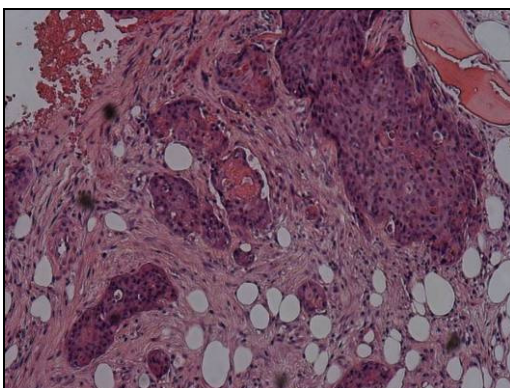
Weiterhin ist Gewebe mit einer Knochenmetastase eines Urothelkarzinoms dargestellt, in Figur 25 in der Standardfärbung der Pathologie, in Figur 28 in der Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP und in Figur 31 in der Färbung mit einem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP.



Figur 24a: Knochenmetastase eines klarzelligem Nierenzellkarzinoms, EL- Färbung, 100-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.44)



Figur 24b: Knochenmetastase eines klarzelligem Nierenzellkarzinoms, EL- Färbung, 200-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.44)

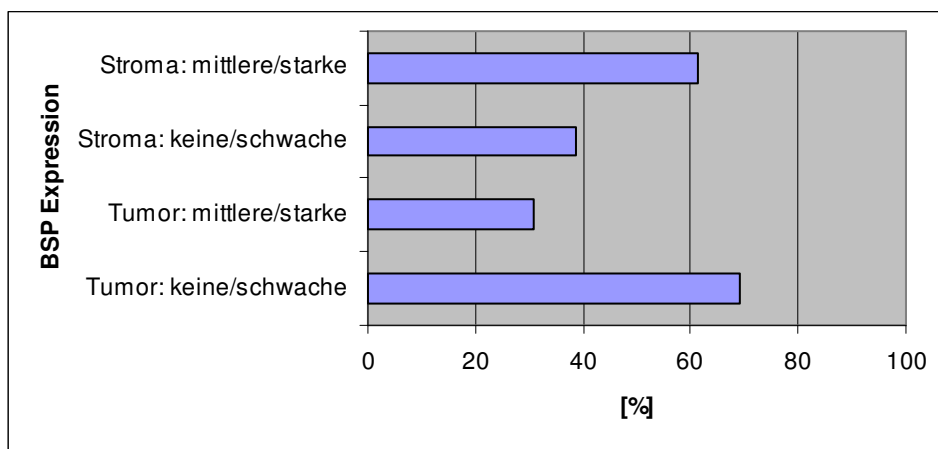


Figur 25: Knochenmetastase eines Urothelkarzinoms, EL- Färbung, 100-fache

Vergrößerung (Figur 4, Nr.45)

3.5.1 Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP

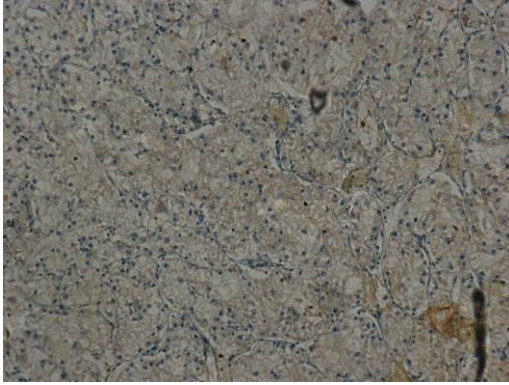
In der immunhistologischen Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP zeigen sich bei Betrachtung der Tumorzellen 7 negative Fälle, außerdem 2 einfach, 3 zweifach und 1 dreifach positive Fälle. Also ergibt sich zu 69,2% eine schwache bis keine und zu 30,8% eine mittlere bis starke BSP Expression der Tumorzellen. Das Stroma hingegen weist 1 negativen Fall, 4 einfach, 5 zweifach und 3 dreifach positive Fälle auf. Damit ist es zu 38,5% schwach bis nicht positiv, beziehungsweise zu 61,5% mittel bis stark positiv dargestellt. Figur 26 zeigt die Auswertung graphisch.



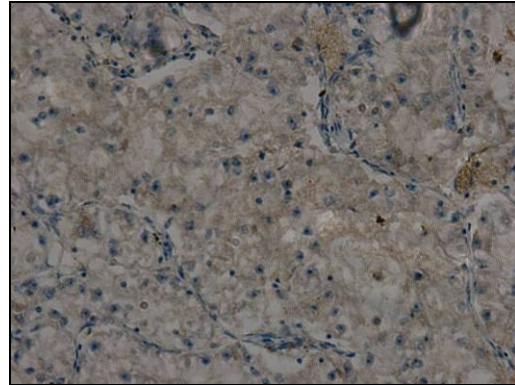
Figur 26: Auswertung aller Schnitte mit dem Primärtumor **Nierenkarzinom** in der immunhistochemischen Färbung mit dem **Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP**

Figur 27 zeigt das in dieser Immunhistologie typische Bild eines infiltrierenden klarzelligen Nierenkarzinoms. Die Tumorzellen sind negativ (siehe Figur 4 (Nr.44) unter 3.2.).

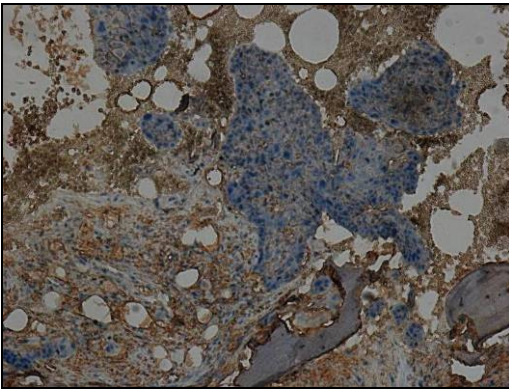
Figur 28 stellt ein Urothel- Ca dar, das teils 1+ positive, teils negative Tumorzellen und 2+ positives Stroma zeigt (siehe Figur 4 (Nr.45) unter 3.2.).



Figur 27a: Knochenmetastase eines Nierenzellkarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.44)



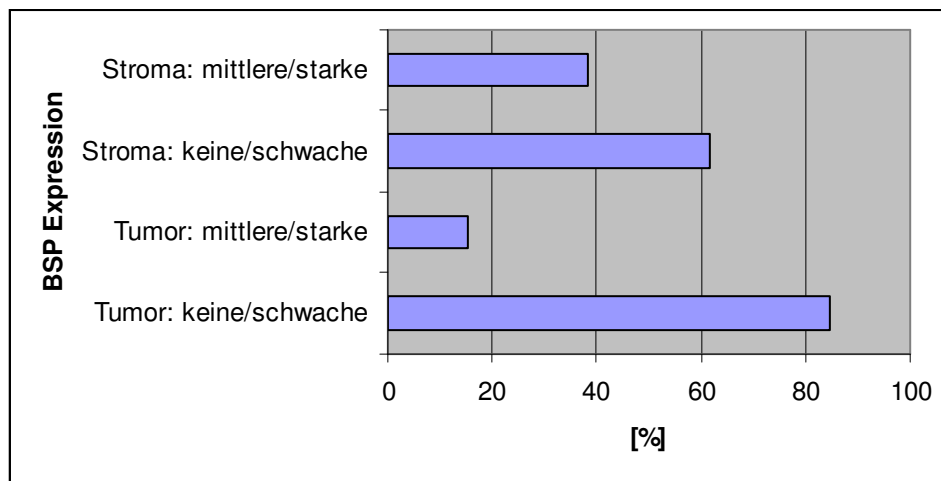
Figur 27b: Knochenmetastase eines Nierenzellkarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 200-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr. 44)



Figur 28: Knochenmetastase eines Urothelkarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.45)

3.5.2 Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP

Die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen glykosyliertes BSP zeigt im Bezug auf die Tumorzellen zu 84,6% eine schwache bis keine BSP Expression, zu 15,4% eine mittlere bis starke. Dies setzt sich zusammen aus 9 Fällen, die negativ gewertet wurden, und 2 einfach, 2 zweifach und kein dreifach positive Fälle. Das Stroma lässt sich zu 61,5% mit einer schwachen bis keiner und zu 38,5% mit einer mittleren bis starken BSP Expression dokumentieren. Hierbei handelt es sich um 2 negative, 6 einfach, 4 zweifach und 1 dreifach positive Fälle. Dies ist in Figur 29 anschaulich zusammengefasst.

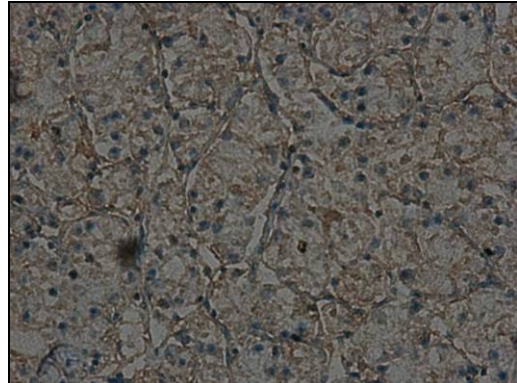


Figur 29: Auswertung aller Schnitte mit dem Primärtumor **Nierenkarzinom** in der immunhistochemischen Färbung mit dem **Antikörper gegen glykosyliertes BSP**

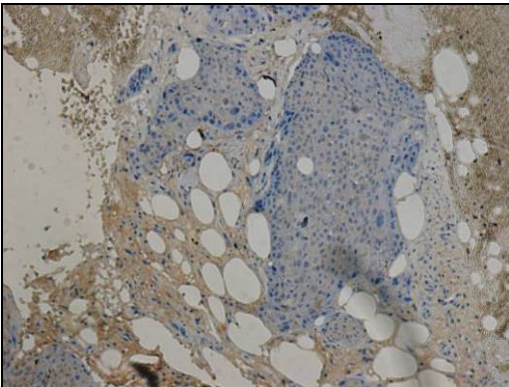
Ein Beispiel für diese immunhistochemische Färbung sind die Figuren 30 und 31. Figur 30 stellt eine typische Metastase eines klarzelliges Nierenkarzinoms mit negativen Tumorzellen dar (siehe Figur 4 (Nr.44) unter 3.2.). In Figur 31 sind die Tumorzellen eines Urothelkarzinoms ebenfalls als negativ, das Stroma als teils 2+ positiv, teils negativ zu dokumentieren (siehe Figur 4 (Nr. 45) unter 3.2.).



Figur 30a: Knochenmetastase eines Nierenzellkarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.44)



Figur 30b: Knochenmetastase eines Nierenzellkarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP, 200-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.44)



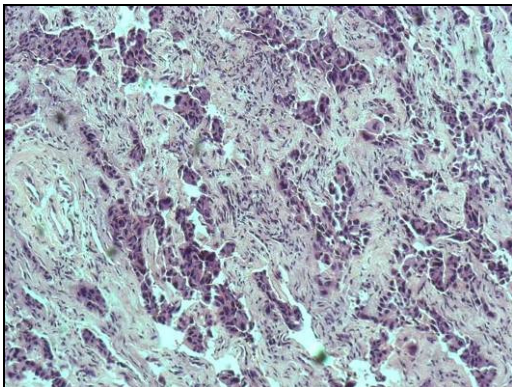
Figur 31: Knochenmetastase eines Urothelkarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.45)

3.6 Auswertung:

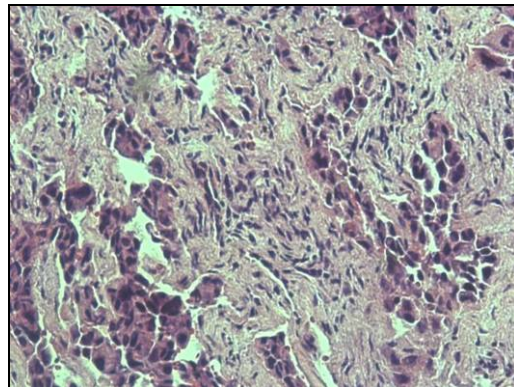
Knochenmetastasen mit Primärtumor Lungenkarzinom

Insgesamt sind 11 der 84 Präparate, und damit 13,1%, Knochenmetastasen mit Primärtumor eines Lungenkarzinoms.

Figur 32 zeigt einen histologischen Schnitt hierzu in der Standardfärbung der Pathologie. Das Gewebe aus Figur 4 Nr. 62 soll hier in Bildern dargestellt werden.



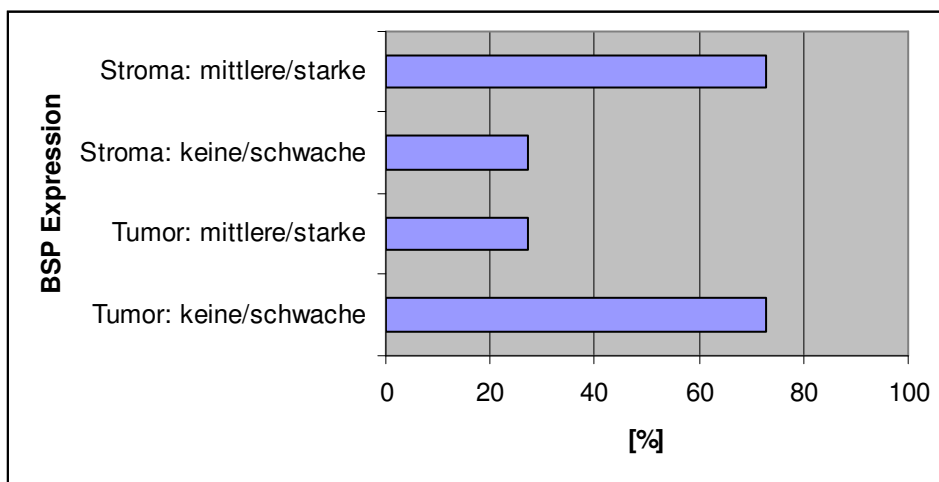
Figur 32a: Knochenmetastase eines Bronchialkarzinoms, EL- Färbung, 100-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr. 62)



Figur 32b: Knochenmetastase eines Bronchialkarzinoms, EL- Färbung, 200-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.62)

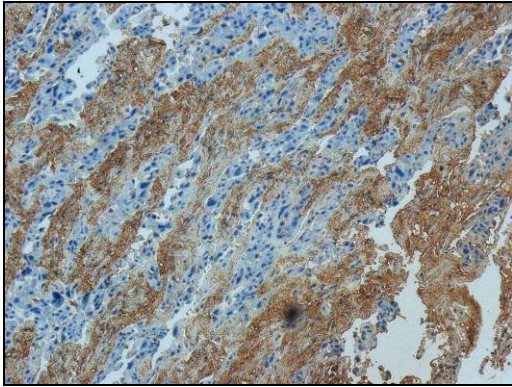
3.6.1 Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP

In der immunhistologischen Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP stellen sich die Tumorzellen in 3 Fällen als negativ, in 5 Fällen als einfach, in 2 Fällen als zweifach und in einem Fall als dreifach positiv dar. Damit ergibt sich zu 72,7% eine schwache bis keine und zu 27,3% eine mittlere bis starke BSP Expression. Das Stroma hingegen weist in 3 Fällen eine einfach und in 8 Fällen eine zweifach positive Färbung auf. Also zeigt es zu 27,3% ein schwaches bis kein und zu 72,7% ein mittleres bis starkes positives Signal. Dies ist graphisch in Figur 33 veranschaulicht.

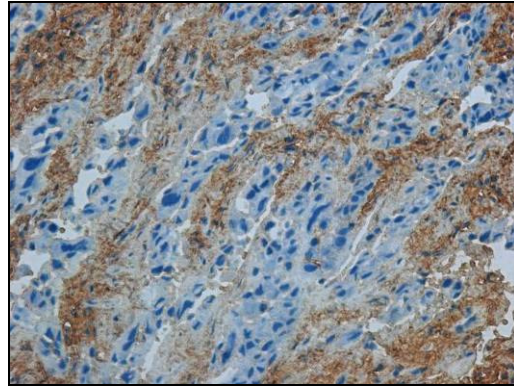


Figur 33: Auswertung aller Schnitte mit dem Primärtumor **Lungenkarzinom** in der immunohistochemischen Färbung mit dem **Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP**

Figur 34 zeigt ein charakteristisches Präparat hierfür. Die Tumorzellen sind negativ, das Stroma ist 2+ positiv (siehe Figur 4 (Nr.62) unter 3.2.).



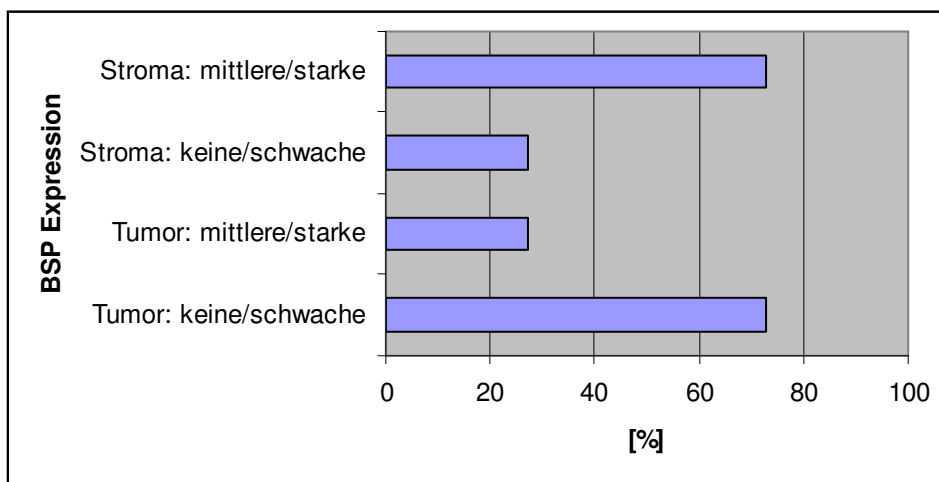
Figur 34a: Knochenmetastase eines Bronchialkarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.62)



Figur 34b: Knochenmetastase eines Bronchialkarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 200-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.62)

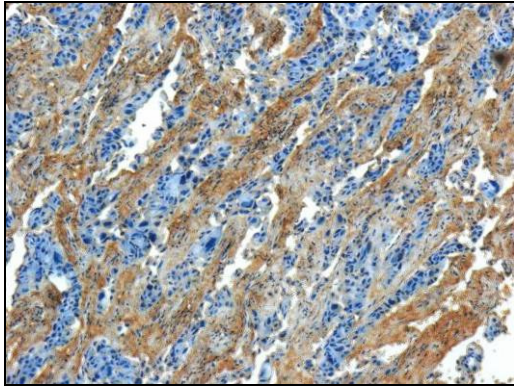
3.6.2 Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP

In der immunhistochemischen Färbung mit Antikörper gegen glykosyliertes BSP sieht man in Bezug auf die Tumorzellen zu 72,7% eine schwache bis keine und zu 27,3% eine mittlere bis starke BSP Expression. Dies setzt sich wie folgt zusammen: 3 negative, 5 einfach, 2 zweifach und 1 dreifach positiver Fall. Beim Stroma ist es umgekehrt. Hier fallen bei 27,3% ein schwaches bis kein und bei 72,7% ein mittleres bis starkes positives Signal auf. Hierbei handelt es sich um 3 einfach und 8 zweifach positive Fälle. Dies ist in Figur 35 anschaulich gemacht.

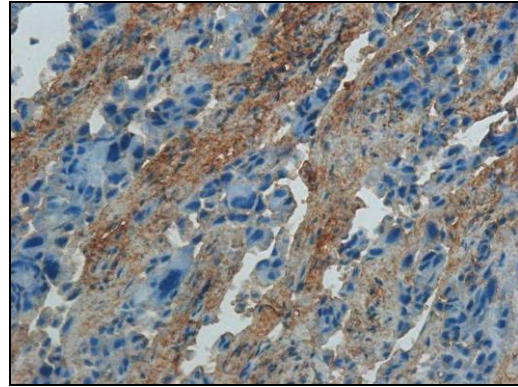


Figur 35: Auswertung aller Schnitte mit dem Primärtumor **Lungenkarzinom** in der immunhistochemischen Färbung mit **Antikörper gegen glykosyliertes BSP**

Figur 36 stellt für diese Färbung ein Beispiel dar. Die Tumorzellen sind negativ, das Stroma ist 2+ positiv (siehe Figur 4 (Nr.62) unter 3.2.).



Figur 36a: Knochenmetastase eines Bronchialkarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.62)



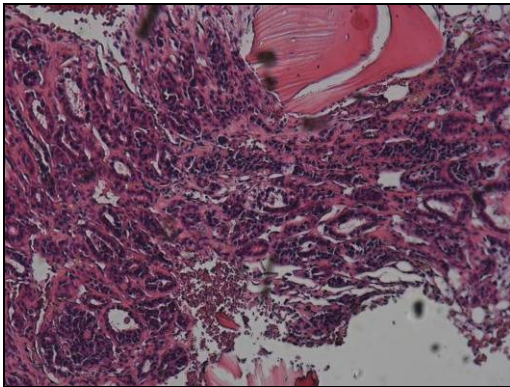
Figur 36b: Knochenmetastase eines Bronchialkarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP, 200-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.62)

3.7 Auswertung:

Knochenmetastasen mit Primärtumor Schilddrüsenkarzinom

In die Untersuchung gingen 5 Gewebeschnitte mit einem den Knochen infiltrierenden Schilddrüsenkarzinom ein. Dies stellt nur 6% des Gesamtkollektivs dar.

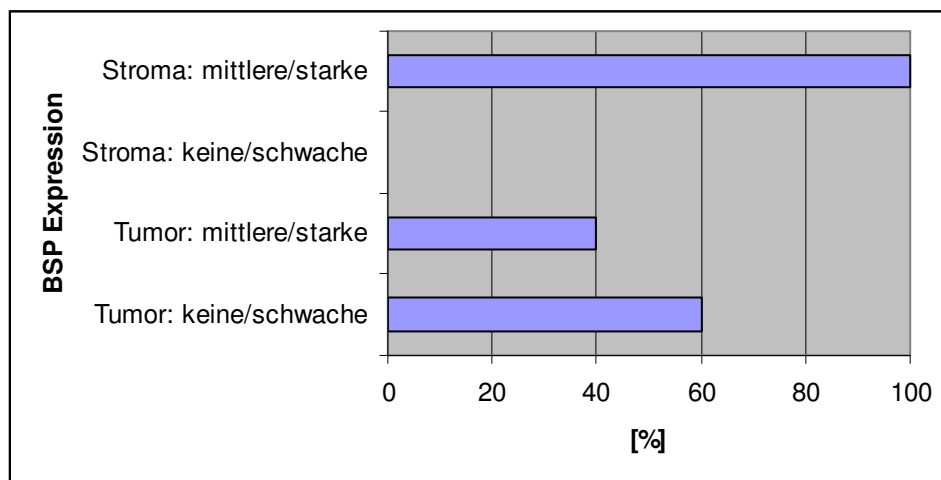
Figur 37 zeigt einen typischen histologischen Schnitt hierfür in der Standardfärbung der Pathologie. Aus demselben Gewebe stammen die Figuren 39 und 41, die die Antikörperfärbungen darstellen. Das Gewebe stellt Nr. 72 in Figur 4 dar.



Figur 37: Knochenmetastase eines Schilddrüsenkarzinoms, HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung

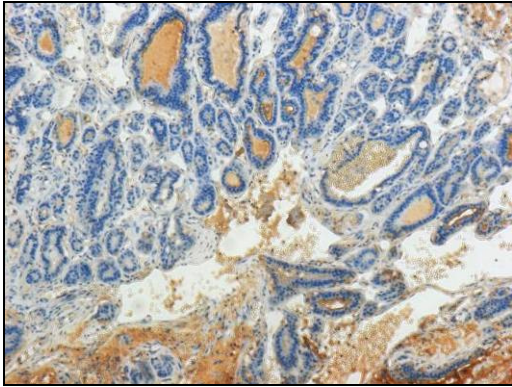
3.7.1 Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP

In der immunhistologischen Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP weisen in Bezug auf die Tumorzellen 2 Fälle eine negative, 1 Fall eine einfach, 1 Fall eine zweifach und 1 Fall eine dreifach positive Färbung auf. Daraus ergibt sich zu 60,0% eine schwache bis keine und zu 40,0% eine mittlere bis starke BSP Expression. Das Stroma zeigt in 4 Fällen eine zweifach und in einem Fall eine dreifach positive Färbung und ist damit in allen Fällen mit einer mittleren bis starken BSP Expression charakterisiert. Dies ist anschaulich in Figur 38 dargestellt.

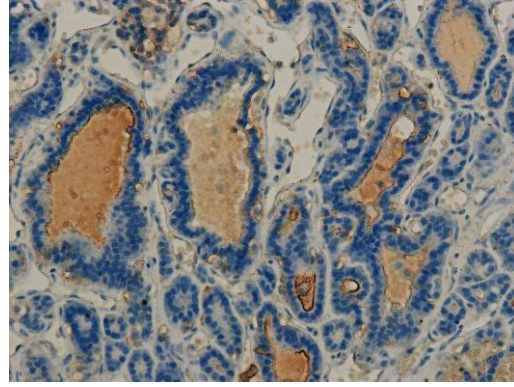


Figur 38: Auswertung aller Schnitte mit dem Primärtumor **Schilddrüsenkarzinom** in der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP

Figur 39 zeigt eine infiltrierendes follikuläres Schilddrüsenkarzinom, dessen Tumorzellen als teils 1+ positiv, teils negativ und dessen Stroma als teils 2+ positiv, teils negativ charakterisiert sind. Auf der Fotografie sind die negativen Anteile dargestellt (siehe Figur 4 (Nr.72) unter 3.2.).



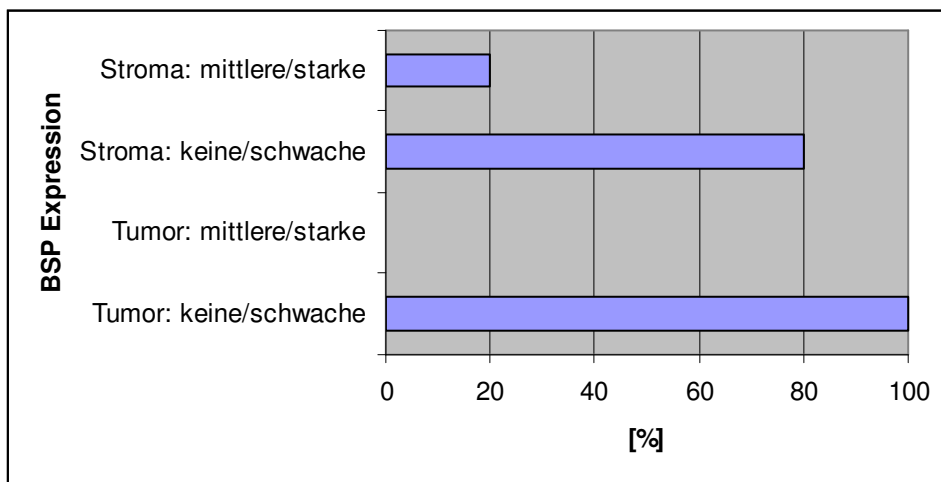
Figur 39a: Knochenmetastase eines Schilddrüsenkarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung (Figur4, Nr.72)



Figur 39b: Knochenmetastase eines Schilddrüsenkarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 200-fache Vergrößerung (Figur4, Nr.72)

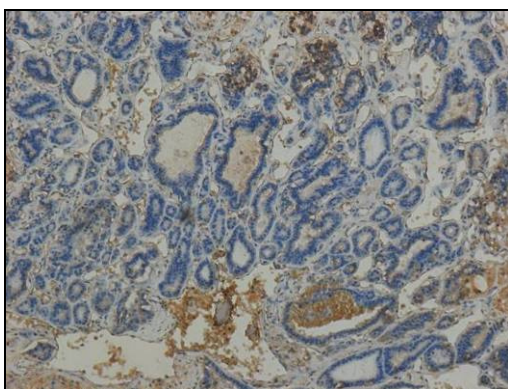
3.7.2 Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP

In der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper gegen glykosyliertes BSP stellen sich annähernd alle Tumorzellen mit einer schwachen bis keiner BSP Expression dar, nämlich 4 negative Fälle und 1 einfach positiver Fall. Das Stroma zeigt zu 80,0% schwache bis keine und zu 20,0% mittlere bis starke positive Signale. Die Anfärbung des Stromas setzt sich wie folgt zusammen: 1 negativer Fall, 3 einfach positive Fälle und 1 zweifach positiver Fall. Dies ist in Figur 40 veranschaulicht.

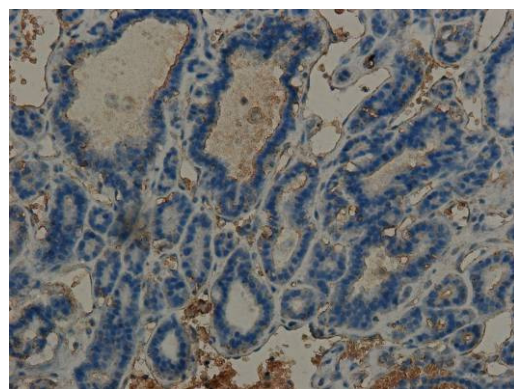


Figur 40: Auswertung aller Schnitte mit dem Primärtumor **Schilddrüsenkarzinom** in der immunhistochemischen Färbung mit dem **Antikörper gegen glykosyliertes BSP**

Ein Beispiel für diese Färbung ist Figur 41. Die Tumorzellen sind als negativ, das Stroma als teils 2+ positiv, teils negativ dokumentiert (siehe Figur 4 (Nr.72) unter 3.2.).



Figur 41a: Knochenmetastase eines Schilddrüsenkarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.72)



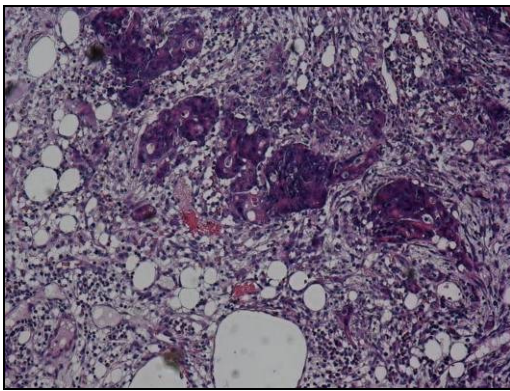
Figur 41b: Knochenmetastase eines Schilddrüsenkarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP, 200-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.72)

3.8 Auswertung:

Knochenmetastasen mit Primärtumor Karzinom im Bereich des Magendarmtrakts

Der Arbeit liegen 8 Fälle von Knochenmetastasen zugrunde, die ihren Ursprung im Bereich des Magendarmtrakts haben. Dies entspricht 9,5% des Gesamtkollektivs.

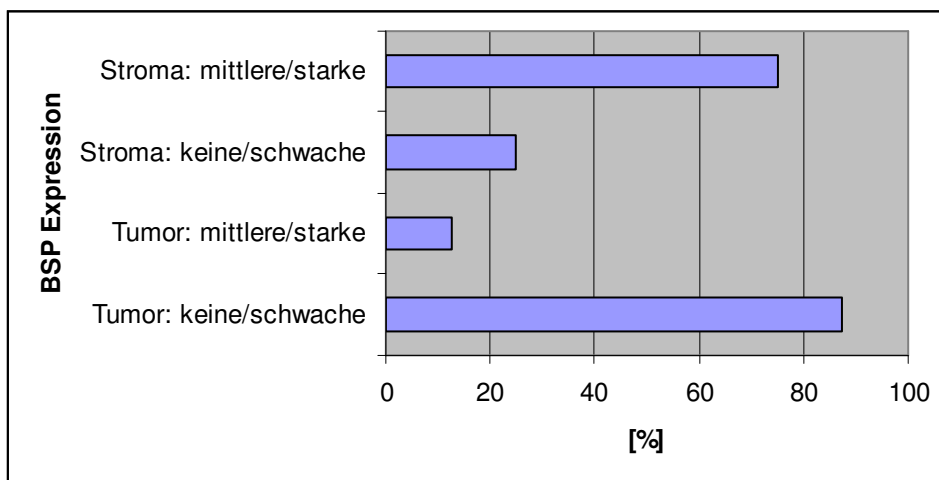
Figur 42 zeigt den histologischen Schnitt einer Knochenmetastase mit dem Primärtumor eines Kolonkarzinoms in der Standardfärbung der Pathologie. Dasselbe Gewebe in den Antikörperfärbungen zeigt Figur 44 und 46.



Figur 42: Knochenmetastase eines Kolonkarzinoms, HE- Färbung, 100-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.73)

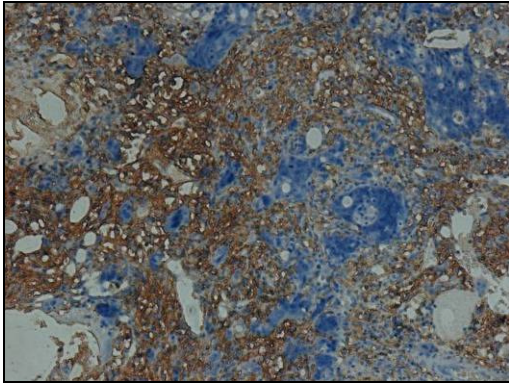
3.8.1 Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP

In der immunhistologischen Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP zeigen die Tumorzellen 87,5% eine schwache bis keine und zu 12,5% eine mittlere bis starke BSP Expression. Dies setzt sich zusammen aus 4 negativen Fällen, 3 einfach positiven Fällen und einem dreifach positiven Fall. Das Stroma dagegen weist zu 25,0% ein schwaches bis kein und zu 75,0% ein mittleres bis starkes positives Signal auf. Hierbei zeigten sich 2 einfach, 3 zweifach und 3 dreifach positive Fälle. Dies ist in Figur 43 veranschaulicht.

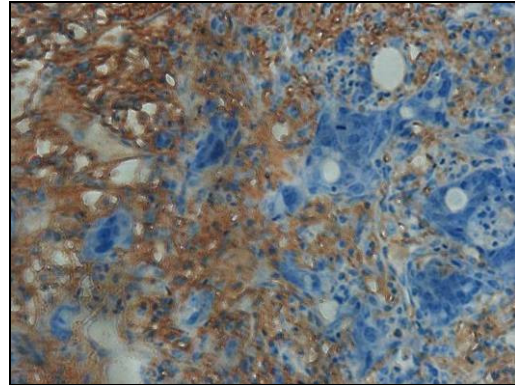


Figur 43: Auswertung aller Schnitte mit dem **Primärtumor im Bereich des Magendarmtrakts** in der immunhistochemischen Färbung mit dem **Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP**

Ein charakteristisches Beispiel für diese Färbung ist in Figur 44 zu sehen. Dies zeigt ein infiltrierendes Kolonkarzinom, dessen Tumorzellen negativ und dessen Stroma 2+ positiv ist (siehe Figur 4 (Nr. 73) unter 3.2.).



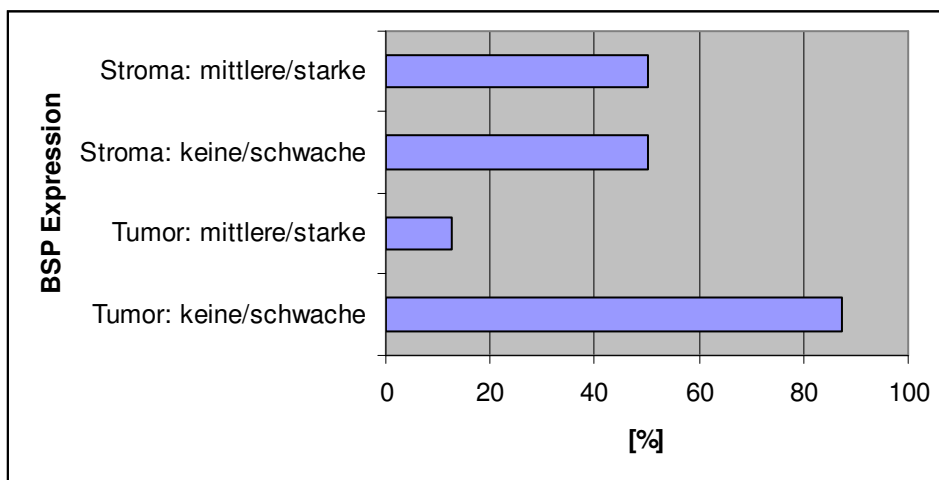
Figur 44a: Knochenmetastase eines Kolonkarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 100- fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.73)



Figur 44b: Knochenmetastase eines Kolonkarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 200- fache Vergrößerung (Figur 4, Nr. 73)

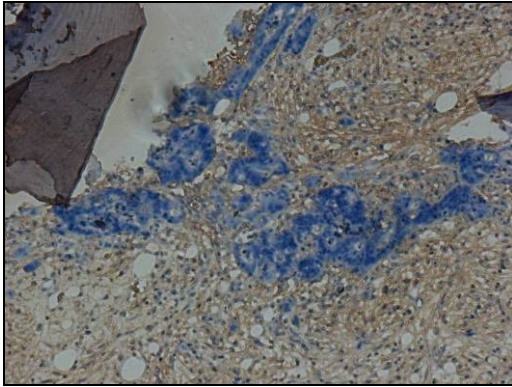
3.8.2 Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP

Bei Betrachtung der Tumorzellen in der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper gegen glykosyliertes BSP stellen sich 5 negative, 2 einfach positive und 1 zweifach positiver Fall dar. Die Tumorzellen sind damit zu 87,5% schwach bis nicht positiv und zu 12,5% mittel bis stark positiv. Die Situation im Stroma ist folgendermaßen: 4 Fälle einfach positiv und 4 Fälle zweifach positiv. So zeigt sich zu 50,0% eine schwache bis keine und zu 50,0% eine mittlere bis starke BSP Expression. Dies ist in Figur 45 anschaulich abgebildet.

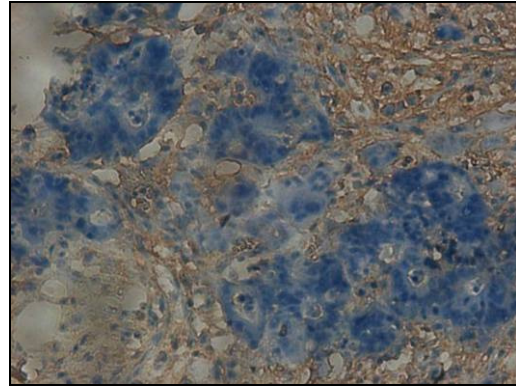


Figur 45: Auswertung aller Schnitte mit dem **Primärtumor im Bereich des Magendarmtrakts** in der immunhistochemischen Färbung mit dem **Antikörper gegen glykosyliertes BSP**

Figur 46 zeigt die Metastase eines Kolonkarzinoms. Die Tumorzellen sind negativ, das Stroma ist teils 1+ positiv, teils negativ (siehe Figur 4 (Nr.73) unter 3.2.)



Figur 46a: Knochenmetastase eines Kolonkarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr. 73)



Figur 46b: Knochenmetastase eines Kolonkarzinoms, Färbung mit einem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP, 200-fache Vergrößerung (Figur 4, Nr.73)

3.9 Auswertung:

Knochenmetastasen mit Primärtumor eines selteneren Karzinoms

Insgesamt sind unter den 84 Gewebeschnitten 4 Präparate, deren Primärtumoren ein Aesthesioneuroblastom, ein Parotiskarzinom und zwei Plattenepithelkarzinome aufweisen. Die Ergebnisse sollen kurz erläutert werden.

3.9.1 Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP

In der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP zeigen nahezu alle Tumorzellen eine schwache bis keine BSP Expression. Das Stroma dagegen wird nahezu immer mit einem mittleren bis starken positiven Signal dokumentiert.

3.9.2 Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP

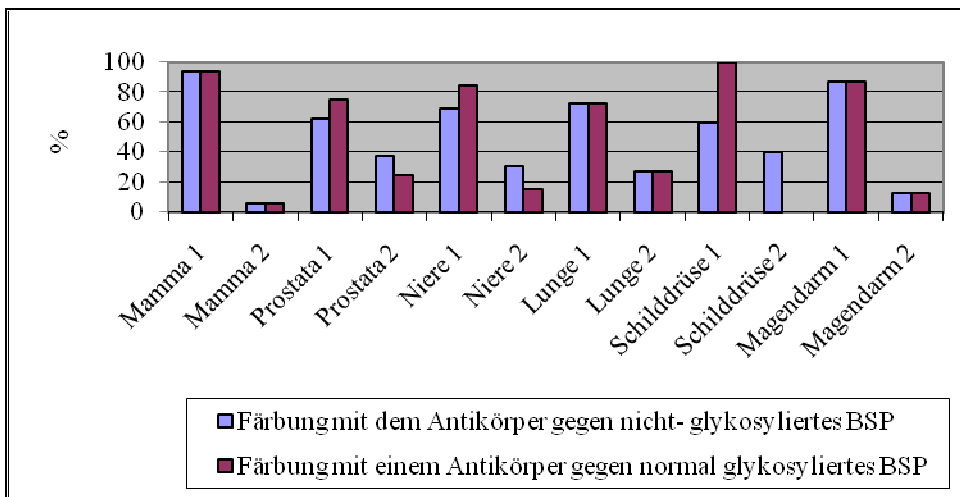
Bei der Färbung mit dem Antikörper gegen glykosyliertes BSP weisen die Tumorzellen fast alle eine schwache bis keine BSP Expression auf. Bei Betrachtung des Stromas fällt nahezu immer ein mittleres bis starkes BSP Signal auf.

3.10 Vergleich der verschiedenen Primärtumoren

3.10.1 Vergleich der verschiedenen Primärtumoren in Bezug auf die Tumorzellen

Nachdem nun die einzelnen Gewebeschnitte aufgeteilt nach Primärtumoren dargestellt sind, werden diese jetzt in Bezug auf die Färbung der Tumorzellen verglichen.

Figur 47 stellt zwei Gruppen (1 und 2) dar. Gruppe 1 steht für die schwache und Gruppe 2 für die starke BSP Expression. Jede Gruppe ist in Abhängigkeit zu der Lokalisation ihres Primärtumors dargestellt und gibt an, wieviel Prozent der Tumorzellen schwach beziehungsweise stark positiv sind.

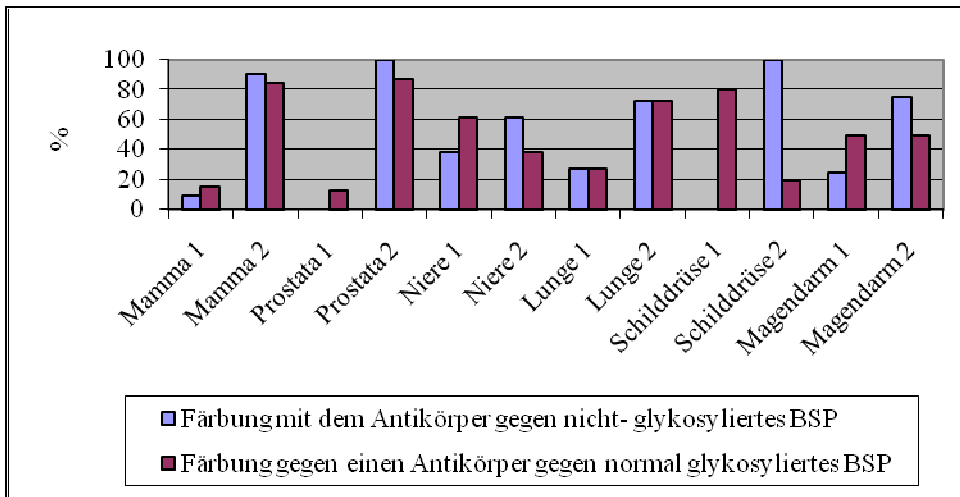


Figur 47: Gegenüberstellung der Färbungen mit den Antikörpern gegen nicht- glykosyliertem (blau) und glykosyliertem (rot) BSP in Bezug auf die **Tumorzellen**. Aufgelistet ist die jeweilige Lokalisation der Primärtumoren zu den Knochenmetastasenschnitten. Gruppe 1 bezeichnet die **schwache** und Gruppe 2 die **starke BSP Expression**.

3.10.2 Vergleich der verschiedenen Primärtumoren in Bezug auf das Stroma

Nun möchte ich die einzelnen Gewebeschnitte aufgeteilt nach Primärtumoren in Bezug auf die Färbung des Stromas darstellen.

Figur 48 ist analog zu Figur 47 unter 3.10.1. aufgebaut, allerdings in Bezug auf die Auswertung des Stromas.

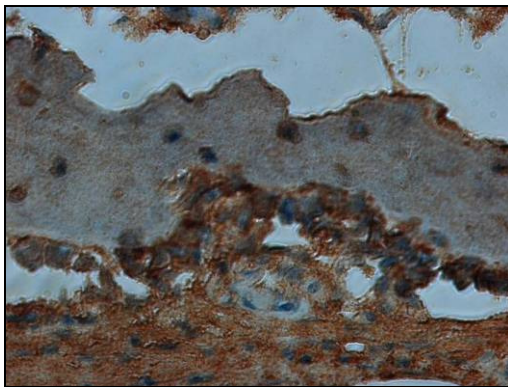


Figur 48: Gegenüberstellung der Färbungen mit den Antikörpern gegen nicht- glykosyliertes (blau) und glykosyliertes (rot) BSP in Bezug auf das **Stroma**. Aufgelistet ist die jeweilige Lokalisation der Primärtumoren zu den Knochenmetastasenschnitten. Gruppe 1 bezeichnet die **schwache** und Gruppe 2 die **starke BSP Expression**.

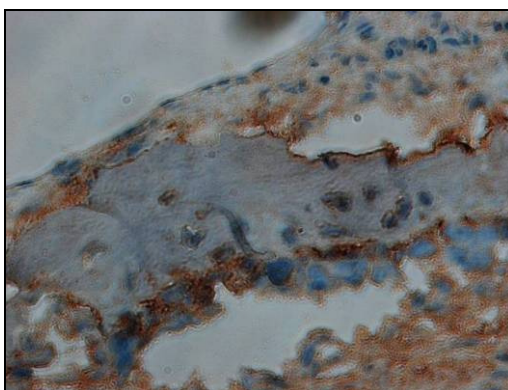
3.11 Situation im normalen Knochen

Neben dem hier im Vordergrund stehenden Aspekts der BSP Expression in der Tumormetastase, wird auch die BSP Expression im normalen Knochengewebe dargestellt. BSP wird exprimiert von Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten und Chondrozyten. Beispiele für die BSP Expression dieser Zellen zeigen die Figuren 49 bis 53. In den Figuren 54 bis 57 sind Gefäße und Nerven in der immunhistochemischen Färbung dargestellt.

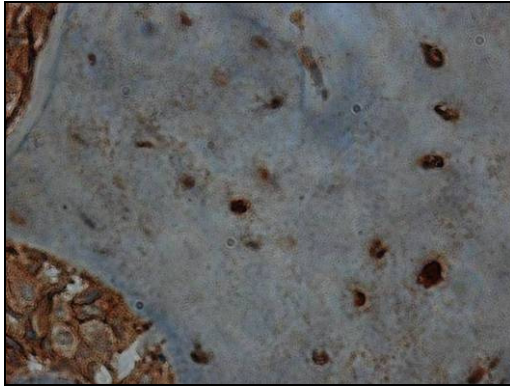
Dabei wird die Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP (Figur 49, 51, 53, 54, 56) mit der Färbung mit dem Antikörper gegen glykosyliertes BSP (Figur 50, 52, 55, 57) verglichen. Bei der Betrachtung der Schnitte gibt es keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Antikörpern.



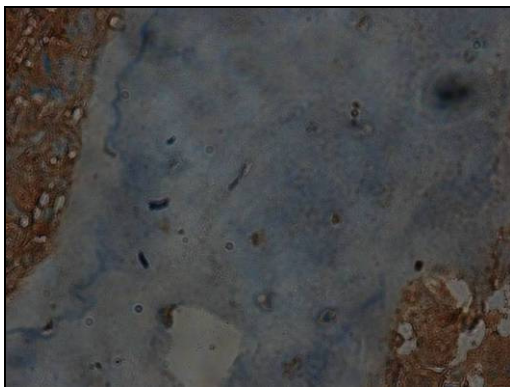
Figur 49: Osteoblasten, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 400-fache Vergrößerung



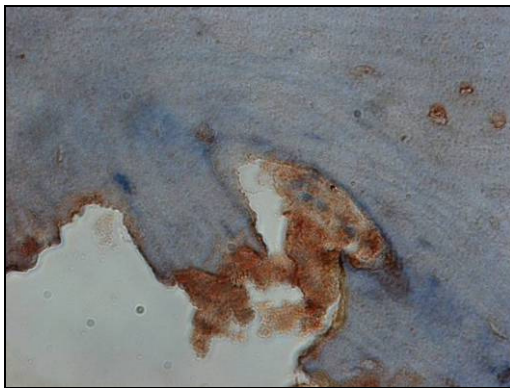
Figur 50: Osteoblasten, Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP, 400-fache Vergrößerung



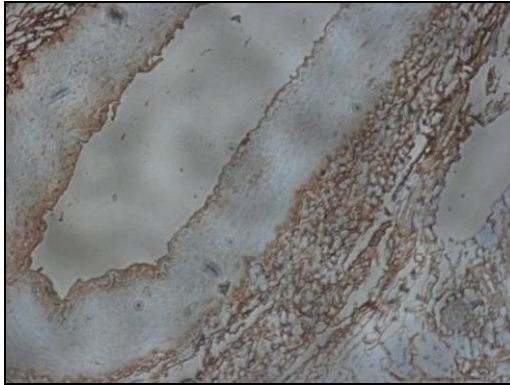
Figur 51: Osteozyten, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 400-fache Vergrößerung



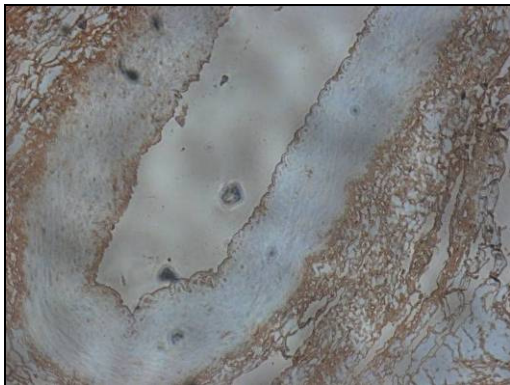
Figur 52: Osteozyten, Färbung mit einem Antikörper gegen glykosyliertes BSP, 400-fache Vergrößerung



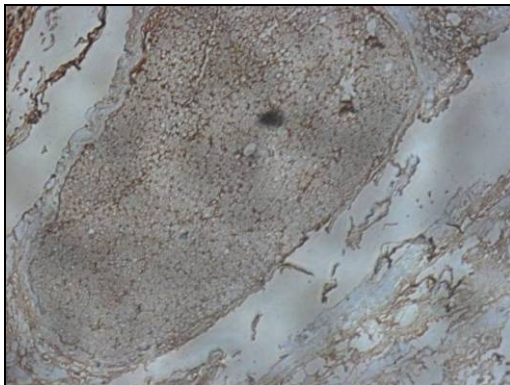
Figur 53: Osteoklasten, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 400-fache Vergrößerung



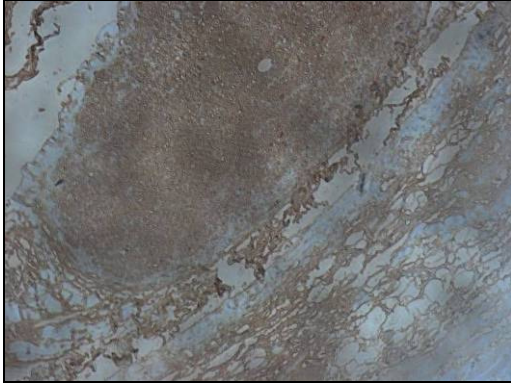
Figur 54: Gefäß, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung



Figur 55: Gefäß, Färbung mit einem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung



Figur 56: Nerv, Färbung mit einem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung



Figur 57: Nerv, Färbung mit einem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP, 100-fache Vergrößerung

4 DISKUSSION

4.1 Einleitung

Knochensialoprotein (BSP) ist ein Protein der extrazellulären Matrix, das vor allem im Knochen und in mineralisierten Geweben vorkommt. Es wird aber auch von verschiedenen Tumorzellen exprimiert. Dies wurde unter anderem nachgewiesen für das Mammakarzinom (Bellahcene et al., 1994), Prostatakarzinom (Waltregny et al., 1998), Lungenkarzinom (Bellahcene et al., 1997), Schilddrüsenkarzinom (Bellahcene et al., 1998) und Nierenkarzinom (Fisher et al., 2004). Die Expression von BSP beim Mammakarzinom ist assoziiert mit einer schlechten Prognose und dem erhöhten Risiko für eine spätere Knochenmetastasierung (Bellahcene et al., 1996 b, c). Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Serum-BSP-Wert bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom zu einem gehäuftem Auftreten von Knochenmetastasen im Laufe der Erkrankung führt (Diel et al., 1999b). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass BSP ein Marker für die Ausbildung von Knochenmetastasen ist.

Die Proteinstruktur des BSP unterscheidet sich, je nachdem, ob es von Tumorzellen oder im Knochen produziert wird. Durch die veränderte Glykosylierung kommt es zu einer veränderten Faltung des Proteins, wodurch neue Epitope geschaffen werden, die charakteristisch für das BSP aus Tumorzellen sind. In der Literatur wurde ein Antikörper beschrieben, der BSP aus Tumorzellen bindet, normal glykosyliertes BSP nicht (Armbruster et al., 2009). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Knochenmetastasen verhindert werden können bei gleichzeitiger Gabe von Tumorzellen und Antikörpern gegen BSP beziehungsweise, dass bei vorhandenen Knochenmetastasen eine Behandlung der Tiere mit dem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP die Metastasen zurückbildet (Bäuerle et al., 2005, 2006).

In dieser Arbeit wird die Expression von BSP am menschlichen Gewebe von Knochenmetastasen mit unterschiedlichen Primärtumoren mittels Immunhistochemie untersucht. Dabei wird der Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP mit einem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP verglichen.

4.2 Bewertung der Methodik

Das Patientenkollektiv besteht aus 84 Patienten, die an Knochenmetastasen mit unterschiedlichen Primärtumoren leiden und deren Gewebe an der Pathologie der Universität Würzburg im Zeitraum von 1996 bis 2007 untersucht wurde. Die beiden Tumorarten, die am häufigsten zu Knochenmetastasen führen sind das Mamma- und das Prostatakarzinom. Das Mammakarzinom ist mit 41,7% das am häufigsten untersuchte. Das Prostatakarzinom ist mit nur 9,5% allerdings unterrepräsentiert. Die möglichen Ursachen hierfür sind vielfältig. Zum einen kann es an der Auswahl des Gewebes im Archiv der Pathologie liegen, da nur histologische Schnitte mit genügend Material und deutlicher Infiltration des Knochens durch die Metastase unabhängig vom Primärtumor in die Auswertung einbezogen wurden. Zum anderen kann es durch weitere Faktoren bedingt sein wie zum Beispiel dem Einzugsgebiet der Pathologie Würzburg. Karzinome im Bereich der Lunge, Niere, Magendarmtrakts und Schilddrüse sind mit jeweils zirka 10% repräsentiert.

Das Kollektiv ist von ursprünglich 102 auf 84 Patienten geschrumpft. Dies hat mehrere Ursachen. Von den Paraffinblöcken aus dem Archiv für Pathologie wurden teilweise viele Schnitte für pathologische Untersuchungen benötigt. Dadurch waren die Bereiche mit Metastase größtenteils aufgebraucht, somit konnten keine weiteren Schnitte angefertigt werden und diese Fälle konnten damit nicht in die Auswertung aufgenommen werden. Außerdem kann das Schneiden des harten Knochenmaterials dazu führen, dass wichtige Bereiche des Schnittes zerstört werden und diese damit für die Auswertung nicht mehr zugänglich sind. Weiterhin kann bei der immunhistochemischen Färbung der Antikörper nicht homogen über dem ganzen Präparat verteilt sein, was dazu führt, dass das Präparat letztendlich nicht ausgewertet werden kann.

Um die Qualität der immunhistologischen Färbung sicherzustellen, wird stets eine Positiv- und eine Negativkontrolle mit jeder Färbeserie mitgeführt. Bei der Negativkontrolle wurde kein Primärantikörper, sondern stattdessen Kaninchenserum verwendet. Dabei zeigte sich nie eine Färbung. Als Positivkontrolle wurde ein sicher positives Präparat mitgeführt. Es ergab in jedem Fall eine spezifische Färbung.

Trotzdem hat die Immunhistochemie als Methode ihre Grenzen. Zum einen wird Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe verwendet. Dies führt zu einer Modifizierung der Proteinstruktur und kann damit zu einer Veränderung der Epitope führen, so auch bei BSP. Außerdem wird polyklonales Kaninchenserum im humanen System verwendet.

4.3 Immunhistochemie mit dem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP

In der Literatur sind mehrere Untersuchungen bekannt, in denen BSP immunhistologisch an Gewebe von Knochenmetastasen nachgewiesen wurde. So zeigte Ibrahim et al. (2000) in einer Studie von 10 Fällen von Knochenmetastasen mit dem Primärtumor Mammakarzinom, dass diese alle, also 100%, eine mittlere bis starke Expression von BSP aufweisen. Die Färbung ist im Wesentlichen auf die Tumorzellen beschränkt. Waltregny et al. (2000) untersuchte acht Fälle von Knochenmetastasen mit dem Primärtumor Mammakarzinom und sieben Fälle mit dem Primärtumor Prostatakarzinom. Die Knochenmetastasen, die vom Mammakarzinom ausgehen, zeigen alle, also 100%, eine BSP-Expression, wobei sechs der acht sogar eine hohe BSP Expression aufweisen. Fünf der sieben Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms, also 71,4% exprimieren BSP. Davon sind drei durch eine hohe BSP Expression ausgezeichnet. Insgesamt ist die Färbung innerhalb des Tumors heterogen und es fällt auf, dass die Tumorzellen, die direkt am Knochen liegen, hohe Level BSP aufweisen. Dies konnte allerdings in anderen Untersuchungen und auch in der aktuellen nicht bestätigt werden. Eine weitere Untersuchung auf diesem Gebiet stammt von Carlinfante et al. (2003). Hier wurde die Untersuchung von BSP an Gewebe von Knochenmetastasen mit 12 Fällen des Primärtumors Mammakarzinom und mit 9 Fällen des Primärtumors eines Prostatakarzinoms durchgeführt. Als Ergebnis zeigte sich bei allen Knochenmetastasen eines Prostatakarzinoms eine mittlere bis starke BSP Expression, wohingegen nur 4 von 12 Fällen der Metastasen des Mammakarzinoms, also 33%, eine mittlere bis starke BSP Expression zeigten.

In der aktuellen Untersuchung wurden 35 Fälle von Knochenmetastasen mit Primärtumor eines Mammakarzinoms und 8 Fälle mit dem Primärtumor eines

Prostatakarzinoms untersucht. Insgesamt zeigen 22,9% der Knochenmetastasen mit dem Primärtumor Mammakarzinom eine BSP Expression, wobei nur 5,7% eine mittlere bis starke BSP Expression aufweisen. Dies ist deutlich weniger als in der Literatur beschrieben. Beim Prostatakarzinom sind 75% der Fälle positiv für BSP, wobei auch hier 25% eine mittlere bis starke BSP Expression aufweisen. Der Vergleich der Knochenmetastasen eines Prostatakarzinoms mit denen eines Mammakarzinoms ähnelt von der prozentualen Verteilung der beiden Gruppen der Untersuchung von Carlinfante et al. (2003). Bei den Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms ist BSP deutlich häufiger nachweisbar und könnte somit die Theorie von Carlinfante et al. unterstützen, dass BSP als Stimulator der Knochenmineralisation eher in osteoblastischen Metastasen exprimiert wird.

Zusammenfassend ist bei der vergleichenden Betrachtung dieser verschiedenen Untersuchungen der Expression von BSP in Gewebe von Knochenmetastasen zu sagen, dass alle Untersuchungen zumindest bei einem gewissen Anteil der Fälle eine Expression von BSP in der Metastase nachweisen können. Der Anteil der Präparate, der nicht, schwach, mittel oder stark gefärbt ist, variiert von Untersuchung zu Untersuchung. Dies liegt zum einen an der geringen Anzahl der Fälle, die in die Untersuchung eingingen und die somit womöglich durch Zufall das Ergebnis in eine bestimmte Richtung lenken können. Zum anderen sind in allen Untersuchungen verschiedene Antikörper verwendet worden.

4.4 Vergleich der beiden Antikörper

In dieser Untersuchung wurde menschliches Gewebe von Knochenmetastasen mittels Immunhistochemie auf die Expression von BSP hin analysiert. Dabei wurden zwei Antikörper verwendet, der eine nach Angaben der Literatur (Armbruster et al., 2009) gegen ein nicht- glykosyliertes Epitop des BSP, der andere gegen ein Epitop der normal glykosylierten Isoform des BSP.

Die Betrachtung bezieht sich zunächst auf die Anfärbung der Tumorzellen. Der Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP bindet nach Angaben der Literatur die von Tumorzellen sezernierte Isoform des BSP und ist deshalb zytoplasmatisch beziehungsweise in der Umgebung der Tumorzellen zu erwarten. Bei der Analyse aller

Gewebeschnitte zeigt sich bei der Färbung mit dem Antikörper gegen nicht glykosyliertes BSP zu 82,1% eine schwache bis keine und nur zu 17,9% eine mittlere bis starke BSP Expression. Die Färbung mit dem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP auf der anderen Seite zeigt zu 88,1% eine schwache bis keine und nur zu 11,9% eine mittlere bis starke BSP Expression. Neben den Prozentzahlen zeigt auch die mikroskopische Betrachtung der Präparate nebeneinander, dass sich die beiden Färbungen in der Intensität des positiven Signals nahezu nicht unterscheiden. Daraus ist zu folgern, dass es im Bezug auf die zytoplasmatische Anfärbung des BSP keinen relevanten Unterschied zwischen den beiden Antikörper gibt.

Jetzt zur Charakterisierung des umgebenden Stromas. Die Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP zeigt zu 15,8% eine schwache bis keine und zu 84,2% eine mittlere bis starke Färbung. Im Gegensatz dazu zeigt die Färbung mit dem Antikörper gegen das normal glykosylierte BSP zu 30,5% eine schwache bis keine und zu 69,5% eine mittlere bis starke BSP Expression. Das heißt, der Antikörper gegen das nicht- glykosylierte BSP färbt das Stroma deutlich intensiver. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass im Stroma unglykosyliertes BSP vorliegt, das durch diesen Antikörper detektiert werden kann, durch den Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP allerdings nicht. Somit könnte der Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP in der Diagnostik von BSP im Stroma besser geeignet sein, als ein Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP.

Weiterhin wird die Analyse der Präparate aufgeteilt nach ihren Primärtumoren dargestellt. Die Knochenmetastasen mit dem Primärtumor Mammakarzinom stellen die größte Gruppe mit insgesamt 35 Fällen dar. Bei der Färbung mit dem Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP im Bezug auf die Tumorzellen zeigen 94,3% eine schwache bis keine und nur 5,7% eine mittlere bis starke BSP- Expression dar. Die Untersuchung mit dem normal glykosyliertem Anti- BSP Antikörper zeigt exakt dieselben prozentualen Angaben. Es gibt somit in dieser Gruppe analog zu der Betrachtung aller Primärtumoren keine deutlichen Differenzen zwischen den beiden Antikörperfärbungen. Im Bezug auf das Stroma zeigt die Färbung mit dem Antikörper gegen nicht-glykosyliertem BSP zu 90,9% eine mittlere bis starke und zu 9,1% eine schwache bis keine BSP Expression. Die Färbung mit dem Antikörper gegen normal glykosyliertes BSP ergibt zu 84,8% eine mittlere bis starke und zu 15,2% eine schwache bis keine

BSP Expression. Somit ist auch dieses Ergebnis analog zu der Betrachtung aller Gewebeschnitte zu sehen.

Zum Schluss ist die Färbung von Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten zu erwähnen. Diese Zellen zeigen nach Angaben der Literatur eine zytoplasmatische BSP Expression. Bei der mikroskopischen Betrachtung der beiden Färbungen nebeneinander zeigt sich kein Unterschied der beiden Färbungen in der Intensität und Lokalisation des BSP.

Hieraus ergibt sich, dass beide Antikörper gleichermaßen in der Diagnostik von BSP eingesetzt werden können. Es gibt Hinweise darauf, dass der Antikörper gegen nicht-glykosyliertes BSP im Bezug auf die Darstellung von BSP im Stroma sogar bessere Ergebnisse bringen kann, da er die nicht- glykosylierte Isoform des BSP anfärbt. Bei Untersuchungen, die sich auf diesen Bereich spezialisieren, scheint der Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP die bessere Alternative zu sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Knochensialoprotein (BSP) ist ein Protein der extrazellulären Matrix im Knochen und mineralisierten Geweben, wird aber auch von verschiedenen Tumorzellen exprimiert (Bellahcene et al., 1994, 1997, 1998). Dies ist assoziiert mit einer schlechten Prognose und einem erhöhten Risiko für eine spätere Entwicklung von Knochenmetastasen. Diel et al. (1999) konnte zeigen, dass ein erhöhter Serum-BSP-Wert bei Patientinnen mit Mammakarzinom zu einem gehäuften Auftreten von Knochenmetastasen im Laufe der Erkrankung führt. BSP scheint ein Marker für die Entstehung von Knochenmetastasen zu sein. In der Literatur ist ein Antikörper beschrieben, der ein Epitop des BSP erkennt, welches im BSP aus Tumorzellen nicht glykosyliert ist, im BSP aus mineralisiertem Gewebe allerdings schon (Armbruster et al., 2009). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Knochenmetastasen verhindert werden können bei gleichzeitiger Gabe von Tumorzellen und Antikörpern gegen BSP beziehungsweise, dass bei vorhandenen Knochenmetastasen eine Behandlung der Tiere mit einem Anti-BSP-Antikörper die Metastasen zurückbildet (Bäuerle et al., 2005, 2006).

In der aktuellen Arbeit wird die Expression von BSP an menschlichem Gewebe von Knochenmetastasen mit unterschiedlichen Primärtumoren mittels Immunhistochemie untersucht. Insgesamt wurden 35 Fälle von Knochenmetastasen mit Primärtumor eines Mammakarzinoms untersucht, wobei 22,9% eine BSP Expression aufweisen, davon 5,7% eine starke. Knochenmetastasen mit dem Primärtumor Prostatakarzinom sind mit 8 Fällen repräsentiert, wobei 75% positiv für BSP sind, davon 25% stark positiv. Die einzelnen Fälle zeigen eine starke BSP Expression im Stroma und eine schwache BSP Expression der Tumorzellen. Diese Ergebnisse des Antikörpers gegen normal glykosyliertes BSP wurden verglichen mit dem Antikörper gegen nicht glykosyliertes BSP. Der Nachweis von BSP in Tumorzellen zeigt dasselbe Ergebnis, BSP im Stroma wird durch den Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP intensiver dargestellt. Daraus lässt sich folgern, dass der Antikörper gegen nicht- glykosyliertes BSP nicht spezifisch für die Isoform des BSP aus Tumorzellen ist, sondern gleichermaßen in der Routinediagnostik von BSP eingesetzt werden kann. Die Untersuchung könnte sogar darauf hinweisen, dass dieser Antikörper die nicht- glykosylierte Isoform im Stroma erkennt und damit bei Untersuchung des Stromas die bessere Alternative darstellt.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Akhtari M, Mansuri J, Newman KA, Guise TM, Seth P (2008) **Biology of breast cancer bone metastasis.** Cancer Biology and Therapy 7:1,3-9
- Armbruster FP, Karmatschek M, Paulsson M (2009) **Determination of bone sialoprotein in bodily fluids for oncological problems.** www.freepatentsonline.de
- Barnes GL, Javed A, Waller SM, Kamal MH, Herbert KE, Hassan MQ, Bellahcene A, Van Wijnen AJ, Young MF, Lian JB, Stein GS, Gerstenfeld LC (2003) **Osteoblast related transcription factors Runx2 (Cbfa1/AML3) and MSX2 mediate the expression of bone sialoprotein in human metastatic breast cancer cells.** Cancer Res 63(10):2631-2637
- Bäuerle T, Adwan H, Kiessling F, Hilbig H, Armbruster FP, Berger MR (2005) **Characterization of a rat model with site specific bone metastasis induced by MDA-MB-231 breast cancer cells and its application to the effects of an antibody against bone sialoprotein.** Int J Cancer 115(2):177-186
- Bäuerle T, Peterschmitt J, Hilbig H, Kiessling F, Armbruster FP, Berger MR (2006) **Treatment of bone metastasis induced by MDA-MB-231 breast cancer cells with an antibody against bone sialoprotein.** Int J Oncol 28(3):573-583
- Baum B, Settleman J, Quinlan MP (2008) **Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease.** Cell and Developmental Biology 19:294-308
- Bellahcene A, Merville MP, Castronovo V (1994) **Expression of Bone Sialoprotein, a Bone Matrix Protein, in Human Breast Cancer.** Cancer Research 54:2823-2826
- Bellahcene A, Antoine N, Clause N, Tagliabue E, Fisher LW, Kerr JM, Jares P, Castronovo V (1996 a) **Detection of bone sialoprotein in human breast cancer tissue and messenger ribonucleic acid levels.** Lab Invest 75(2):203-210

- Bellahcene A, Menard S, Bufalino R, Moreau L, Castronovo V (1996 b) **Expression of bone sialoprotein in primary human breast cancer is associated with poor survival.** Int J Cancer 69(4):350-353
- Bellahcene A, Kroll M, Liebens F, Castronovo V (1996 c) **Bone sialoprotein expression in primary human breast cancer is associated with bone metastases development.** J Bone Miner Res 11(5):665-670
- Bellahcene A, Maloujahmoum N, Fisher LW, Pastorino H, Tagliabue E, Menard S, Castronovo V (1997) **Expression of Bone Sialoprotein in Human Lung Cancer.** Calcif Tissue Int 61:183-188
- Bellahcene A, Alber V, Pollina L, Basolo F, Fisher LW, Castronovo V (1998) **Ectopic expression of bone sialoprotein in human thyroid cancer.** Thyroid 8(8):637-641
- Bellahcene A, Bonjean K, Fohr B, Fedarko NS, Robey FA, Young MF, Fisher LW, Castronovo V (2000 a) **Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis.** Circ Res 86(8):885-891
- Bellahcene A, Van Riet I, de Greef C, Antoine N, Young MF, Van Camp B, Castronovo V (2000 b) **Bone sialoprotein mRNA and protein expression in human multiple myeloma cell lines and patients.** Br J Haematol 111(4):1118-1121
- Brown EB, Neville-Webbe H, Copleman RE (2004) **The role of bisphosphonates in breast and prostate cancers.** Endocrine-Related Cancer 11:207-224
- Carlinfante G, Vassiliou D, Svensson O, Wendel M, Heinegard D, Andersson G (2003) **Differential expression of osteopontin and bone sialoprotein in bone metastasis of breast and prostate carcinoma.** Clinical and Experimental Metastasis 20:437-444
- Castronovo V, Bellahcene A (1998) **Evidence that breast cancer associated microcalcifications are mineralized malignant cells.** Int J Oncol 12(2):305-308

- Chen J, Rodriguez JA, Barnett B, Hashimoto N, Tang J Yoneda T (2003) **Bone sialoprotein promotes tumor cell migration in both in vitro and in vivo models.** Connect Tissue Res 44 Suppl 1 :279-284
- Clines GA, Guise TA (2005) **Hypercalcaemia of malignancy and basic research on mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic metastasis to bone.** Endocrine- Related Cancer 12:549-583
- Coleman RE, Rubens RD (1987) **The clinical course of bone metastases from breast cancer.** Br J Cancer 55:61-66
- Coleman RE (2008) **Risks and benefits of bisphosphonates.** British Journal of Cancer 98:1736-1740
- Detry C, Waltregny D, Quatresooz P, Chaplet M, Kedzia W, Castronovo V, Delvenne P, Bellahcene A (2003) **Detection of bone sialoprotein in human (pre) neoplastic lesions of the uterine cervix.** Calcif Tissue Int 73(1):9-14
- Diel IJ, Solomayer EF, C. Gollan (1999 a) **Behandlung ossärer Metastasen beim Mammakarzinom.** Gynäkologe 32: 675-682
- Diel IJ, Solomayer EF, Seibel MJ, Pfeilschifter J, Maisenbacher H, Gollan C, Pecherstorfer M, Conradi R, Kehr G, Boehm E, Armbruster FP, Bastert G (1999 b) **Serum bone sialoprotein in patients with primary breast cancer is a prognostic marker of subsequent bone metastasis.** Clin Cancer Res 5(12):3914-3919
- Fedarko NS, Fohr B, Robey PG, Young MF, Fisher LW (2000) **Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack.** The Journal of Biological Chemistry 275(22):16666-16672
- Filleul O, Crompton E, Saussez S (2010) **Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a review of 2400 patient cases.** J Cancer Res Clin Oncol. 136(8):1117-1124
- Fisher LW, Jain A, Tayback M, Fedarko NS (2004) **Small integrin ligand N-linked glycoprotein gene family expression in different cancers.** Clinical Cancer Research 10:8501-8511
- Ganss B, Kim RH, Sodek J (1999) **Bone Sialoprotein.** Crit Rev Oral Biol Med 10(1):79-98

- Heymann D, Ory B, Gouin F, Green JR, Redini F (2004) **Bisphosphonates: new therapeutic agents for the treatment of bone tumors.** TRENDS in Molecular Medicine 10 (7):337-343
- Hofbauer LC, Rachner T, Singh SK (2008) **Fatal attraction: why breast cancer cells home to bone.** Breast Cancer Research 10:101
- Ibrahim T, Leong I, Sanchez-Sweatman O, Khokha R, Sodek J, Tenenbaum HC, Ganss B, Cheifetz S (2000) **Expression of bone sialoprotein and osteopontin in breast cancer bone metastases.** Clinical and Experimental Metastasis 18:253-260
- Jung K, Lein M, Stephan C, Von Hösslin K, Semjonow A, Sinha P, Loening SA, Schnorr D (2004) **Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostata carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications.** Int J Cancer 111(5):783-791
- Kaplan RN, Psaila B, Lyden D (2006) **Bone marrow cells in the pre-metastatic niche: within bone and beyond.** Cancer Metastasis Rev 25:521-529
- Karagad A, Ogbureke KU, Fedarko NS, Fisher LW (2004) **Bone sialoprotein, matrix metalloproteinase 2, and alpha v beta 3 integrin in osteotropic cancer cell invasion.** J Natl Cancer Inst 96:956-965
- Kayed H, Kleeff J, Keleg S, Felix K, Giese T, Berger MR, Büchler MW, Friess H (2006) **Effects of bone sialoprotein on pancreatic cancer cell growth, invasion and metastasis.** Cancer Lett 245(1-2):171-183
- Li F, Tiede B, Massague J, Kang Y (2007) **Beyond tumorigenesis : cancer stem cells in metastasis.** Cell Research 17 :3-14
- Malanchi I, Huelsken J (2008) **Cancer stem cells: never Wnt away from the niche.** Current Opinion in Oncology 21:41-46
- Mundy RG (2002) **Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities.** Nature 2:584-593
- Ogbureke KU, Nikitakis NG, Warburton G, Ord RA, Sauk JJ, Waller JL, Fisher LW (2007) **Up- regulation of SIBLING proteins and correlation with cognate MMP expression in oral cancer.** Oral Oncol 43(9):920-932
- Paget S. (1889) **The distribution of secondary growths in cancer of the breast.** Lancet 1:571-573

- Riminucci M, Corsi A, Peris K, Fisher LW, Chimenti S, Bianco P (2003) **Coexpression of bone sialoprotein (BSP) and the pivotal transcriptional regulator of osteogenesis, Cfbal/Runx2, in malignant melanoma.** *Calcif Tissue Int* 73(3):281-289
- Roodman GD (2004) **Mechanisms of Bone Metastasis.** *New England Journal of Medicine* 350 (16):1655-1664
- Siclari VA, Guise TA, Chirgwin JM (2006) **Molecular interactions between breast cancer cells and the bone microenvironment drive skeletal metastases.** *Cancer Metastasis Rev* 25:621-633
- Sung V, Stubbs JT, Fisher L, Aaron AD, Thompson EW (1998) **Bone sialoprotein supports breast cancer cell adhesion proliferation and migration through differential usage of the alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins.** *J Cell Physiol* 176(3):482-494
- Waltregny D, Bellahcene A, Van Riet I, Fisher LW, Young M, Fernandez P, Dewe W, de Leval J, Castronovo V (1998) **Prognostic Value of Bone Sialoprotein in Clinically Localized Human Prostate Cancer.** *Journal of the National Cancer Institute* 90(13):1000-1008
- Waltregny D, Bellahcene A, De Leval X, Florquin B, Wiedle U, Castronovo V (2000) **Increased Expression of Bone Sialoprotein in Bone Metastases Compared with Visceral Metastases in Human Breast and Prostate Cancers.** *Journal of Bone and Mineral Research* 15(5):834-843
- Wang J, Loberg R, Taichman RS (2006) **The pivotal role of CXCL12(SDF1)/CXCR4 axis in bone metastasis.** *Cancer Metastasis Review* 25:573-587
- Ye XC, Choueiri MC, Tu SM, Lin SH (2007) **Biology and clinical management of prostate cancer bone metastasis.** *Frontiers in Bioscience* 12:3273-3286
- Yin JJ, Pollock CB, Kelly K (2005) **Mechanisms of cancer metastasis to the bone.** *Cell Research* 15 (1):57-62
- Zhang JH, Tang J, Wang J, Ma W, Zheng W, Yoneda T, Chen J (2003) **Over-expression of bone sialoprotein enhances bone metastasis of human breast cancer cells in a mouse model.** *Int J Oncol* 23(4):1043-1048

- Zhang JH, Wang J, Tang J, Barnett B, Dickson J, Hahsimoto N, Williams P, Ma W, Zheng W, Yoneda T, Pageau S, Chen J (2004) **Bone sialoprotein promotes bone metastasis of a non- bone- seeking clone of human breast cancer cells.** Anticancer Res 24(3):1361-1368
- Zhang L, Hou X, Lu S, Rao H, Hou J, Lou R, Huang H, Zhao H, Jian H, Chen Z, Liao M, Wang X (2009) **Predictive significance of bone sialoprotein and osteopontin for bone metastasis in resected Chinese non- small- cell lung cancer patients: A large cohort retrospective study.** Lung cancer 2009 Apr 17