

Zentrum für Klinische Pathologie  
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Ärztlicher Leiter: Prof. Dr. C. Wagener

Vergleichende Untersuchungen zur  
Expression von Proteasen in Riesenzell-  
Läsionen des Kieferknochens und der  
Sehnenscheide

Dissertation

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Zahnmedizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

**Julika Eisenmann**

aus Hamburg

Hamburg, 2007

---

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 11.09.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität  
Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Th. Löning

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. I. Nergiz

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. Dr. R. Friedrich

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>6</b>
Einführung .....	6
Histologie .....	12
Fragestellung .....	16
<b>2. Material.....</b>	<b>17</b>
Patientenkollektiv.....	17
Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	17
<b>3. Methode.....</b>	<b>21</b>
Immunhistochemie.....	21
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>24</b>
Auswertung der Immunhistologie.....	24
Immunhistochemische Abbildungen .....	34
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>39</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>46</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>48</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
DAB	Diaminobenzidin
Epulis gig.	Epulis gigantocellularis
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP9	Matrix-Metalloproteinase 9
mRNA	Messenger RNA
NS	Normalserum
PBS	Phosphate buffered saline
RANK	Receptor activator of NkF-KB
RANKL	Receptor activator of NkF-KB Ligand
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Rz	Riesenzellen
Rzg	Riesenzellgranulom
Rzt	Riesenzelltumor
T-M-A	Tissue-Micro-Array

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das RANKL/ RANK/ Osteoprotegerin-System. ....	10
Abbildung 2: Epulis gigantocellularis HE-Färbung.....	12
Abbildung 3: Zentrales Riesenzellgranulom HE-Färbung.....	13
Abbildung 4: Riesenzelltumor der Sehnenscheide HE-Färbung.....	14
Abbildung 5: Riesenzelltumor HE-Färbung. ....	15
Abbildung 6: Verteilung der M-CSF Expression bezüglich der Diagnosen.....	26
Abbildung 7: Verteilung der RANK Expression bezüglich der Diagnosen. ....	27
Abbildung 8: Verteilung der Cathepsin K-Expression bzgl. d. Diagnosen. ....	28
Abbildung 9: Verteilung der Cathepsin L-Expression bzgl. d. Diagnosen.....	29
Abbildung 10: Verteilung der MMP9-Expression bezüglich der Diagnosen.....	30
Abbildung 11: Cathepsin K positive Riesenzellen einer Epulis gigantocellularis bei 10-facher Vergrößerung .....	34
Abbildung 12: Cathepsin K: Zytoplasmatisch angefärbte mehrkernige Riesenzellen einer Epulis gigantocellularis bei 40-facher Vergrößerung.....	34
Abbildung 13: Cathepsin L positive Riesenzellen einer Epulis gigantocellularis bei 20-facher Vergrößerung .....	35
Abbildung 14: Schwach Cathepsin L positive Riesenzelle einer Epulis gigantocellularis bei 40-facher Vergrößerung .....	35
Abbildung 15: Cathepsin S negative Riesenzellen und Cathepsin S positive mononukleäre Zellen einer Epulis gig. bei 10-facher Vergrößerung .....	36
Abbildung 16: Cathepsin S negative Riesenzellen einer Epulis gigantocellularis bei 20-facher Vergrößerung. Vereinzelt Cathepsin S positive mononukleäre Zellen. ....	36
Abbildung 17: MMP9 positive Riesenzellen einer Epulis gigantocellularis bei 10-facher Vergrößerung .....	37
Abbildung 18: MMP9 positive Riesenzellen einer Epulis gigantocellularis bei 20-facher Vergrößerung .....	37
Abbildung 19: Immunhistologie von CD 68, CD 51, M-CSF und RANK .....	38

---

## 1. Einleitung

### *Einführung*

#### **Klinik und Pathologie der Epulis gigantocellularis**

Epuliden sind gutartige Geschwülste, die der Gingiva halbkugelig oder pilzförmig aufsitzen. Es handelt sich bei ihnen nicht um echte, autonom wachsende Tumoren, sondern vielmehr um reaktive Hyperplasien im Sinne einer reaktiven Gewebsproliferation auf entzündlicher aber auch auf nicht entzündlicher Basis. Es besteht eine Beziehung zum gingivo-parodontalen Gewebe.

Die Epulis tritt am häufigsten zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auf und das weibliche Geschlecht scheint im Verhältnis 3:1 bevorzugt zu sein.

Sie kommt meist im Bereich der vorderen Zähne und häufiger im Unterkiefer als im Oberkiefer vor.

Histopathologisch lassen sich drei Formen der Epulis differenzieren: die Epulis granulomatosa, bestehend aus Granulationsgewebe, die Epulis fibrosa, gekennzeichnet durch kollagenfaserreiches Bindegewebe und die Epulis gigantocellularis, ein zellreiches Granulom mit zahlreichen Riesenzellen mit resorptiver Funktion. Während die Epulis fibrosa und die Epulis granulomatosa typischerweise gut begrenzte Gewebsproliferationen sind, zeigt die Epulis gigantocellularis meist eine unscharfe Begrenzung. Des Weiteren zeigt sie eine ausgeprägte Rezidivneigung. Histologisch ist die Epulis gigantocellularis charakterisiert durch ein feines kollagenes Bindegewebsnetz, zahlreiche Blutgefäße und viele mehrkernige Riesenzellen. Es kommt oft zu Blutungen, als Zeichen älterer Blutungen lassen sich reichlich Hämosiderinablagerungen nachweisen. Die mehrkernigen Riesenzellen ähneln teilweise Osteoklasten und in der Tiefe der Veränderung kommt es häufig zu einer Erosion der benachbarten Kortikalis des Kieferknochens in Form ausgedehnter Läsionen. Es ist bisher aber für die meisten Läsionen mit ausgedehnten lokalen Osteolysen ungeklärt, welche Zelltypen der Läsion und welche Faktoren neben den Proteasen den Prozess des Knochenabbaus regulieren.

In neueren Studien konnte belegt werden, dass bei Riesenzelltumoren des Knochens eine erhöhte Expression der Proteasen Cathepsin K, Cathepsin L und MMP9 vorliegt. Allerdings wurde lediglich für die Protease Cathepsin K auch eine erhöhte Enzymaktivität nachgewiesen. Die Protease Cathepsin K wurde ausschließlich in so genannten „osteoclast-like“ Riesenzellen gefunden.

---

Dies lässt vermuten, dass die Protease Cathepsin K maßgeblich für den Prozess der Osteolyse verantwortlich ist.

Dies wiederum ließ vermuten, dass bei der Epulis gigantocellularis, einem Weichgewebstumor, der häufig mit einer Osteolyse einhergeht ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Protease Cathepsin K Expression in „osteoclast-like“ Riesenzellen und dem Ausmaß der Osteolyse besteht.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, welche Zelltypen und welche Proteasen im Falle der Epulis gigantocellularis bei ausgedehnten Läsionen im Kieferknochen für die Osteolyse verantwortlich sind.

Um dies zu klären wurden Riesenzell-Läsionen aus dem Knochen (Kiefer) und vergleichend aus dem Weichgewebe (Sehnenscheide) hinsichtlich ihres Protease-Expressionsprofils und der zellulären Zusammensetzung untersucht.

Das Protease-Expressionsprofil wurde immunhistologisch an 54 Riesenzell-Läsionen hinsichtlich der Expression von Cathepsine K, L und S und der Matrix-Metalloproteinase MMP9 erstellt.

Die ausgewählten Enzyme spielen eine wichtige Rolle in denjenigen pathologischen Prozessen, die mit Gewebedestruktion verbunden sind. Cathepsin K, L und S gehören zur Gruppe der lysosomalen Cysteinproteasen, und sie sind von wesentlicher Bedeutung beim Umbau zellulärer und extrazellulärer Proteine.

### **Biochemie und Funktion der untersuchten Proteasen**

Cathepsin K ist eine potente Kollagenase, die primär von Osteoklasten exprimiert wird. Sie wurde 1995 erstmals beschrieben. Sie ist verantwortlich für die Degradation der Kollagenmatrix des Knochens und somit an der Resorption von Knochensubstanz beteiligt. Das Enzym spaltet Kollagen Typ1, Typ 2 und Osteonectin. Ein Mangel an Cathepsin K verursacht die ungeordnete Knochen-sklerosierung bei der Erkrankung Pyknodysostosis (Motyckova, 2002).

Cathepsin L ist, verglichen mit anderen lysosomalen Cysteinproteasen, die am wenigsten stabile. Untersuchungen ergaben, dass es von Tumorzelllinien sezerniert wird und damit bei der Zerstörung der Basalmembran, der Gewebeinvasion und der Metastasenentstehung eine Rolle spielen kann (Yamaguchi et al., 1990). Damit ist Cathepsin L durch seine Kollagenase- und Elastase-Aktivität nicht unwesentlich an Erkrankungen wie dem Lungenemphysem beteiligt (Mason et al., 1986).

---

Cathepsin S ist hoch exprimiert in der Milz und in spezialisierten antigen-präsentierenden Zellen wie B-Lymphozyten, Makrophagen und anderen Klasse-II-positiven Zellen (Shi et al., 1992, Morton et al., 1995). Aufgrund dieser Zell- und Organverteilung ist zu vermuten, dass Cathepsin S nicht am allgemeinen Proteinumsatz einer Zelle beteiligt ist, sondern vielmehr eine spezifischere Funktion ausübt.

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind endogene Proteinase mit der Fähigkeit extrazelluläre Matrix einschließlich der Basalmembran aufzuspalten. MMPs gehören zu einer Gruppe von Enzymen, die an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind und zum Um- und Abbau von Gewebe führen. Bei physiologischen Prozessen wie der Gewebsneubildung und dem Wachstum, einschließlich Zellabbau bzw. Zellerneuerung, ist die Funktion dieser Enzyme von wesentlicher Bedeutung für den Organismus. Aber auch bei pathologischen Veränderungen spielen die katalytischen Aktivitäten der MMPs und deren Regulierung eine wichtige Rolle.

MMPs bilden eine Gruppe von zinkhaltigen Endopeptidasen, sie umfassen 15 Enzyme, die entsprechend ihrer bevorzugten Substratspezifität und Struktur in Subklassen eingeteilt werden, MMP9 gehört zu der Subklasse der Gelatinasen. Es ist, wie auch MMP2 direkt an der Degradation der Basalmembran beteiligt.

---

Des Weiteren wurden immunhistologische Untersuchungen mit den Antikörpern CD 68, CD 51, M-CSF, und RANK an Tissue-Micro-Array durchgeführt. Die immunhistologischen Untersuchungen mit den Antikörpern gegen CD 68 und CD 51 ermöglichten eine Charakterisierung der Zellen.

### **Zelltypisierung**

CD 68 ist ein verlässlicher Monozyten/Makrophagen Marker. Das Antigen entspricht einem mit Lysosomen assoziierten Zytoplasmprotein.

Dieser Antikörper erkennt das humane CD 68 Zelloberflächen Antigen, ein 110kD Glykoprotein, das primär von Makrophagen und Monozyten exprimiert wird. Zelluläre Lokalisation ist das Zytoplasma.

Die Expression des Vitronectinrezeptor (CD 51) stellt ein Charakteristikum für den reifen Osteoklasten dar. Dieser, auch als CD 51 oder Integrin alpha-V bekannte Rezeptor, gehört zu der Familie von Rezeptoren, die eine ARG-Gly-Asp Sequenz ihres Liganden zu erkennen vermögen. Des Weiteren ist er in der Lage, mit verschiedenen, in unterschiedlichen Geweben vorkommenden Untereinheiten ( $\beta$ 1-,  $\beta$ 5-,  $\beta$ 6-,  $\beta$ 8-Integrine) Heterodimere zu bilden. Die Funktion dieses Rezeptors, der außer auf Osteoklasten auch auf Monozyten und mesothelialen Zellen exprimiert wird, wird mit vielen Entwicklungsprozessen in Zusammenhang gebracht. Im Rahmen der Osteoklastenfunktion ist die wichtigste Funktion dieses Rezeptors die Vermittlung der Zell-Substrat-Interaktion zwischen Osteoklast und Knochen.

## Biochemie und Funktion der Zytokine M-CSF und RANK

Zum Nachweis von Osteoklasten-induzierenden Faktoren wurden immunhistologische Untersuchungen mit den Antikörpern gegen M-CSF und RANK durchgeführt.

Der humane monoklonale Antikörper RANK zielt auf den Rezeptor für den entsprechenden Liganden (RANKL) ab, der für die Stimulierung der Osteoklasten von Bedeutung ist. Der sogenannte „Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B“ (RANK) fungiert als Signalüberträger von Osteoblasten zu Osteoklasten. Der RANK Ligand bindet an seinen auf der Oberfläche von Präosteoklasten lokalisierten Rezeptor, wandelt Präosteoklasten in Osteoklasten um und erhöht damit die Anzahl der für die Knochenresorption verantwortlichen Zellen. RANK stellt demzufolge einen Mediator für den Knochenabbau dar.

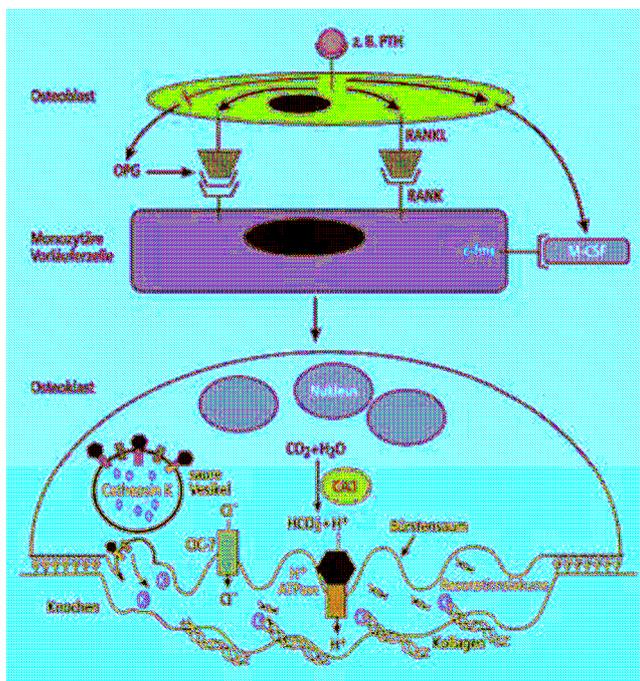


Abbildung 1: Das RANKL/ RANK/ Osteoprotegerin-System.

Der Osteoblast steuert mit Hilfe der Botenstoffe RANKL (RANK-ligand), RANK („receptor-activator of NFkB“), OPG (Osteoprotegerin) und M-CSF („macrophage colony stimulating factor“) die Reifung und Aktivität der Osteoklasten. M-CSF, welches durch die Ausschüttung von Parathormon (PTH) vermehrt sezerniert wird, bindet an den Rezeptor c-fms auf Osteoklastenvorläuferzellen und regt diese zur Proliferation an. Eine verminderte Produktion des RANKL-Antagonisten OPG und eine gleichzeitige

verstärkte Bildung von RANKL, führen zu einer vermehrten Bildung von reifen, multinukleären Osteoklasten, die eine Bürstensaummembran ausbilden, Säure sezernieren und hierdurch Knochen resorbieren. (aus: Kornak et al. 2003. Deutsches Ärzteblatt 19, A1258-A1268).

Der „Macrophage Colony Stimulating Factor“ (M-CSF) ist der früheste bekannte Faktor im Verlauf der osteoklastären Differenzierung. Dieser hämatopoetische Wachstumsfaktor ist ein Produkt stimulierter Osteoblasten bzw. Stromazellen. Er wird sowohl in löslicher, als auch in membrangebundener Form exprimiert. Sein Rezeptor, die CSF 1 Rezeptor Kinase, wird sowohl von den mononukleären Vorläuferzellen, als auch von den terminalen Osteoklasten exprimiert. Dies zeigt, dass M-CSF sowohl im Rahmen der Osteoklastogenese,

---

als auch in der Osteoklastenfunktion eine Bedeutung hat. Das Glykoprotein M-CSF wird in der Proliferations- und Differenzierungsphase der Osteoklasten benötigt.

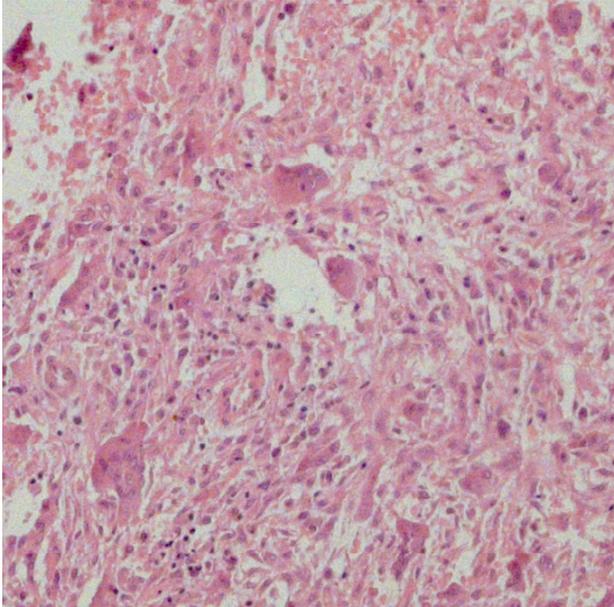
Gleichzeitig wurde der Faktor als wichtiger Mediator im Rahmen der Entzündungsreaktion identifiziert, da er die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen aus Makrophagen regulieren kann.

---

## ***Histologie***

### **Epulis gigantocellularis**

Histologisch ist die Epulis gigantocellularis, auch peripheres Riesenzellgranulom genannt, charakterisiert durch ein feines kollagenes Bindegewebsnetz, zahlreiche Blutgefäße und viele mehrkernige Riesenzellen. Es kommt oft zu Blutungen, als Zeichen älterer Blutungen lassen sich reichlich Hämosiderinablagerungen nachweisen (Abbildung 2).

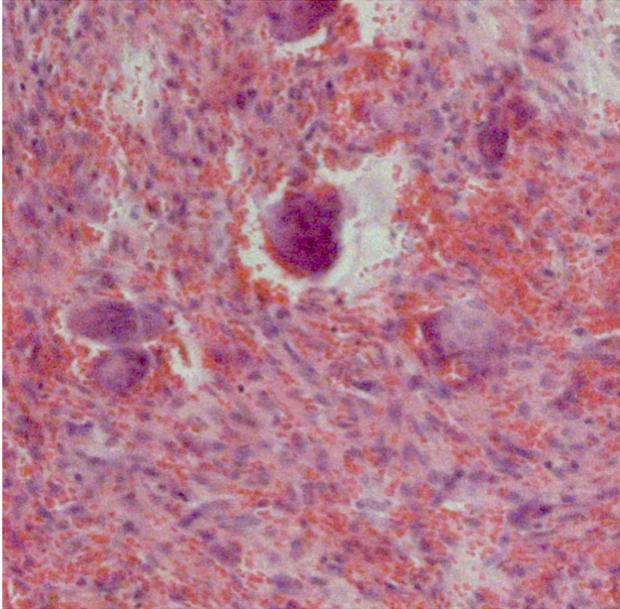


**Abbildung 2: Epulis gigantocellularis  
HE-Färbung (Fall- Nr. 6)**

---

## Zentrales Riesenzellgranulom

Der histologische Aufbau des zentralen Riesenzellgranulom (Abbildung 3) entspricht dem der Epulis gigantocellularis, die Unterscheidung bezieht sich auf die unterschiedliche topografische Lokalisation. Vom klinischen Verhalten her lassen sich sehr „aggressive“ und „nicht aggressive“ Verlaufsformen unterscheiden. Bei den „nicht aggressiven“ Läsionen handelt es sich typischerweise um asymptomatische, umschriebene Osteolysen, meist Zufallsbefunde. Im



Gegensatz dazu manifestieren sich die „aggressiven“ Verlaufsformen durch ein rasches expansives Wachstum mit teilweise umfangreicher Arrosion des kortikalen Knochens und auch Resorptionen benachbarter Zahnwurzeln (Kruse-Lösler et al. 2006).

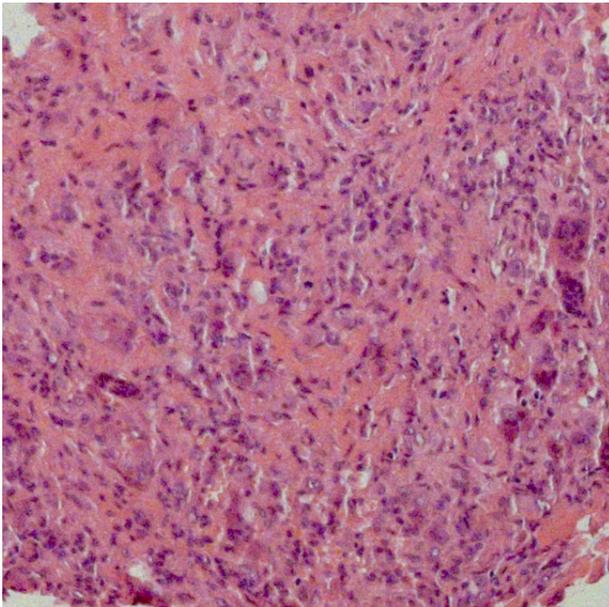
**Abbildung 3: Zentrales Riesenzellgranulom HE-Färbung (Fall- Nr. 51)**

---

## Riesenzelltumor der Sehnenscheide

Der Riesenzelltumor der Sehnenscheide ist ein knotiger Tumor, der vom Weichgewebe der Sehnenscheide oder der Synovialis ausgeht. Häufig betroffen sind Finger- oder Zehengelenke.

Histologisch handelt es sich um eine Mischung aus undifferenzierten, spindeligen, mesenchymalen Zellen, Riesenzellen vom Osteoklastentyp und



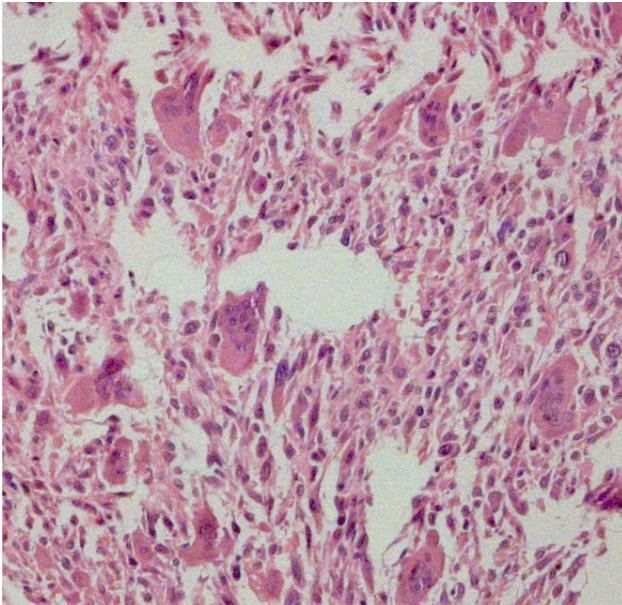
Schaumzellen (Abbildung 4). Sie können in unterschiedlichen Graden fibrosieren und enthalten zum Teil reichlich Eisenpigment. Sie werden zu den Granulationsgeschwülsten gerechnet und entstehen als Überschussbildung, meist reaktiv, infolge rezidivierender Mikrotraumen.

**Abbildung 4: Riesenzelltumor der Sehnenscheide HE-Färbung (Fall-Nr.45)**

---

## Riesenzelltumor

Der Riesenzelltumor des Knochens besteht aus fibrohistozytärem Gewebe, das wahrscheinlich der neoplastische Bestandteil des Tumors ist (Abbildung 5). Den



anderen Bestandteil bilden vielkernige osteoklastäre Riesenzellen, die als reaktiver Bestandteil gewertet werden und durch Zytokinwirkung aus Monozyten im Tumor entstehen.

**Abbildung 5: Riesenzelltumor HE-Färbung (Fall- Nr. 21)**

---

## ***Fragestellung***

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es sich bei der Osteolyse, von der das Krankheitsbild der Epulis gigantocellularis häufig begleitet wird, um ein Epiphänomen handelt oder ob sie Bestandteil eines spezifischen Krankheitsbildes ist und welche Faktoren hierfür verantwortlich sind.

Um diese Frage zu klären wurden vergleichende immunhistologische Untersuchungen zur zellulären Zusammensetzung von Riesenzell-Läsionen des Kieferknochens, der Sehnenscheide und der Speicheldrüsen durchgeführt. Ferner wurde die Expression von osteolytisch wirkenden Enzymen und regulatorischen Faktoren ebenfalls immunhistologisch dargestellt. Abschließend wurden die experimentellen Ergebnisse im Zusammenhang mit den klinischen Daten analysiert.

---

## 2. Material

### ***Patientenkollektiv***

Es wurden 54 Riesenzell-Läsionen aus den Archiven des Institutes für Oralpathologie des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt (s. Tabelle 1). Das untersuchte Gewebematerial stammt aus einem Zeitraum von 1973 bis 2005. Die Gewebeproben wurden den Patienten teilweise in der Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie des UKE entnommen und teilweise wurden Proben von außerhalb eingeschickt. Der älteste Patient war zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme 91 Jahre alt, und der jüngste Patient war 7 Jahre alt. 27 Patienten waren männlichen und 27 Patienten waren weiblichen Geschlechtes. Untersucht wurden Riesenzell-Läsionen, die durch einen Pathologen des Institutes für Pathologie befundet und bei denen folgende Diagnosen gestellt wurden: Epulis gigantocellularis, peripheres oder zentrales Riesenzellgranulom, Riesenzelltumor, Riesenzelltumor der Sehnenscheide.

### ***Geräte und Verbrauchsmaterialien***

Mikrotom:	Jung Histoslides 2000
PH-Meter CG 820:	Schott
Magnetrührer:	IKAMAG RCT
Analysenwaage:	Mettler
Mikrowelle	
Wärmeschrank:	Heraeus
Inkubationskammer ( feuchte Kammer)	
Reaktionsgefäße:	Eppendorf
Pipettenspitzen:	Eppendorf
SuperFrost/ Plus Objektträger:	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG
Deckgläser	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG

**Tabelle 1: Diagnose, Geschlecht, Alter des Patientenkollektivs**

Fall- Nr.	Diagnose	Geschlecht	Alter in Jahren
1	Epulis gigantocellularis	männlich	9
2	Epulis gigantocellularis	weiblich	77
3	Epulis gigantocellularis	männlich	39
4	Epulis gigantocellularis	männlich	70
5	Epulis gigantocellularis	männlich	60
6	Epulis gigantocellularis	weiblich	91
7	Epulis gigantocellularis	männlich	8
8	Epulis gigantocellularis	männlich	59
9	Epulis gigantocellularis	männlich	59
10	Epulis gigantocellularis	männlich	67
11	Epulis gigantocellularis	weiblich	61
12	Epulis gigantocellularis	weiblich	38
13	peripheres Riesenzellgranulom	männlich	37
14	peripheres Riesenzellgranulom	männlich	43
15	peripheres Riesenzellgranulom	weiblich	47
16	peripheres Riesenzellgranulom	männlich	44
17	peripheres Riesenzellgranulom	männlich	54
18	peripheres Riesenzellgranulom	männlich	54
19	peripheres Riesenzellgranulom	weiblich	52
20	peripheres Riesenzellgranulom	weiblich	9
21	Riesenzelltumor	weiblich	40
22	Riesenzelltumor	männlich	41
23	Riesenzelltumor	männlich	8
24	Riesenzelltumor der Sehnscheide	weiblich	34
25	Riesenzelltumor der Sehnscheide	männlich	47
26	Riesenzelltumor der Sehnscheide	männlich	46
27	Riesenzelltumor der Sehnscheide	männlich	56
28	Riesenzelltumor der Sehnscheide	männlich	35
29	Riesenzelltumor der Sehnscheide	männlich	63
30	Riesenzelltumor der Sehnscheide	männlich	unbekannt
31	Riesenzelltumor der Sehnscheide	männlich	53
32	Riesenzelltumor der Sehnscheide	männlich	8
33	Riesenzelltumor der Sehnscheide	männlich	9
34	Riesenzelltumor der Sehnscheide	weiblich	43
35	Riesenzelltumor der Sehnscheide	weiblich	72
36	Riesenzelltumor der Sehnscheide	weiblich	38
37	Riesenzelltumor der Sehnscheide	weiblich	61
38	Riesenzelltumor der Sehnscheide	weiblich	35
39	Riesenzelltumor der Sehnscheide	weiblich	46
40	Riesenzelltumor der Sehnscheide	weiblich	66
41	Riesenzelltumor der Sehnscheide	weiblich	78
42	Riesenzelltumor der Sehnscheide	weiblich	60
43	Riesenzelltumor der Sehnscheide	weiblich	59
44	Riesenzelltumor der Sehnscheide	weiblich	36
45	Riesenzelltumor der Sehnscheide	weiblich	69
46	Riesenzelltumor der Speicheldrüse	männlich	31
47	Riesenzelltumor der Speicheldrüse	männlich	56
48	zentrales Riesenzellgranulom	weiblich	69
49	zentrales Riesenzellgranulom	weiblich	24
50	zentrales Riesenzellgranulom	weiblich	7
51	zentrales Riesenzellgranulom	männlich	52
52	zentrales Riesenzellgranulom	weiblich	13
53	zentrales Riesenzellgranulom	weiblich	75
54	zentrales Riesenzellgranulom	weiblich	33

---

## Reagenzien:

Für die Untersuchungen wurden folgende Reagenzien und Chemikalien verwendet:

ABC-Kit Peroxidase Mouse IgG Vectastain: Vector Lab. Inc., USA.  
ABC-Kit Peroxidase Goat IgG Vectastain: Vector Lab. Inc., USA.  
DAB-Kit Peroxidase Substrate: Vector Lab. Inc., USA., Kat. SK-4100  
Eukitt: Kindler GmbH-Freiburg

## Verwendete Primär- und Sekundärantikörper:

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung (2% BSA)	Hersteller
Cathepsin K (N-20)	Ziege	1:750	Santa Cruz Biotech. USA Best. Nr.: SC-6507
Cathepsin S (M-19)	Ziege	1:500	Santa Cruz Biotech. USA Best. Nr.: SC-6505
Cathepsin L (S-20)	Ziege	1:750	Santa Cruz Biotech., USA Best. Nr.: SC-6500
MMP9 Clone: 56-2A4	Maus	1:1000	Celbiochem., EMD Bioscience, Inc. Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland Best. Nr.: Ab-3
RANK	Ziege	1:20	R&D Systems Minneapolis, USA Best. Nr.: AF 683
M-CSF	Ziege	1:1000	Santa Cruz Biotech., USA Best. Nr.: SC-1324
CD68 Clone: 514H12	Maus	1:500	Serotec, Düsseldorf, Deutschland Best. Nr.: SM1718
CD 51 Clone: CJ00	Maus	1:200	Novocastra Lab. Newcastle, UK Best. Nr.: NCL-CD51

BSA=Bovines Serum Albumin

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung (1xPBS)</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Goat	1:200	Vector
Anti-mouse	1:200	Vector

PBS=Phosphate buffered saline

### **Verwendete Lösungen für immunhistochemische Untersuchung:**

#### *10x PBS:*

14,3 g Di-Kaliumhydrogenphosphat (  $K_2HPO_4$  )

2,5 g Kaliumhydrogenphosphat ( $K_2PO_4$ )

85 g Natriumchlorid

auf 1000 ml Aqua dest.

pH 7,2-7,4

#### *2% BSA: (Bovines Serum Albumin)*

1 g BSA auf 50ml 1x PBS

#### *Methanol-Blockade:*

200 ml Methanol

10 ml Wasserstoffperoxid

#### *Mikrowellen-Puffer, Citratpuffer:*

8,2 mM  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$

1,8 mM  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$

pH 6,0

#### *10x TEC:*

2,5 g Tris

5 g EDTA

3,2 g Tri-Na-Citrat

auf 1000 ml Aqua dest.

pH 7,8

#### *1mM EDTA*

0,372 g auf 1000 ml Aqua dest.

---

### **3. Methode**

Von allen 54, in Paraffin eingebetteten, riesenzellhaltigen Läsionen wurden 4-6 µm dicke Paraffinschnitte am Mikrotom hergestellt.

Diese Paraffinschnitte wurden jeweils zum Nachweis der Expression der Proteasen Cathepsin K, L und S und MMP9 genutzt.

Zusätzlich wurde aus ausgesuchten Blöcken ein Tissue-Micro-Array (TMA) hergestellt (Simon und Sauter, 2003), d.h. es wurden Proben aus repräsentativen Gebieten des jeweiligen Gewebes herausgestanzt und auf einen neuen Block aufgebracht. Von diesem neuen Block wurden Schnitte für den Nachweis der CD 68, M-CSF, RANK und CD 51 Expression angefertigt. Diese Methode ermöglichte eine Inkubation aller Proben unter gleichen Bedingungen.

#### ***Immunhistochemie***

Die immunhistochemische Nachweismethode erfolgte unter Verwendung der ABC-Kits mouse IgG und goat IgG (Vector Laboratories).

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der hohen Bindungsaffinität von Avidin, einem Hühnereiweiß-Glykoprotein, zu Biotin (Vitamin H). Der AB-Komplex besteht aus Avidin und einem biotinylierten Enzym, in diesem Fall einer Peroxidase. Dieser Komplex wird über einen biotinylierten Sekundärantikörper an den Primärantikörper gebunden, der wiederum gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet ist. Die Antigen-Antikörper-Reaktion wird durch eine Enzym-Substratreaktion sichtbar gemacht. Durch Zugabe von Diaminobenzidin (Peroxidase-Substrat-Kit DAB) entsteht ein braunes Präzipitat, welches das Antigen spezifisch nachweist.

#### ***Herstellung der Paraffinschnitte***

Es wurden 4-6 µm dicke Paraffinschnitte am Mikrotom hergestellt. Die Schnitte wurden in einem handwarmen Wasserbad gestreckt und auf APES (3-Aminopropyltriethoxysilan)-beschichtete Objektträger (SuperFrost Plus) aufgezogen. Anschließend ließ man sie über Nacht im Wärmeschrank bei 60°C ablaufen.

---

### *Entparaffinierung*

Die Schnitte wurden in Xylol (1x 5 Min. und 1x 10 Min.) entparaffiniert und anschließend durch die absteigende Ethanolreihe bis zum 96%igen Ethanol geführt.

### *Methanolblockade*

Zur Hemmung von endogener Peroxidase im Gewebe wurden die Objektträger für 10 Minuten in ein Gemisch aus Methanol (200 ml) und Wasserstoffperoxid (10 ml) getaucht. Anschließend wurden sie in Aqua dest. gespült.

### *Mikrowellenvorbehandlung*

Zur Demaskierung antigener Epitope wurde eine Vorbehandlung der Schnitte vorgenommen. Hierfür wurden die Schnitte in mikrowellengeeignete Plastikgefäße überführt, die mit Citratpuffer bzw. mit TEC (CD 68) oder mit EDTA (CD 51) gefüllt waren und 20 Minuten sprudelnd in der Mikrowelle gekocht. Um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern, wurde der beim Kochen entstehende Flüssigkeitsverlust durch Nachfüllen von Aqua dest. ausgeglichen. Die Schnitte wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und kurz in Aqua dest. gespült.

### *Normalserum*

Die Schnitte wurden 2x 5 Minuten in 1x PBS gespült. Anschließend folgte eine 20-minütige Inkubation mit verdünntem Normalserum (NS)

15 µl Normalserum (aus dem Peroxidase Goat IgG / ABC-Kit)

1 ml 1x PBS

Nachdem das Normalserum abgekippt war, wurden etwa 100 µl des in 2% BSA verdünnten Primärantikörpers auf jeden Schnitt pipettiert.

### *Inkubation mit dem Primärantikörper*

Die entsprechenden Verdünnungen der jeweiligen Primärantikörper können der Tabelle entnommen werden.

Die Schnitte wurden in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3x 5 Minuten in 1x PBS gespült.

### *Inkubation mit dem Sekundärantikörper*

Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (aus dem Peroxidase Goat IgG / ABC-Kit bzw. aus dem Peroxidase mouse IgG / ABC-Kit) erfolgte in einer

---

Verdünnung in 1x PBS für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

5 µl sekundärer Antikörper

5 µl Normalserum

1 ml 1x PBS

Nach der Inkubation wurden die Schnitte 3x 5 Min. in 1x PBS gespült.

#### *Inkubation mit dem Tertiärantikörper (Avidin-Biotin-Komplex)*

Sekundärantikörper und Avidin-Biotin-Komplex wurden zeitgleich angesetzt, weil diese Lösung 30 Min. bei Raumtemperatur stehen muss.

Nachdem die Schnitte 3x 5 Min. in 1x PBS gespült wurden, erfolgte die Inkubation mit etwa 100 µl der Tertiärantikörper-Lösung pro Schnitt für 30 Min. in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden die Schnitte 3x 5 Min. in 1x PBS gespült.

#### *Farbreaktion mit der Diaminobenzidin-Färbelösung*

Die DAB-Lösung wurde nach den Angaben des Herstellers angesetzt. Die Schnitte wurden in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur 10 Min. mit der DAB-Lösung inkubiert. Während der Reaktion wird ein braunes Präzipitat gebildet, das im Lichtmikroskop sichtbar ist und die Lokalisation des Antigens in der Zelle spezifisch nachweist. Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest. gespült.

#### *Gegenfärbung*

Die Schnitte wurden für 1 Min. in eine Hämalun-Lösung getaucht und anschließend 5 Min. unter fließendem Leitungswasser gebläut.

#### *Dehydrierung*

Die Schnitte wurden durch die aufsteigende Alkoholreihe (von 80% über 96% bis zum 100% Ethanol) geführt und dann in Xylol überführt und mit Eukitt eingedeckelt.

---

## 4. Ergebnisse

Untersucht wurden 54 Riesenzell-Läsionen mit den Diagnosen: Epulis gigante-cellularis / peripheres Riesenzellgranulom (zusammen 20 Fälle), zentrales Riesenzellgranulom (7 Fälle), Riesenzelltumor (5 Fälle) und Riesenzelltumor der Sehnenscheide (22 Fälle).

### ***Auswertung der Immunhistologie***

Zur Auswertung wurden die 54 Gewebeproben in drei Gruppen eingeteilt:

1. Immunhistologie an Großschnitten (Cathepsin K, L, S und MMP9),
2. Immunhistologie an TMAs ( CD 68, CD 51, M-CSF und RANK)
3. Klinische Parameter.

Die größte Gruppe umfasst alle 54 Gewebeproben, bei denen an Großschnitten die immunhistologischen Untersuchungen zur Expression von Cathepsin K, L, S und MMP9 durchgeführt wurden.

Eine weitere Gruppe besteht aus 17 ausgesuchten Gewebeproben, die für die Herstellung eines Tissue-Micro-Arrays (TMA) verwendet wurden. An den TMAs wurden immunhistologische Untersuchungen mit den Antikörpern CD 68 und CD 51 zur Charakterisierung der Zellen und der Antikörper M-CSF und RANK zum Nachweis von Osteoklasten-aktivierenden Faktoren durchgeführt.

Für eine dritte Gruppe, bestehend aus 10 Fällen, war eine Auswertung klinischer Parameter möglich. Hierzu wurden die Röntgenbilder (Panoramashichtaufnahmen) hinsichtlich einer Osteolyse des Kieferknochens und deren Größe im Bereich der aufgetretenen Riesenzell-Läsion ausgewertet.

Die Auswertung der immunhistologischen Untersuchungen erfolgte lichtmikroskopisch nach semiquantitativen Gesichtspunkten.

Es wurde jeweils die Ausprägung der Färbung in den mehrkernigen und mononukleären Makrophagen in jeweils 10 Gesichtsfeldern bei 40-facher Vergrößerung beurteilt.

- |     |   |                     |
|-----|---|---------------------|
| +   | = | schwach positiv     |
| ++  | = | mittelstark positiv |
| +++ | = | stark positiv       |
| -   | = | negativ             |

---

## **Auswertung des immunhistologischen Nachweises von CD 68, CD 51, M-CSF und RANK (Abbildung 6 und Abbildung 7)**

Die immunhistologischen Untersuchungen mit den Antikörpern CD 68, CD 51, M-CSF und RANK erfolgten an Schnitten von einem Tissue-Micro-Array. Hierbei wurden die Gewebstanzen der 17 Proben gleichzeitig und damit unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die Diagnosen verteilten sich wie folgt auf die 17 Gewebeproben:

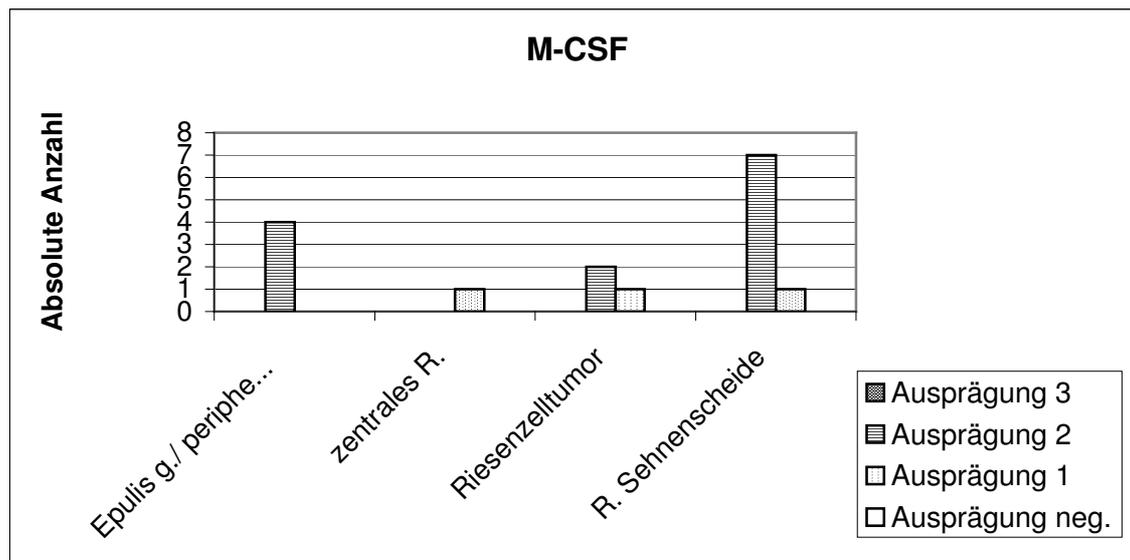
Epulis gig. und peripheres Rzg. :	4 Fälle
Zentrales Rzg. :	2 Fälle
Riesenzelltumor :	3 Fälle
Riesenzelltumor der Sehnenscheide :	8 Fälle

Die Auswertung der immunhistologischen Untersuchung erfolgte lichtmikroskopisch nach semiquantitativen Gesichtspunkten.

+	=	schwach positiv
++	=	mittelstark positiv
+++	=	stark positiv
-	=	negativ

### **CD 68**

Die Auswertung der CD 68 Immunhistologie ergab eine positive Expression in den Riesenzellen sowie den mononukleären Makrophagen aller 17 Fälle. Wobei alle Fälle eine starke Expression zeigten.



**Abbildung 6: Verteilung der M-CSF Expression bezüglich der Diagnosen.**

Bis auf eine schwache M-CSF Expression der Riesenzellen des zentralen Rzg. konnte überwiegend eine mittlere Expression nachgewiesen werden. Es lag bei keiner Diagnose eine starke Expression vor.

## M-CSF

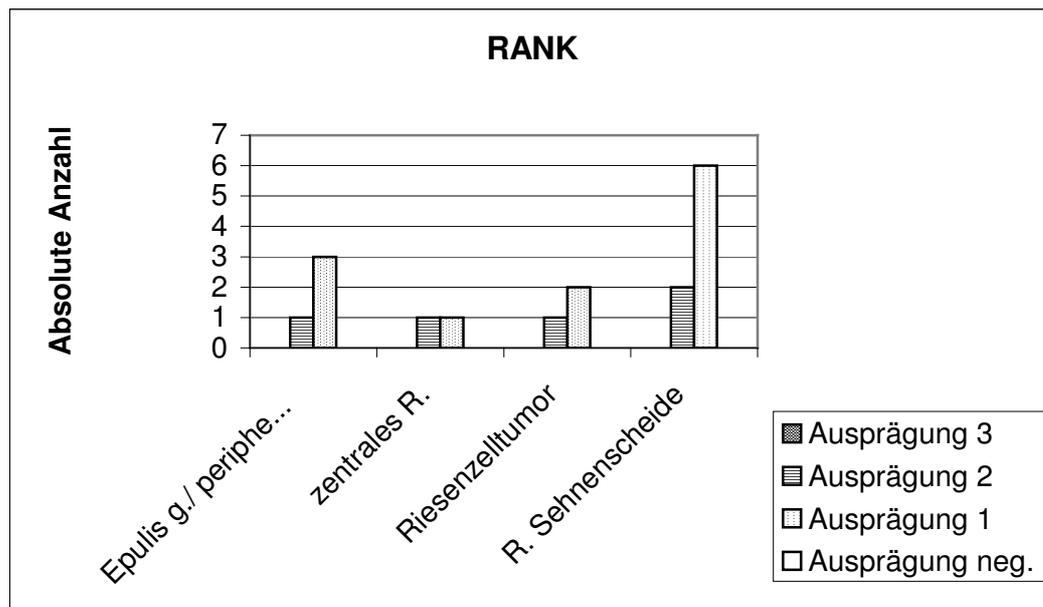
Die Auswertung der M-CSF Immunhistologie ergab eine positive Expression in den Riesenzellen in 16 von 17 Fällen (eine Gewebsstanze war nicht vorhanden). Dabei zeigte kein Fall eine starke Expression.

Die Epulis gig. / peripheres Rzg. zeigten ausschließlich eine mittlere Expression. Das zentrale Rzg. zeigte in einem Fall eine schwache Expression.

Der Riesenzelltumor zeigte in zwei Fällen eine mittelstarke Expression und in einem Fall eine schwache Expression.

Der Riesenzelltumor der Sehnenscheide zeigte größtenteils eine mittelstarke Expression und nur in einem Fall eine schwache Expression.

Zusätzlich konnten bei allen Diagnosen M-CSF positive mononukleäre Zellen nachgewiesen werden.



**Abbildung 7: Verteilung der RANK Expression bezüglich der Diagnosen.**

**Die Riesenzellen aller Diagnosen zeigten größtenteils eine schwache RANK Expression.**

## **RANK**

Die Auswertung der RANK Immunhistologie ergab eine positive Expression in den Riesenzellen in allen 17 Fällen, wobei kein Fall eine starke Expression zeigte.

Die Epulis gig. / peripherer Rzt. zeigten größtenteils eine schwache Expression, ein Fall zeigte eine mittelstarke Expression.

Das zentrale Rzg. zeigte in einem Fall eine schwache Expression und in einem Fall eine mittelstarke Expression.

Unter den Riesenzelltumoren traten ein Fall mit mittlerer und zwei Fälle mit schwacher Expression auf. Bei den Riesenzelltumoren der Sehnenscheide zeigte sich größtenteils eine schwache Expression, zwei Fälle zeigen eine mittelstarke Expression.

## **CD 51**

Die Auswertung der CD 51 Immunhistologie zum Nachweis der osteoklastären Eigenschaften der Riesenzellen in den unterschiedlichen Läsionen ergab in allen 17 Fällen eine positive Expression, wobei alle Fälle eine starke Expression zeigten.

## Auswertung der Immunhistologie der Cathepsine K, L, S und MMP9 (Abbildung 8 bis Abbildung 10)

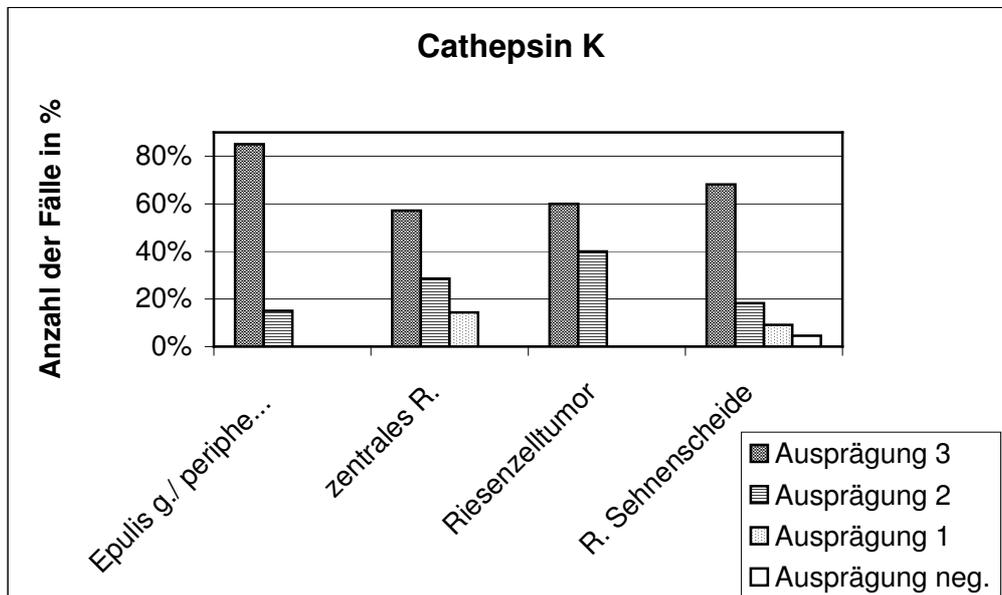


Abbildung 8: Verteilung der Cathepsin K-Expression bzgl. d. Diagnosen.

Eine starke Cathepsin K-Expression der Riesenzellen konnte bei allen Diagnosen nachgewiesen werden, insbesondere bei der Gruppe Epulis gig. / peripheres Rzg. (85%).

### Cathepsin K

Die Auswertung der Cathepsin K Expression ergab eine positive Expression in den Riesenzellen in 53 von 54 Fällen. Epulis gig. / peripheres Rzg. zeigten in 85% der Fälle eine starke Expression. Zu 15% zeigte sich eine mittelstarke Expression. Eine schwache Expression kam nicht vor.

Das zentrale Riesenzellgranulom zeigte eine eher gleichmäßige Verteilung der Expression: eine starke Expression lag in 57% der Fälle vor, aber es gab auch einen Anteil mit mittlerer Expression (28,6%) sowie einen mit schwacher Expression (14,3%).

Bei den Riesenzelltumoren zeigten 60% eine starke Expression und 40% eine mittelstarke. Eine schwache Ausprägung kam nicht vor.

Die Riesenzelltumoren der Sehnenscheide zeigten wie das periphere Riesenzellgranulom / Epulis gigantocellularis eine starke Expression (68,2%). Einige Fälle zeigten aber auch eine mittelstarke Expression (18%) oder eine schwache Expression (9,1% der Fälle). In dieser Gruppe war ein negativer Befund.

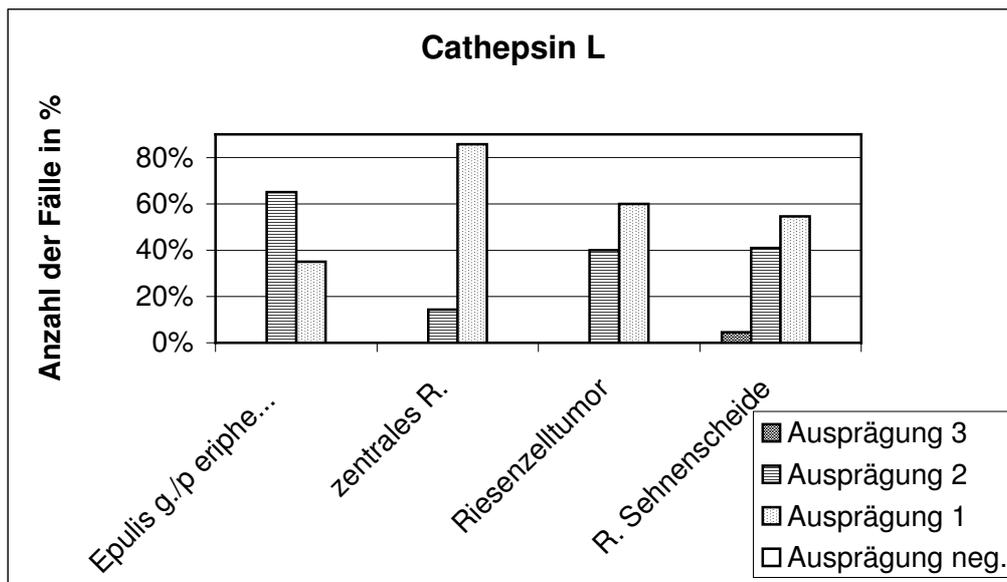


Abbildung 9: Verteilung der Cathepsin L-Expression bzgl. d. Diagnosen.

Die Gruppe Epulis gig. / peripheres Rzg. zeigte überwiegend eine mittlere Cathepsin L-Expression der Riesenzellen, während die übrigen Diagnosen größtenteils eine schwache Expression zeigten. Es kamen bei allen Diagnosen Cathepsin L positive mononukleäre Zellen vor.

## Cathepsin L

Die Auswertung der Cathepsin L Expression ergab in allen 54 Fällen eine positive Expression in den Riesenzellen.

Die Gruppe der Epulis gig. / peripheres Rzg. zeigte größtenteils eine mittlere (65%) oder eine schwache Expression (35%).

Beim zentralen Riesenzellgranulom war die Verteilung umgekehrt. Hier zeigte der größte Teil eher eine schwache Expression (85,7%) während der kleinere Teil eine mittlere Expression (14,3%) aufwies.

Die Riesenzelltumoren zeigten in 60% der Fälle eine schwache Expression, hatten aber auch einen Anteil von 40% mit mittlerer Expression.

Die Riesenzelltumoren der Sehnenscheide zeigten eine relativ gleichmäßige Verteilung der Expression: 40,9% zeigten eine mittlere und 54,5% eine schwache Expression. Eine starke Expression kam lediglich in einem Fall aus der Gruppe der Riesenzelltumoren der Sehnenscheide vor.

Zusätzlich konnten bei allen Diagnosen Cathepsin L positive mononukleäre Zellen nachgewiesen werden.

## Cathepsin S

In den Riesenzellen aller 54 Fälle konnte keine Expression von Cathepsin S nachgewiesen werden.

Allerdings zeigten sich bei den Riesenzelltumoren der Sehnenscheide Ansammlungen von positiven mononukleären Zellen, clusterartig die negativen Riesenzellen umgebend.

Bei den übrigen Diagnosen zeigten sich ebenfalls positive mononukleäre Zellen, welche allerdings diffus verteilt waren.

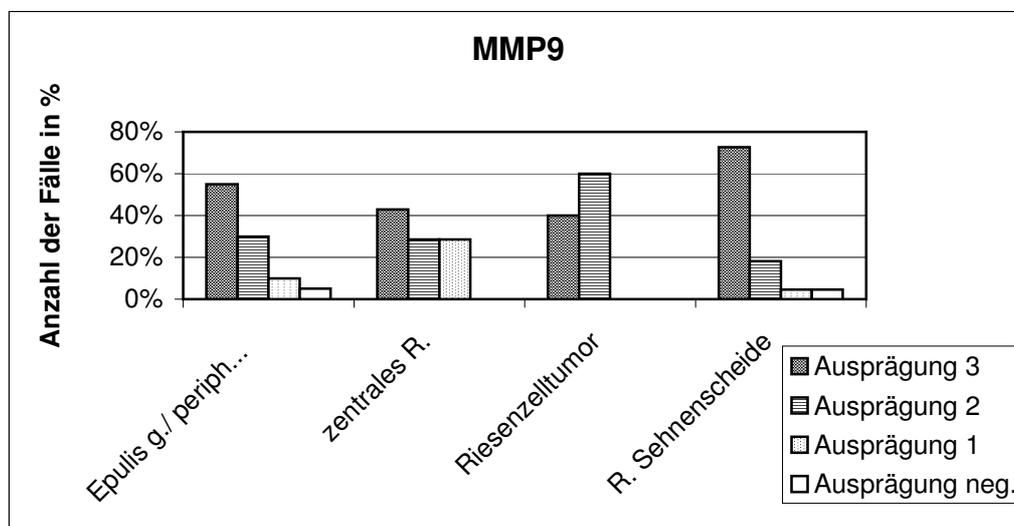


Abbildung 10: Verteilung der MMP9-Expression bezüglich der Diagnosen.

Während die Riesenzellen bei Epulis gig. / peripheres Rzg., zentrales Rzg. und Riesenzelltumor der Sehnenscheide überwiegend eine starke MMP9-Expression zeigten, wurde für den Riesenzelltumor größtenteils eine mittlere Expression nachgewiesen.

## MMP9

Die Auswertung der MMP9 Immunhistologie ergab eine positive Expression in den Riesenzellen in 51 von 54 Fällen.

Die Gruppe der Epulis gig. / peripheres Rzg. zeigte größtenteils eine starke Expression (55%). Daneben gab es eine mittlere Expression in 30% und eine schwache Expression in 10% der Fälle. In dieser Gruppe kam ein negativer Fall vor.

Das zentrale Riesenzellgranulom zeigte hinsichtlich der MMP9 Expression eine relativ gleichmäßige Verteilung, wobei der größte Teil eine starke Expression zeigte (42,9%), jeweils 28,6% zeigten eine mittlere, bzw. eine schwache Expression.

---

Die Riesenzelltumoren zeigten überwiegend eine mittlere Expression (60%). 40% zeigten eine starke Expression. Eine schwache bzw. eine fehlende Expression kam nicht vor.

Die Riesenzelltumoren der Sehnenscheide zeigten größtenteils eine starke Expression (72,7%) mit nur einem geringen Anteil (18,2%) mit mittlerer Expression. Ein Fall zeigte eine schwache Expression und ein Fall war negativ.

## Auswertung der klinischen Parameter

Hierzu wurden die Panoramaschichtaufnahmen von 10 Fällen nach folgenden Kriterien ausgewertet (Tabelle 2):

- Existenz von Osteolyseherden im Kieferknochen im Bereich der Riesenzell-Läsion
- Größe der radiologisch darstellbaren Osteolyseherden
- Korrelation mit der Cathepsin-Expression

**Tabelle 2: Klinische Parameter.**

Diagnose*	Lokalisation*	Regio		Alter	Fall-Nr.	Röntgenbefund: Osteolyse	Röntgenbefund: regio	Cath. K In Rz.	Cath. L In Rz.	Cath. S In Rz.	MMP9 in Rz.
Zentrales Riesenzellgranulom	UK	regio 46	m	52	51	Ja	regio 46, aufsteigender Ast regio F. mandibulae von der linea obliqua bis zum Kieferwinkel	2	1	negativ	2
Zentrales Riesenzellgranulom	UK	regio 46	w	75	53	Ja	regio 46 apikal, Zustand nach WSR	1	1	negativ	1
Zentrales Riesenzellgranulom	UK	regio 46-47	w	33	54	Ja	regio 48-45	3	1	negativ	3
Riesenzelltumor	Kieferwinkel extraoral	unbekannt	m	8	23	Ja	Kieferwinkel re klein, muldenförmig	3	1	negativ	3
Epulis gigantocellularis	?	unbekannt	m	9	1	nein	unbekannt	3	1	negativ	1
Epulis gigantocellularis	UK	regio 45	m	67	10	nein	unbekannt	3	1	negativ	2
Epulis gigantocellularis	OK	regio 11-12	m	60	5	nein	unbekannt	3	2	negativ	1
peripheres Riesenzellgranulom	OK	regio 21-22	m	43	14	nein	unbekannt	3	2	negativ	3
peripheres Riesenzellgranulom	UK	regio 35-37	w	69	48	nein	unbekannt	3	1	negativ	3
Zentrales Riesenzellgranulom	UK	regio 33-34	w	13	52	Ja	regio 33-34 mit Verdrängung der Zahnwurzeln	2	1	negativ	2

---

Panoramaschichtaufnahmen lagen bei 10 Fällen vor. Bei 5 Fällen war die Diagnose Epulis gigantocellularis / peripheres Rzg. gestellt worden. Bei diesen Fällen war röntgenologisch keine Osteolyse nachweisbar. Allerdings zeigten alle Fälle eine starke Cathepsin K Expression.

Bei der Gruppe Epulis gig. / peripheres Rzg. konnte bei der immunhistologischen Untersuchung der Großschnitte in 85% der Fälle eine starke Cathepsin K Expression nachgewiesen werden.

Bei 4 Fällen war die Diagnose zentrales Riesenzellgranulom gestellt worden. Diese Fälle zeigten alle eine Osteolyse mit unterschiedlicher Ausprägung. Die Cathepsin K Expression war ebenfalls unterschiedlich ausgeprägt, sie reichte von schwach positiv bis stark positiv.

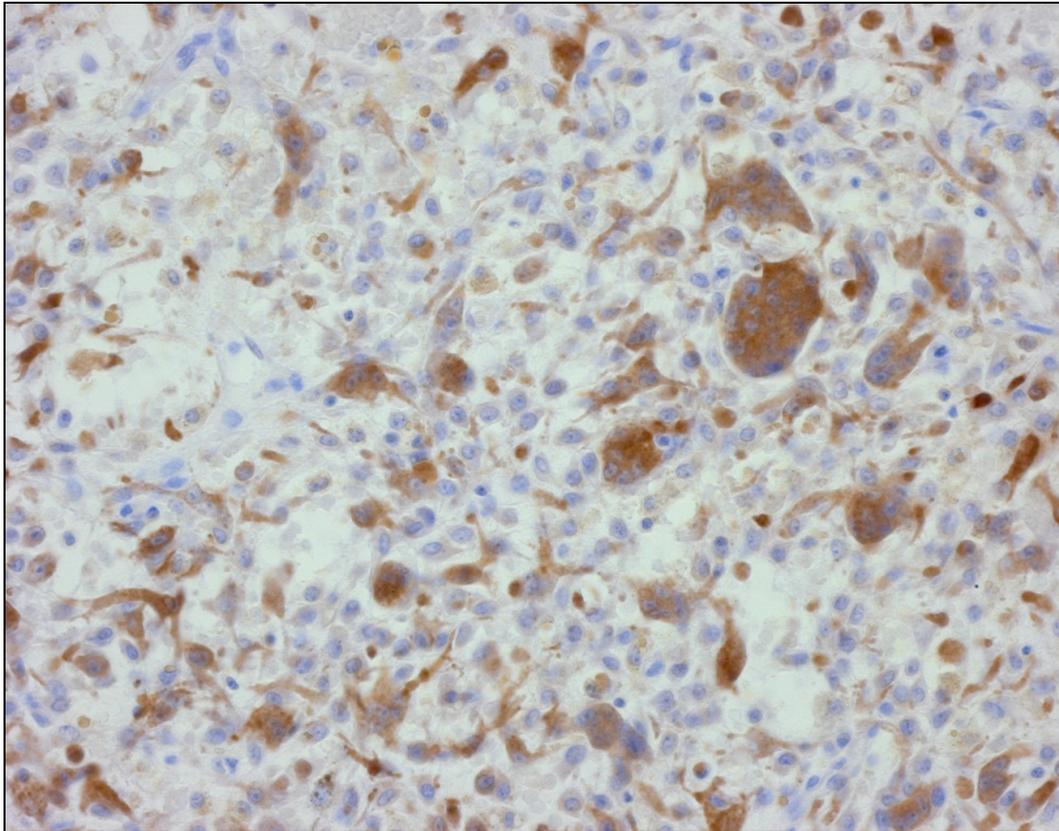
Bei einem Fall war die Diagnose Riesenzelltumor gestellt worden, er zeigte eine kleinflächige Osteolyse bei starker Cathepsin K Expression.

---

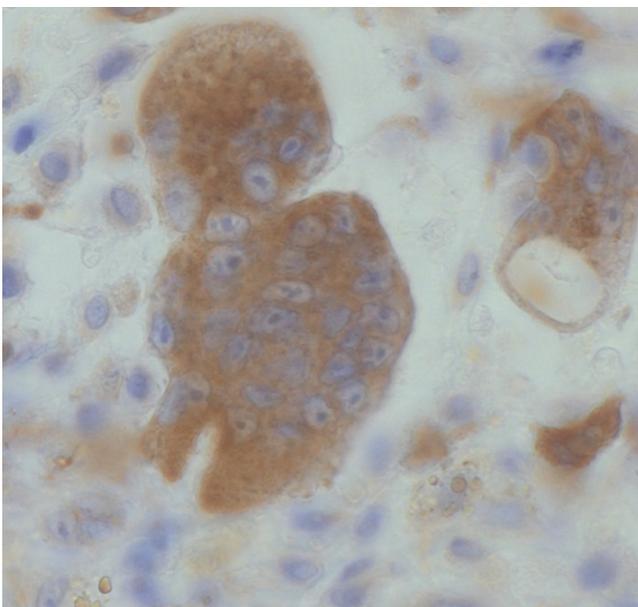
## ***Immunhistochemische Abbildungen***

**Immunhistologie der Cathepsine K, L, S und MMP9 (Abbildung 11 bis Abbildung 18)**

*Cathepsin K*



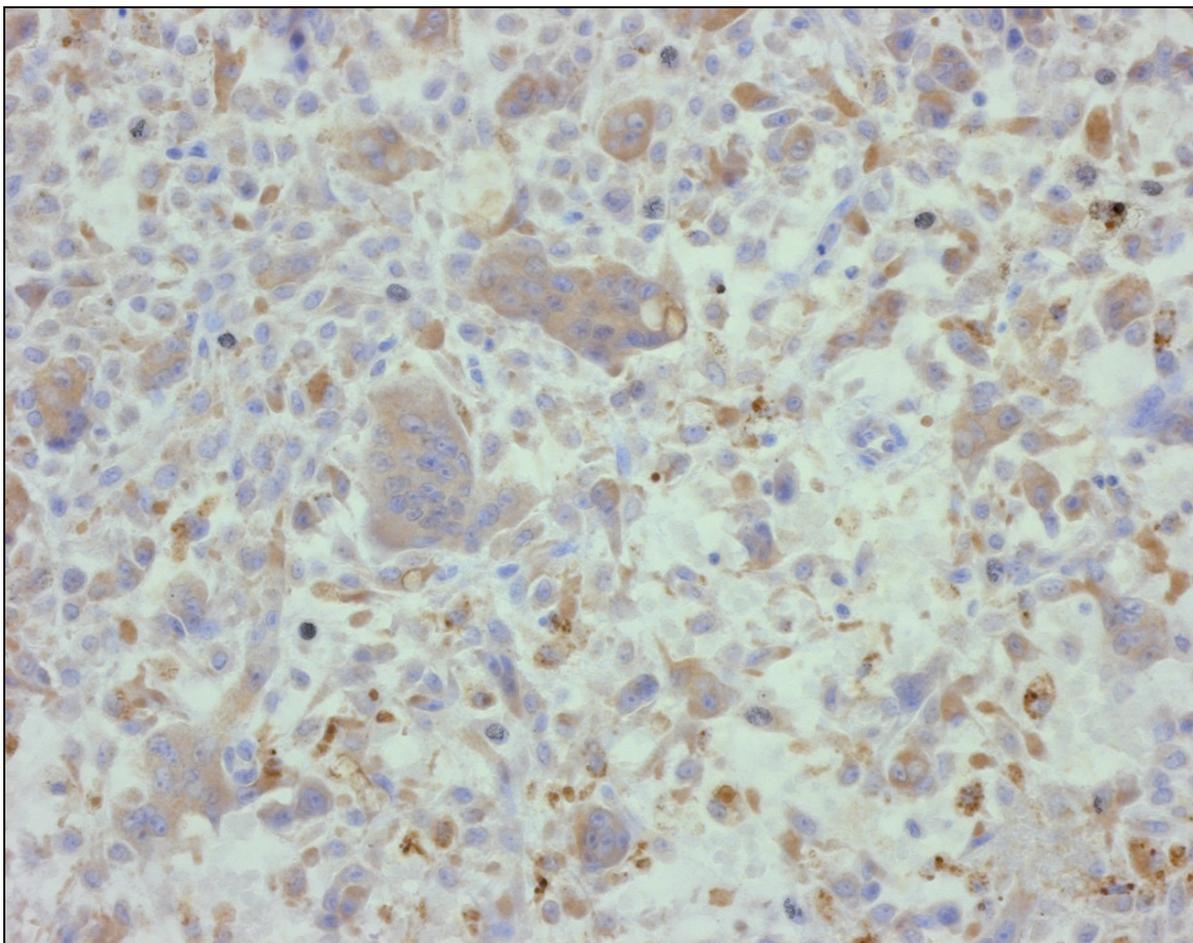
**Abbildung 11: Cathepsin K positive Riesenzellen einer Epulis gigantocellularis bei 10-facher Vergrößerung**



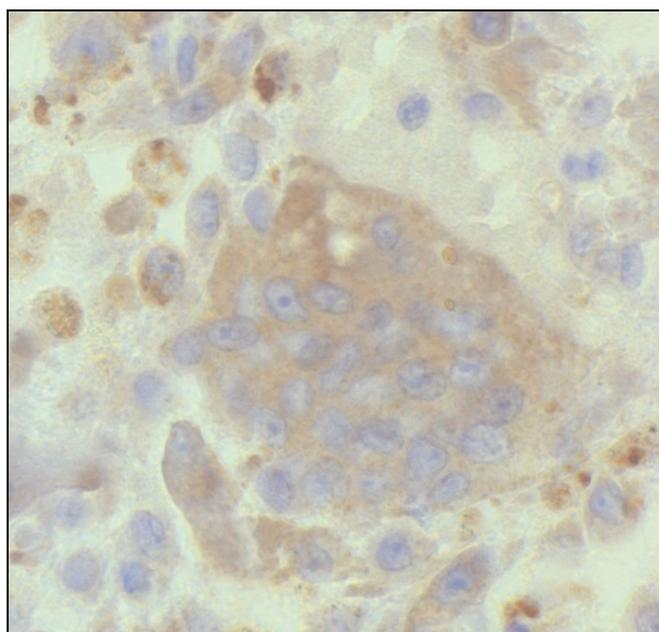
**Abbildung 12: Cathepsin K: Zytoplasmatisch angefärbte mehrkernige Riesenzellen einer Epulis gigantocellularis bei 40-facher Vergrößerung**

---

*Cathepsin L*



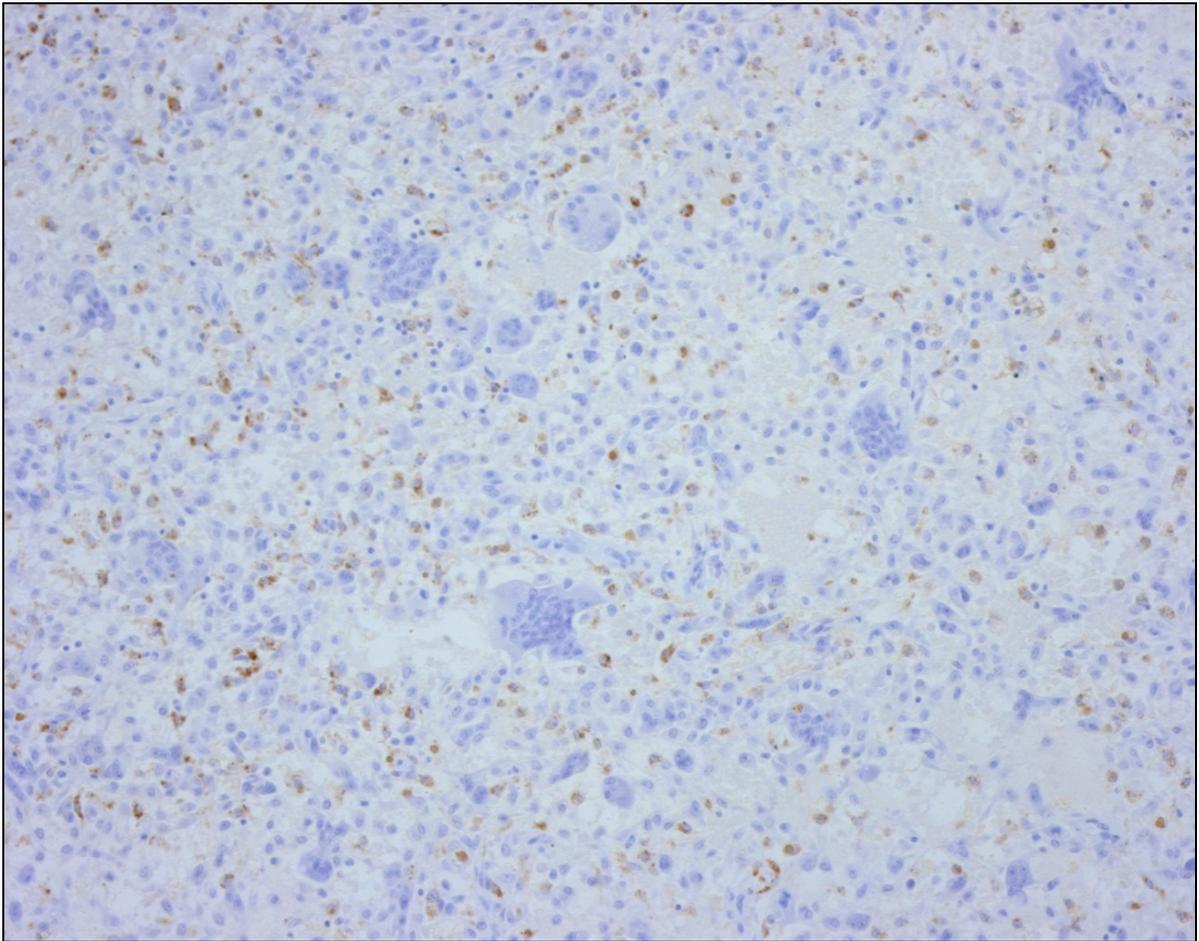
**Abbildung 13: Cathepsin L positive Riesenzellen einer Epulis gigantocellularis bei 20-facher Vergrößerung**



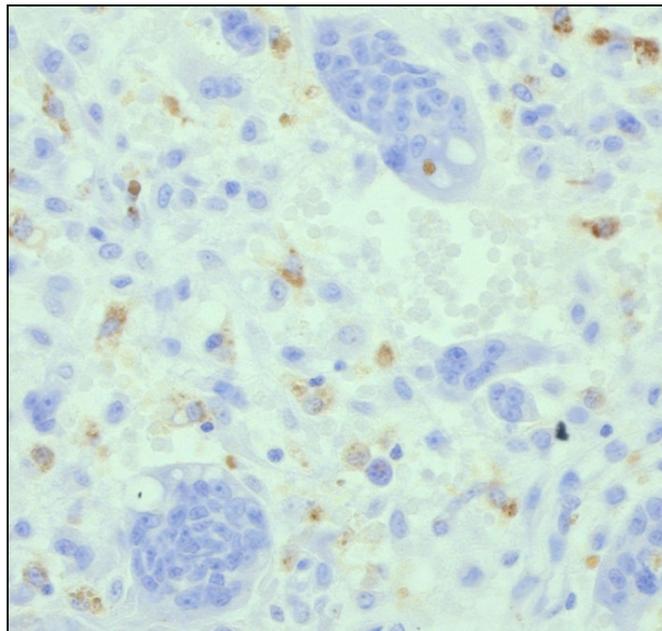
**Abbildung 14: Schwach Cathepsin L positive Riesenzelle einer Epulis gigantocellularis bei 40-facher Vergrößerung**

---

*Cathepsin S*



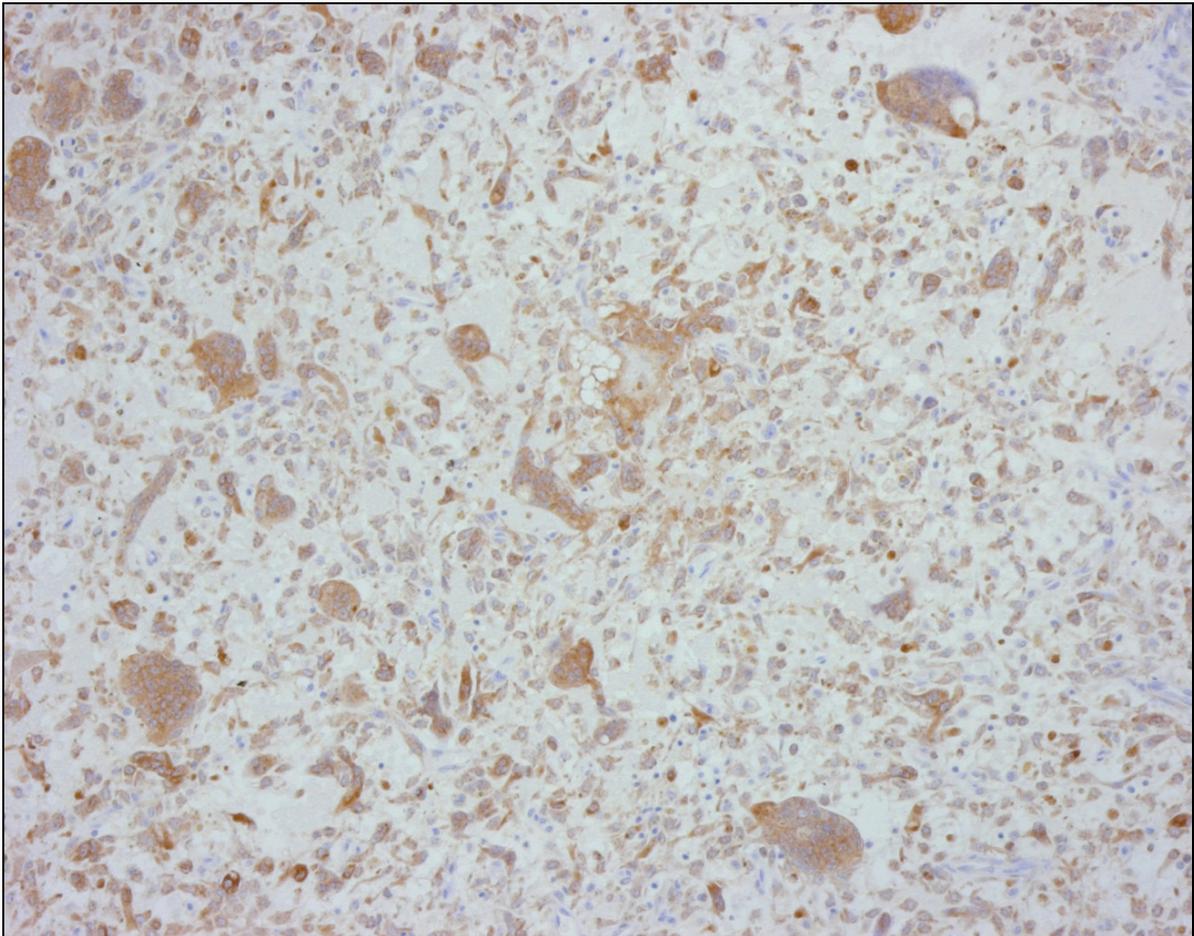
**Abbildung 15: Cathepsin S negative Riesenzellen und Cathepsin S positive mononukleäre Zellen einer Epulis gig. bei 10-facher Vergrößerung**



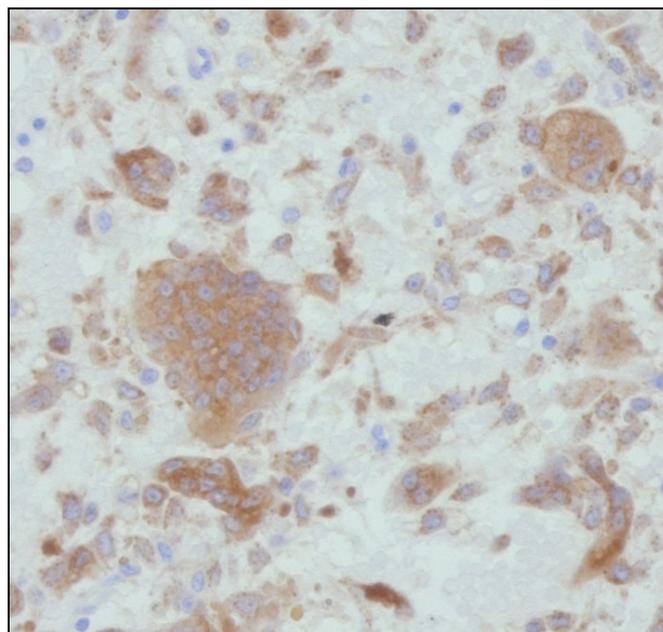
**Abbildung 16: Cathepsin S negative Riesenzellen einer Epulis gigantocellularis bei 20-facher Vergrößerung. Vereinzelt Cathepsin S positive mononukleäre Zellen.**

---

*MMP9*



**Abbildung 17: MMP9 positive Riesenzellen einer Epulis gigantocellularis bei 10-facher Vergrößerung**



**Abbildung 18: MMP9 positive Riesenzellen einer Epulis gigantocellularis bei 20-facher Vergrößerung**

## Immunhistologie von CD 68, CD 51, M-CSF und RANK

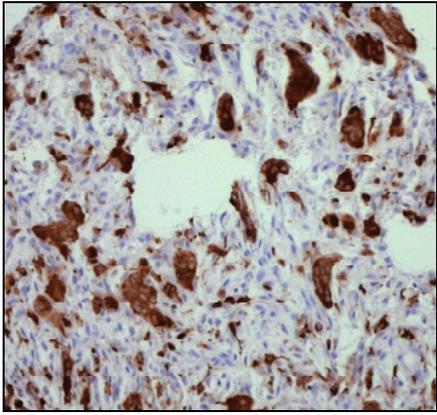
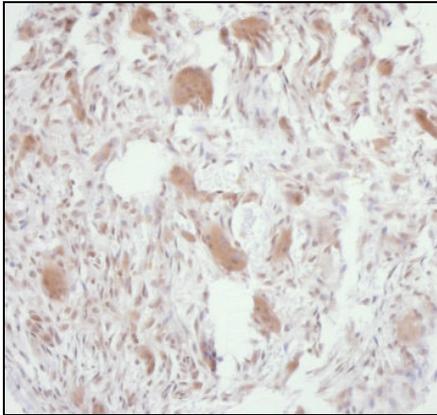
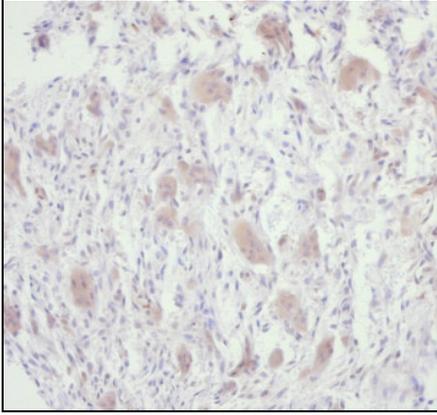
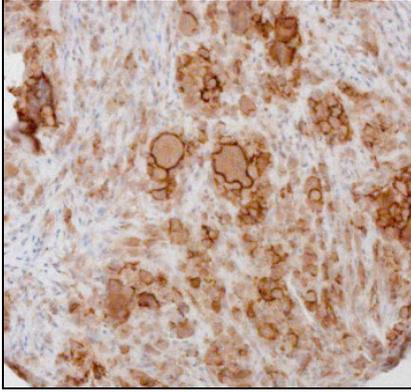
 <p><i>Starke CD 68-Expression der Riesenzellen bei einem peripheren Riesenzellgranulom</i></p>	 <p><i>Mittlere M-CSF-Expression der Riesenzellen bei einem peripheren Riesenzellgranulom</i></p>
 <p><i>Schwache RANK-Expression der Riesenzellen eines peripheren Riesenzellgranulom</i></p>	 <p><i>CD 51-positive Riesenzellen mit Membranfärbung (Riesenzelltumor der Sehnenscheide)</i></p>

Abbildung 19: Immunhistologie von CD 68, CD 51, M-CSF und RANK

---

## 5. Diskussion

Im Verlauf einer Epulis gigantocellularis treten ähnlich wie bei anderen tumorösen riesenzelligen Läsionen (zentrales Riesenzellgranulom, Riesenzelltumoren) häufig Osteolyseherde auf.

Aufgrund neuerer Studien an Riesenzelltumoren des Knochens liegt die Vermutung nahe, dass Cathepsine ursächlich sind für das Auftreten von Osteolysen. Weiterhin scheinen auch die zelluläre Zusammensetzung des Tumors sowie die Lokalisation des Tumors von Bedeutung zu sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, nachzuweisen, welche Proteasen und welche Zelltypen für die Osteolyse bei einigen Fällen der Epulis gigantocellularis verantwortlich sind, und inwieweit die Osteolyse für das Krankheitsbild spezifisch ist.

Um zu bestimmen, von welchen Zellen welche Proteasen und in welchem Maß exprimiert werden, wurden die zur Makrophagen-Reihe gehörenden Zellen der Läsionen über ihre spezifischen Oberflächenmarker charakterisiert.

Um Rückschlüsse auf die Funktion machen zu können, wurde der osteoklastäre Charakter der Riesenzellen abschließend über spezifische Rezeptoren (Vitronectin-Rezeptor= CD 51) und Zytokine nachgewiesen.

Die Cathepsine K, L, und S sind von wesentlicher Bedeutung für den Umbau von zellulären und extrazellulären Proteinen. Es handelt sich bei diesen Enzymen um lysosomalen Cysteinproteasen, die eine wichtige Rolle bei allen pathologischen Prozessen, die mit Gewebedestruktion verbunden sind, spielen.

In dieser Studie ergaben die immunhistologischen Untersuchungen, dass Cathepsin K in den meisten der untersuchten Fälle ausschließlich in den mehrkernigen Riesenzellen exprimiert wird. Es handelt sich überwiegend um eine starke Expression. Mit Ausnahme eines Riesenzelltumors der Sehnenscheide, der einen negativen Befund zeigte, zeigten alle untersuchten riesenzellhaltigen Läsionen dasselbe Reaktionsmuster. Insbesondere in der Gruppe Epulis gig. / peripheres Rzg. zeigten 85% der Fälle eine starke Cathepsin K Expression in den Riesenzellen, während die übrigen 15% dieser Gruppe eine mittlere Expression zeigten. Die Auswertung der Röntgenbilder in dieser Gruppe (5 Fälle) ergab trotz starker Cathepsin K Expression klinisch in keinem Fall eine Osteolyse des Kieferknochens.

---

Cathepsin L wurde in allen untersuchten Läsionen sowohl in mononukleären Zellen als auch Riesenzellen exprimiert. Bei den Epuliden gig. / peripheres Rzg. lag in der Mehrzahl der Fälle eine mittlere Cathepsin L Expression vor. Bei allen anderen riesenzellhaltigen Läsionen (Riesenzelltumor, zentrales Rzg. und Riesenzelltumor der Sehnenscheide) waren ebenfalls neben den Riesenzellen mit größtenteils schwacher Expression die mononukleären Zellen positiv für Cathepsin L.

Eine Cathepsin S Expression wurde bei allen untersuchten Läsionen ausschließlich in mononukleären Zellen gefunden.

Eine starke MMP9 Expression zeigten die Riesenzellen der Epulis gig. / peripheres Rzg., der zentralen Rzg. und der Riesenzelltumoren der Sehnenscheide. In den Riesenzelltumoren anderer Lokalisation konnte in den Riesenzellen meistens eine mittlere Expression nachgewiesen.

Verschiedene Untersuchungen belegen eine Cathepsin K Expression speziell in Osteoklasten und einen direkten Zusammenhang zum Auftreten einer Knochenresorption. So konnte durch kompetitive RT-PCR (Ishibashi et al., 2001) und *in-situ*-Hybridisierung (Drake et al., 1996) eine starke Cathepsin K m-RNA Expression selektiv in Osteoklasten nachgewiesen werden. Littlewood-Evans et al. (1997) konnten diesen Befund durch weitere immunhistologische Untersuchungen und *in situ* Hybridisierung belegen. Allerdings fanden sie eine Cathepsin K Expression ebenfalls in mononukleären Zellen, die demnach vermutlich osteoklastäre Progenitorzellen darstellen. Während die Cathepsin K Expression unabhängig von pathologischen Veränderungen und anatomischer Lokalisation auf mehrkernige Riesenzellen und Epitheloidzellen begrenzt ist, kommt Cathepsin K in normalen Makrophagen nicht vor (Bühling et al., 2001). Auch Lindemann et al. (2004) konnten immunhistologisch speziell in Riesenzelltumoren des Knochens eine erhöhte Cathepsin K Expression ausschließlich in „osteoclast-like“ Riesenzellen nachweisen und machten Cathepsin K maßgeblich für die Osteolyse beim Riesenzelltumor verantwortlich.

Der lysosomalen Cysteinprotease Cathepsin K kommt eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Knochenresorption zu. So konnte einerseits gezeigt werden, dass die Knochenresorption mit der Expression von Cathepsin K korreliert (Littlewood-Evans et al., 1997; Saneshige et al., 1995; Kahudo et al., 1997;

---

Mano et al., 1996). Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass die Knochenresorption bei Abwesenheit von Cathepsin K beeinträchtigt ist (Inui et al., 1997; Gelb et al., 1996).

Als Substrat für das aktivierte Cathepsin K wurden von Bossard et al. (1996) in der Knochenmatrix die Proteine Osteonectin und die Collagene identifiziert. Eine Studie von Zaidi et al. (2001) zeigte, dass Cathepsin K und MMP9 in der Lage sind, sowohl Collagen Typ I, als auch Collagen Typ II zu spalten.

Für die Degradierung von Collagenen im menschlichen kortikalen Knochen machen Ganero et al. (1998) einzig die Aktivierung von Cathepsin K verantwortlich und postuliert, dass keine weiteren Enzyme für den Prozess der Osteolyse notwendig sind.

Die Rolle der Cathepsine L und S bei der Knochenresorption ist unklar, obwohl diese Proteasen lange im Verdacht standen, ebenfalls an dem Prozess der Knochenresorption wesentlich beteiligt zu sein. Dieser Verdacht konnte nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, es konnte durch mehrere Studien nachgewiesen werden, dass die Zugabe spezifischer Inhibitoren für Cathepsin L die Osteoklasten-induzierte Knochenresorption nicht stört (James et al., 2001). Cathepsin L kommt somit im Vergleich zu Cathepsin K bei der Knochenresorption eine untergeordnete Rolle zu (Ishibashi et al., 2001).

Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) im Allgemeinen, darunter MMP9 speziell (Schoedel et al., 1996) wurden mit dem lokal aggressiven Verhalten von Riesenzelltumoren in Verbindung gebracht. Allerdings ist weiter unklar, ob diese Proteasen direkt für die Osteolyse verantwortlich sind.

Entsprechend der vorliegenden Ergebnissen konnte auch von Lindeman et al., (2004) gezeigt werden, dass sowohl MMP9, Cathepsin K und auch Cathepsin L in Riesenzelltumoren des Knochens exprimiert werden.

Neben der Expression der jeweiligen Proteasen ist auch deren Aktivitätszustand von zentraler Bedeutung.

Mit Hilfe von spezifischen Protease-Aktivitätsassays konnte nachgewiesen werden, dass lediglich Cathepsin K eine hohe Aktivität besitzt, während MMP9 zu 98% als inaktives Proenzym vorliegt und ihm in der Form nur eine untergeordnete Rolle bei der Osteolyse zukommt. Die Aktivität der Protease

---

Cathepsin K ist pH-Wert abhängig, sie braucht ein saures Milieu, um ihre proteolytische Wirkung entfalten zu können (Blair et al.1989, Baron et al.1988, Vaananen 1990, Hall et al.1996). Dieses saure Milieu schaffen Ionen- und Protonenpumpen im Bereich der „ruffle borders“ der Osteoklasten erst, wenn sich diese an der Knochenoberfläche angeheftet haben. Ist ein Anheften der Osteoklasten an die Knochenoberfläche nicht möglich, so können die osteolytischen Proteasen nicht aktiv werden (Dodds et al.2001). Ist Cathepsin K nicht aktiv, so kann auch MMP9 nicht wirksam werden. Dies könnte erklären, warum sowohl Cathepsin K, als auch MMP9 zwar in allen Läsionen meist stark exprimiert wurde, aber trotzdem keine Osteolyse zu beobachten war. Versuche an Zelllinien (aus Riesenzelltumoren) zum osteolytischen Potenzial von mononukleären Zellen ergaben auch für Cathepsin L- positive mononukleäre Zellen, dass diese keine osteolytische Aktivität besitzen und damit nicht an der Knochenresorption beteiligt sind (Lindeman et al., 2004).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass eine starke Cathepsin K Expression in „osteoclast like“ Riesenzellen nicht zwingend zur Osteolyse des Knochens führt. Untersuchungen an Riesenzelltumoren des Knochens haben dagegen gezeigt, dass bei diesen Tumoren Cathepsin K die wichtigste Protease ist, die ausschließlich von den „osteoclast-like“ Riesenzellen exprimiert wird und maßgeblich für die Osteolyse des Knochens verantwortlich ist (Lindeman et al., 2004). Eine Erklärung für diese anscheinend widersprüchlichen Ergebnisse könnte sein, dass Cathepsin K nicht als reifes (mature) sondern als Procathepsin K vorliegt.

Ein weiterer Aspekt könnte die Lokalisation der Riesenzellen sein, d.h. die Entfernung zum angrenzenden Knochen. Zur Quantifizierung von Cathepsin K in Abhängigkeit von der Lokalisierung wurde zytochemisch die Aktivität in Osteoklasten von Riesenzelltumoren des Knochens und in menschlichem Knochen bestimmt. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass Osteoklasten, die entfernt vom Knochen liegen zwar einen hohen Anteil an Cathepsin K mRNA und -Protein exprimieren, der überwiegende Anteil des Cathepsin Ks in diesen Zellen aber in einer inaktiven, so genannten zymogenen Form vorliegt (Dodds et al., 2001). Im Gegensatz dazu enthalten Osteoklasten, die sich näher am Knochen befinden, reifes und damit aktives Cathepsin K. Dodds et al. (2001) konnten darüber hinaus zeigen, dass die in vivo Aktivierung von Cathepsin K vor Beginn der Knochenresorption intrazellulär erfolgt, um anschließend in die Resorptionslücke sezerniert zu werden.

---

Folglich könnte die topografische Lage der Epulis gig. zum angrenzenden Knochen maßgeblich dafür verantwortlich sein, ob in dieser Läsion Cathepsin K in den „osteoclast-like“ Riesenzellen in aktiver Form oder als Proenzym vorliegt. Dies würde erklären, warum nicht in jedem Fall das Krankheitsbild der Epulis gig. durch eine Osteolyse gekennzeichnet ist.

Liu et al. (2003) untersuchten verschiedenen Riesenzell-Läsionen des Kiefers mit immunhistologischen Methoden hinsichtlich einer Cathepsin K Expression. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die mehrkernigen Riesenzellen in peripheren und zentralen Riesenzellgranulomen des Kiefers den charakteristischen Phänotyp von Osteoklasten zeigen. In Riesenzellen des Cholesteatoms, einer Läsion, die typischerweise eine progressive Knochenerosion am umgebenden Knochen zeigt, konnten Hansen et al. (2001b) eine erhöhte Cathepsin K mRNA- und Protein-Expression nachweisen. Weiterhin wiesen sie in Riesenzellen eines Riesenzelltumors der Sehnenscheide eine erhöhte Cathepsin K Expression nach und postulierten daraufhin eine nahe Verwandtschaft dieser Riesenzellen zu Osteoklasten (Hansen et al., 2001a). Aber auch bei zahlreichen anderen Erkrankungen mit invasivem Charakter wurde eine starke Cathepsin K Expression in „osteoclast-like“ Riesenzellen gefunden; so auch in einem Riesenzell-reichen Karzinom des Pankreas (Hansen et al., 2002). Im Falle eines anaplastischen Schilddrüsenkarzinom ergab sich ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Cathepsin K Expression in den „osteoclast-like“ Riesenzellen und dem invasiven Charakter des Tumors sowie der Fähigkeit, die knorpelige Trachea zu destruieren (Gaumann et al., 2001).

Ergänzend konnten Drake et al. (1996) entsprechend der vorliegenden Ergebnisse anhand von in situ Hybridisierungen zeigen, dass Osteoklasten nicht oder nur schwach Cathepsin S und L mRNA exprimieren. Demgegenüber konnten Lindeman et al. (2004) anhand von mRNA Profilen nachweisen, dass die Cathepsine K und L sowie MMP9 die bevorzugt exprimierten Kollagenasen in den Riesenzelltumoren des Knochens sind und lediglich Cathepsin L in mononukleären Zellen positiv war. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen ergaben unabhängig von der Diagnose eine Cathepsin S-Expression ausschließlich in mononukleären Zellen und eine Cathepsin K-Expression ausschließlich in Riesenzellen während Cathepsin L sowohl in Riesenzellen als auch in mononukleären Zellen exprimiert wird.

---

Kennzeichnend für reife Osteoklasten ist die Expression des Vitronectinrezeptors, der die Zell-Substrat-Interaktion zwischen Osteoklasten und dem Knochen vermittelt. Hierbei ist der Rezeptor lediglich für die Funktion der Osteoklasten von Bedeutung, nicht aber, wie ursprünglich vermutet, für die finale Versiegelung der Osteoklasten nach Anheftung an die mineralisierte Knochenoberfläche (Lakkakorpi et al., 1991). Die immunhistologischen Untersuchungen bestätigten durch den Nachweis einer starken CD51-Expression den „osteoclast-like“-Charakter der Riesenzellen in allen untersuchten Läsionen.

Maßgeblich für die Funktion der Riesenzellen in den Läsionen ist nicht nur ihr Enzymspektrum, sondern auch der Aktivierungszustand der Zellen, der u.a. über Osteoklasten-induzierende Faktoren wie RANKL und M-CSF und deren Rezeptoren RANK bzw. c-fms reguliert wird. Bei RANKL und M-CSF handelt es sich um Zytokine, die laut Literaturdaten auch an der Osteoklastogenese beteiligt sind (Atkins et al., 2000; Romas et al., 2000; Suda et al., 1995; Li et al., 2000). Der immunhistologische Nachweis von RANK und M-CSF sollte u.a. dazu beitragen zu klären, inwieweit in den beteiligten Riesenzellen die Osteoklasten-spezifischen Eigenschaften aktiviert sind.

RANK und M-CSF ließen sich bei allen untersuchten Läsionen in den Riesenzellen nachweisen, wobei RANK überwiegend nur schwach exprimiert war, während M-CSF überwiegend eine mittlere Expression zeigte. Zusätzlich konnte M-CSF in mononukleären Zellen nachgewiesen werden.

RANKL gilt als Mediator für den Knochenabbau. Dieses Zytokin fungiert als interzellulärer Signalüberträger von Osteoblasten zu Osteoklasten. RANK ist der Rezeptor auf den Osteoklasten, und in Gegenwart von M-CSF stimuliert RANKL die Differenzierung aus Monozyten/Makrophagen über Osteoklasten-Vorläuferzellen hin zu reifen Osteoklasten (Kobayashi et al., 2000).

M-CSF ist ein Wachstumsfaktor, der sowohl im Rahmen der Entzündungsreaktion, als auch im Verlauf der osteoklastären Differenzierung von Bedeutung ist.

Das Fehlen von Osteoklasten in op/op Osteopetrosemäusen ist eine Folge mangelnder bzw. fehlerhafter M-CSF Synthese (Yoshida et al., 1990).

Der positive Nachweis von RANK und M-CSF in allen in dieser Studie untersuchten Läsionen lässt ebenfalls vermuten, dass RANK und RANKL in Verbindung mit M-CSF eine wichtige Rolle bei der Osteolyse in den untersuchten Läsionen spielen. Die schwache Expression von RANK bei der

---

Mehrzahl der Epuliden gig. kann ein Grund für die fehlende Osteolyse sein. Yoshida et al. (2003) fanden in Riesenzelltumoren der Sehnenscheide eine RANKL- und M-CSF Expression sowohl in Riesenzellen als auch in mononukleären Zellen. Sie vermuteten daraufhin, dass die Riesenzellen ebenfalls, durch das Sezernieren dieser Faktoren, zur Osteoklastendifferenzierung beitragen. Dies steht im Gegensatz zu der gängigen Meinung, M-CSF würde lediglich durch Osteoblasten exprimiert. Auch in dieser Studie konnte eine M-CSF Expression durch die Riesenzellen nachgewiesen werden. Morgan et al. (2005) konnten zeigen, dass die Osteoklasten in Riesenzelltumoren des Knochens RANKL mRNA und Protein stärker exprimieren als die umgebenden Stromazellen. Ursprünglich war man davon ausgegangen, dass neoplastische Stromazellen RANKL exprimieren und normale Monozyten in Osteoklasten umwandeln, die dann für die knöchernen Destruktion verantwortlich wären (Atkins et al., 2000). Demgegenüber schrieben Tsurukai et al. (2000) der RANKL Expression in Osteoblasten eine wichtige Rolle zu. Sie vermuten, dass Osteoklastenvorläuferzellen bereits im knöchernen Milieu vorhanden sind und die Geschwindigkeit der Differenzierung zu Osteoklasten über osteotropische Faktoren reguliert wird.

Der immunhistologische Nachweis der osteolytisch wirkenden Enzyme und die immunhistologischen Untersuchungen zur Charakterisierung der Riesenzellen zeigen, dass alle untersuchten Riesenzell-Läsionen (Epulis gigantocellularis, peripheres Riesenzellgranulom, zentrales Riesenzellgranulom, Riesenzelltumor und Riesenzelltumor der Sehnenscheide) auf zellulärer Ebene die Voraussetzungen für einen Osteoklasten-vermittelten Knochenabbau besitzen.

Die Riesenzellen exprimieren neben osteolytisch wirkenden Proteasen auch osteoklasten-aktivierende Zytokine, die in den Knochenstoffwechsel regulierend eingreifen können.

Weitere Untersuchungen an Epuliden gig. mit klinisch nachweisbaren Osteolyseherden sind erforderlich, um die Vermutung einer lokalisationsabhängigen Enzym- und Osteoklasten-Aktivierung zu verifizieren.

---

## Zusammenfassung

Bei der Epulis gigantocellularis handelt es sich um einen Weichgewebstumor, welcher der Gingiva halbkugelig aufsitzt. Im darunter liegenden Knochen kommen häufig ausgedehnte Osteolysen vor. Um zu klären, ob die zelluläre Zusammensetzung dieser Läsion und das Expressionsprofil der am Prozess der Osteolyse beteiligten Proteasen dem anderer Riesenzell-Läsionen entspricht, oder ob für dieses Krankheitsbild spezifische Veränderungen vorliegen, wurden vergleichende immunhistologische Untersuchungen an 54 Riesenzell-Läsionen des Kiefers (n=30), der Sehnenscheide (n=22) und der Speicheldrüsen (n=2) vorgenommen.

Um die beteiligten Zellen näher zu charakterisieren und zu klären, ob die Riesenzellen osteoklastenspezifische oder –ähnliche Merkmale aufweisen, wurden an Tissue-Micro-Arrays immunhistologische Untersuchungen mit den Antikörpern CD 68, CD 51, RANK und M-CSF durchgeführt.

Die Riesenzellen ließen sich in allen untersuchten Läsionen über die Marker CD 68 (Makrophagen/Monozyten) und CD 51 (Vitronectin-Rezeptor, Osteoklasten-spezifischer Marker) identifizieren.

Die Osteoklastendifferenzierungs- und –aktivierungsfaktoren RANK und M-CSF konnten in allen untersuchten Läsionen nachgewiesen werden. Epuliden, bei denen eine fehlende Osteolyse durch den klinischen Befund belegt werden konnte, fielen durch eine mittlere Expression von M-CSF in den Riesenzellen und in den Stromazellen auf, während RANK von den mono- und multinukleären CD 68 positiven Zellen nur schwach exprimiert wurde.

Zum Nachweis der Proteasen, die an der Osteolyse beteiligt sind, wurden immunhistologische Untersuchungen mit Antikörpern gegen Cathepsin K, L, S und der Metalloproteinase 9 (MMP9) durchgeführt.

Cathepsin K ließ sich in den Riesenzellen aller untersuchten Riesenzell-Läsionen nachweisen. Hier konnte bei den Epuliden (Epulis gigantocellularis / peripheres Riesenzellgranulom), für die klinische Befunde vorlagen, trotz besonders stark ausgeprägter Expression, röntgenologisch keine Osteolyse nachgewiesen werden. Die Matrix-Metalloproteinase MMP9 konnte erwartungsgemäß in den Riesenzellen aller Riesenzell-Läsionen nachgewiesen werden. Cathepsin S kam lediglich in mononukleären CD 68 positiven Zellen vor, wohingegen Cathepsin L sowohl in mononukleären als auch in mehrkernigen Riesenzellen nachweisbar war.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die zelluläre Zusammensetzung der untersuchten Läsionen gleich ist, und dass die Riesenzellen dieselben osteolytisch wirkenden Proteasen enthalten und z.T. auch Zytokine

---

exprimieren, die an der Regulation des Knochenstoffwechsels beteiligt sind. Damit weisen die Riesenzellen aller untersuchten Läsionen osteoklastenspezifische Merkmale auf und besitzen folglich alle Voraussetzungen, Knochenmatrix abzubauen.

Ursache für die fehlende Osteolyse bei einigen Epuliden kann einerseits die topografische Lage der Läsion sein, da mehreren Studien zufolge trotz nachweisbarer Enzymexpression, nur diejenigen Osteoklasten „reifes“ Cathepsin K exprimieren, die sich nahe am Knochen befinden. Für die Differenzierung von mononukleären Zellen zu reifen Osteoklasten ist ein Zusammenwirken von Ligandenbindung und Stimulation durch M-CSF erforderlich, so dass andererseits auch, trotz nachweisbarem M-CSF, eine verminderte Anzahl von Bindungsstellen, wie die geringe Expression von RANK zeigt, eine fehlende oder reduzierte Osteolyse begründen kann.

---

## Literaturverzeichnis

Atkins GJ, Haynes DR, Graves SE, Evdokiou A, Hay S, Bouralexis S, Findlay DM (2000): Expression of osteoclast differentiation signals by stromal elements of giant cell tumors. - J Bone Miner Res 4:640-9

Baron R, Neff L, Brown W, Courtoy PJ, Louvard D, Farquhar MG (1988): Polarized secretion of lysosomal enzymes: Codistribution of cation-independent mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzymes along the osteoclast exocytic pathway.-J Cell Biol 106:1863-1872

Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S, (1989): osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. – Science 245:855-857

Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, Kurdyla JT, McNulty DE, Drake FH, Gowen M, Levy MA (1996): Proteolytic Activity of Human Osteoclast Cathepsin K. - The Journal of Biological Chemistry 271/21:12517-12524

Bühling F, Reisenauer A, Gerber A, Krüger S, Weber E, Brömme D, Roessner A, Ansorge S, Welte T, Röcken CH (2001): Cathepsin K- a marker of macrophage differentiation? - J Pathol 195:375-382

Costa da C E T, Annels N E, Faaij C M J M, Forsyth R G, Hogendoorn P C W, and Egeler R M( 2005) Presence of osteoclast-like multinucleated giant cells in the bone and nonostotic lesions of Langerhans cell histiocytosis. JEM 201/5: 687-693

Dodds R, James IE, Rieman D, Ahern R, Hwang SM, Connor JR, Thompson SD, Verber DF, Drake FH, Holmes S, Lark MW, and Gowen M (2001): Human Osteoclast Cathepsin K Is Processed Intracellularly Prior to Attachment and Bone Resorption. - Journal of Bone and Mineral research 16/3:478-486

Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, Lee-Rykaczewski E, Coleman L, Rieman D, Barthlow R, Hastings G, and Gowen M (1996): Cathepsin K, but Not Cathepsins B, L, or S, Is Abundantly Expressed in Human Osteoclasts. - The Journal of Biological Chemistry 271/21:12511-12516

Ganero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drake FH, McQueney MS, Foged NT, Delmas PD, Delaisse J-M (1998): The Collagenolytic Activity of Cathepsin K Is Unique among Mammalian Proteinases. - The Journal of Biological Chemistry 273/48:32347-32352

---

Gaumann A, Hansen T, Köhler HH, Kommos F, Mann W, Maurer J, Kirkpatrick CJ, Kriegsmann J (2001): The Expression of Cathepsins in Osteoclast-like Giant Cells of Anaplastic Thyroid Carcinoma with Tracheal Perforation. - Pathology-Research and Practice 197/4: 257-262

Gelb BD, Shi G-P, Chapman, HA and Desnick, RJ (1996): Pycnodysostosis, a Lysosomal Disease Caused by Cathepsin K Deficiency. - Science 273:1236-1238

Hall TJ, and Chambers TJ (1996): Molecular aspects of osteoclast function. Inflamm Res 45:1-9

Hansen T, Petrow PK, Gaumann A, Keyszer G, Otto M, Kirkpatrick J, Kriegsmann J (2001a): Expression of Cysteine Proteinases Cathepsins B and K and Cysteine Proteinase Inhibitor Cystatin C in Giant Cell Tumor of Tendon Sheath. - Modern Pathology 14/4:318-324

Hansen T, Burg J, Kirkpatrick CJ, Kriegsmann J (2002): Osteoclast-like Giant Cell Tumor of the Pancreas With Ductal Adenocarcinoma: Case Report with Novel Data on Histogenesis. - Pancreas 25/3:317-320

Hansen T, Unger RE, Gaumann A, Hundorf I, Maurer J, Kirkpatrick J, Kriegsmann J (2001b): Expression of Matrix-Degrading Cysteine Proteinase Cathepsin K in Cholesteatoma. - Modern Pathology 14 /12:1226-1231

Inui T, Ishibashi O, Inaoka T, Origane Y, Kumegawa M, Kokubo T, and Yamamura T (1997): Cathepsin K Antisense Oligodeoxynucleotide Inhibits Osteoclastic Bone Resorption. - J Biol Chem 272:8109-8112

Ishibashi O, Inui T, Mori Y, Kurokawa T, Kokubo T, Kumegawa M (2001): Quantification of the Expression Levels of Lysosomal Cysteine Proteinases in Purified Human Osteoclastic Cells by Competitive RT-PCR. - Calcif Tissue Int 68:109-116

James IE, Marquis RW, Blake SM, Hwang SM, Gress CJ, Ru Y, Zembryki D, Yamashita DS, McQueney MS, Tomaszek TA, Oh HJ, Gowen M, Veber DF, Lark MW (2001): Potent and selective cathepsin L inhibitors do not inhibit human osteoclast resorption in vitro. - J Biol Chem 276:11507-11511

Kahudo S, Mano H, Shiokawa M, Mori Y, Kumegawa M, and Hakeda Y (1997): Concanavalin A Directly Stimulates Bone-Resorbing Activity of Osteoclasts and Their Gene Expression of Cathepsin K/OC-2. - Biochem Biophys Res Commun 234:600-604.

---

Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin T J, and Suda T (2000): Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Stimulates Osteoclast Differentiation by a Mechanism Independent of the ODF/RANKL-RANK Interaction. - *The Journal of Experimental Medicine* 191/2: 275-286

Lakkakorpi PT, Horton MA, Helfrich MH, Karhukorpi EK, Vaananen HK (1991): Vitronectin receptor has a role in bone resorption but does not mediate tight sealing zone attachment of osteoclasts to the bone surface. - *J Cell Biol* 115/4: 1179-86

Li J, Sarosi I, Yan X-Q, Morony S, Capparelli C, Tan H-L, McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan S-C, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL, and Boyle WJ (2000): RANK is the intrinsic hemopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. - *PNAS* 97/4:1566-1571

Lindeman JHN, Hanemaaijer R, Mulder A, Dijkstra S, Szuhai K, Bromme K, Verheijen JH, Hogendoorn PCW (2004): Cathepsin K is the Principal Protease in Giant Cell Tumor of Bone. - *American Journal of Pathology* 165 /2: 593-600

Littlewood-Evans A, Kokubo T, Ishibashi O, Inaoka T, Wlrodarski B, Gallagher JA, and Bilbe G (1997): Localization of Cathepsin K in Human Osteoclasts by In Situ Hybridization and Immunohistochemistry. - *Bone* 20:81-86

Liu B, Yu S-F, Li T-J (2003): Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts. - *J Oral Pathol Med* 32:367-375

Mano H, Yuasa T, Kameda T, Miyazawa K, Nakamaru Y, Shiokawa M, Mori Y, Yamada K, Miyata H, Shindo H, Azuma H, Hakeda Y, and Kumegawa M (1996): Mammalian Mature Osteoclasts as Estrogen Target Cells. - *Biochem Biophys Res* 223:637-642

Mason RW, Johnson DA, Barrett AJ, and Chapman HA (1986): Elastinolytic activity of human cathepsin L. - *Biochem J* 233:925-927

Morgan T, Atkins G, Johnson SA, Kansara M, Schlicht SL, Slavin JL, Simmons P, Dickinson I, Powell G, Choong PFM, Holloway AJ, and Thomas DM (2005): Molecular Profiling of Giant Cell Tumor of Bone and the Osteoclastic

---

Localization of Ligand for Receptor Activator of Nuclear Factor kB. - American Journal of Pathology 167/1:117-128

Morton PA, Zacheis ML, Giacoletto KS, Manning JA and Schwartz BD (1995): Delivery of nascent MHC class II-invariant chain complexes to lysosomal compartments and proteolysis of invariant chain by cysteine proteinases precedes peptide binding in B-lymphoblastoid cells. - J Immunol 154:137-150

Motyckova G, Fisher DE (2002): Pycnodysostosis: role and regulation of cathepsin K in osteoclast function and human disease. - Curr Mol Med 2:407-421

Romas E, Bakharevski O, Hards DK, et al.(2000): Expression of osteoclast differentiation factor at sites of bone erosion in collagen-induced arthritis. - Arthritis Rheum 43: 821-826

Saneshige S, Mano H, Tezuka K, Kakudo S, Mori Y, Honda Y, Itabashi A, Yamada T, Miyata K, and Hakeda Y (1995) Retinoic acid directly stimulates osteoclastic bone resorption and gene expression of cathepsin K/OC-2. - Biochem J 309:721-724

Schoedel KE, Greco MA, Stetler-Stevenson, WG, Ohori NP, Goswami S, Present D, Steiner GC (1996): Expression of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in giant cell tumor of bone; an immunohistochemical study with clinical correlation. - Hum Pathol 27:1144-1148

Shi G-P, Munger JS, Meara J P, Rich DH and Chapman HA (1992): Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastolytic cysteine protease. - J Biol Chem 267:7258-7262

Simon R, and Sauter G (2003): Tissue microarray (TMA) applications: implications for molecular medicine.-Expert Reviews in Molecular Medicine 5: 1-12

Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N (1995): Modulation of osteoclast differentiation by local factors - Bone 17 (Suppl.) 87S-91S.

Tsurukai T, Udagawa N, Matsuzaki K, Takahashi N, and Suda T (2000): Roles of macrophage-colony stimulating factor in osteoclastogenesis. - J Bone Miner Metab 18: 177-184.

Vaananen HK, Karhukorpi EK, Sundquist K, Wallmark B, Roininen I, Hentunen T, Tuukkanen J, Lakkakorpi P (1990): Evidence for the presence of a proton

---

pump of the vacuolar H(+)-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts.-J Cell Biol 111: 1305-1311

Yamaguchi N, Chung S-M, Shiroeda O, Koyama K and Imanishi J (1990): Characterization of a cathepsin L-like enzyme secreted from human pancreatic cancer cell line HPC-YP. - Cancer Res 50: 658-663

Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD (1990): The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of macrophage colony stimulating factor. - Nature 345: 442-444

Yoshida W, Uzuki M, Kurose A, Yoshida M, Nishida J, Shimamura T and Sawai T (2003): Cell Characterization of Mononuclear and Giant Cells Constituting Pigmented Villonodular Synovitis. - Human Pathology 34/1:65-73

Zaidi M, Troen B, Moonga BS (2001): Cathepsin K, osteoclastic resorption, and osteoporosis therapy. - J Bone Miner Res 16:1747-1749

---

## Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. T. Löning für die freundliche Überlassung des Themas, und die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Oralpathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf erstellen zu dürfen, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dr. med. R. Friedrich danke ich für die freundliche Bereitstellung der klinischen Daten.

Ganz besonders herzlich danken möchte ich Frau Dr. rer. nat. Kerstin Roeser für ihre ausgezeichnete Betreuung und ihr unermüdliches Engagement während der gesamten Arbeit.

Tanja Linke (MTA) und Bianca Kelp (MTA) danke ich für die Einarbeitung in die Methodik und ihre stets hilfsbereite Betreuung im Labor.

Mein Dank gilt ebenfalls meiner Familie, insbesondere meinem Ehemann Dr. rer. nat. Volker Eisenmann für seine Unterstützung.

---

## Lebenslauf

Julika Eisenmann, geb. Halm

geboren am 03.03.1979 in Hamburg, wohnhaft in Hamburg, Oelkersallee 34.

### Schullaufbahn:

Juni 1998	Abitur.
1989-1998	Gymnasium Rahlstedt.
1985-1989	Grundschule Lütjensee.

### Studium

April 1999 bis Dezember 2005

Studium der Zahnmedizin an der Universität Hamburg.

12 / 2005	Staatsexamen, Universität Hamburg.
03 / 2003	Zahnärztliche Vorprüfung, Universität Hamburg.
09 / 2000	Naturwissenschaftliche Vorprüfung für Zahnärzte, Univ. Hamburg.

Beginn der Promotion am Institut für Pathologie, Institut für Oralpathologie, des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf: Frühjahr 2005.

Beginn der zahnärztlichen Assistenzzeit in einer niedergelassenen Praxis in Hamburg-Niendorf: Frühjahr 2007.

---

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, und die aus den benutzten Werken, wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.